



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione

**Dottorato di Ricerca in
Biochimica cellulare e attività dei farmaci in oncologia**

Con il contributo di

COMMISSIONE EUROPEA, FONDO SOCIALE EUROPEO E DELLA REGIONE CALABRIA

XXVI CICLO

**MODELLI SPERIMENTALI CELLULARI E
MOLECOLARI
PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DI
XENOBIOTICI**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10 BIOCHIMICA

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Diego Sisci

Firma

Supervisore/Tutor: Ch.mo Prof. Cesare Indiveri

Firma

Dottorando: Dott.ssa Valentina Peta

Firma

- INDICE -

ABSTRACT	p.5
----------------	-----

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1	Il trasporto attraverso la membrana	p.9
1.2	Il trasporto attraverso la membrana: diffusione semplice	p.9
1.3	Il trasporto attraverso la membrana: diffusione facilitata.....	p.10
1.4	Il trasporto attraverso la membrana: trasporto attivo	p.11
1.5	Classificazione delle proteine di membrana	p.12
1.6	Tecniche di studio dei sistemi di trasporto di membrana	p.13
1.7	Espressione eterologa di sistemi di trasporto di membrana	p.16
1.8	La carnitina sintesi, omeostasi e trasporto	p.18
1.9	I cationi organici.....	p.21
1.10	La famiglia dei trasportatori SCL22	p.22
1.11	La famiglia OCTN.....	p.24
1.12	Il sistema di trasporto di membrana plasmatica OCTN1.....	p.26
1.13	Il sistema di trasporto di membrana plasmatica OCTN2.....	p.29
1.14	OCTNs e patologie nell'uomo	p.33
1.15	Reagenti mercuriali	p.35
1.16	Interazione dei composti mercuriali con le proteine di membrana	p.38
1.17	Obiettivi e importanza dello studio dei composti xenobiotici	p.41
1.18	Insufficienza renale indotta da farmaci.....	p.43
1.19	Cisplatino caratteristiche generali, meccanismo d'azione e nefrotossicità.....	p.48
1.20	Ciclosporina caratteristiche generali, meccanismo d'azione e nefrotossicità....	p.51

1.21	Caratteristiche generali, meccanismo d'azione e nefrotossicità del BEA	p.53
1.22	Biomarcatori convenzionali di tossicità renale, vantaggi e limiti	p.55
1.23	Caratteristiche di un biomarcatore	p.59
1.24	Nuovi biomarcatori di tossicità renale	p.60
1.25	Cellule primarie nuovo modello sperimentale per la valutazione di nefrotossicità indotta da farmaci	p.67

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1	Preparazione di vescicole di membrana di brush border di rene di ratto.....	p.72
2.2	Determinazione della concentrazione delle proteine nei brush border	p.74
2.3	Solubilizzazione del trasportatore OCTN2.....	p.75
2.4	Determinazione della concentrazione delle proteine nei campioni.....	p.76
2.5	Purificazione di hOCTN1 over-espresso: cromatografia per affinità.....	p.77
2.6	Preparazione dei liposomi.....	p.80
2.7	Incorporazione della proteina OCTN2 nei liposomi: ricostituzione	p.81
2.8	Preparazione delle colonne XAD-4.....	p.82
2.9	Incorporazione della proteina hOCTN1 nei liposomi: ricostituzione	p.83
2.10	Bachwise per la ricostituzione di hOCTN1	p.84
2.11	Preparazione delle colonne Sephadex G-75	p.85
2.12	Misura di trasporto dell'uptake di substrato radioattivo nei proteoliposomi.....	p.88
2.13	Calcolo dell'attività di trasporto.....	p.89
2.14	Elaborazione dei dati sperimentali	p.90
2.15	Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide in sds	p.92
2.16	Isolamento e messa in coltura di cellule primarie di rene	p.93
2.17	Aggiunta di farmaci alle colture cellulari e fissaggio delle cellule	p.96

2.18	Estrazione di proteine e saggio proteico	p.97
2.19	Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS e Western Blot	p.98
2.20	Immunoistochimica su cellule	p.100
2.21	Saggio per la quantificazione delle cellule necrotiche	p.101
2.22	Saggio per la quantificazione delle cellule apoptotiche	p.102
2.23	Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale	p.103
2.24	Analisi quantitativa dell'espressione di biomarcatori	p.104

CAPITOLO 3: RISULTATI

3.1	Inibizione del trasportatore di Carnitina OCTN2 da parte di HgCl ₂ e MeHg nel modello sperimentale dei proteoliposomi: comprensione del meccanismo di tossicità	p.107
3.1.1	Inibizione del trasporto di Carnitina da parte dei mercuriali	p.107
3.1.2	Cinetica di inibizione del sistema di trasporto OCTN2 ricostituito da parte dei composti mercuriali	p.111
3.1.3	Valutazione del trasporto di mercuriali da parte di OCTN2	p.115
3.2	Inibizione del trasportatore OCTN1 umano da parte di HgCl ₂ , MeHg e Cadmio nel modello sperimentale dei proteoliposomi: identificazione dei residuo di Cys implicati nell'interazione fra la proteina e i reagenti dei gruppi sulfidrilici	p.118
3.2.1	Inibizione del trasporto di TEA nella proteina WT da parte di mercuriali e metalli pesanti	p.118
3.2.2	Cinetica di inibizione del sistema di trasporto hOCTN1 da parte dei composti mercuriali e cadmio	p.123

3.2.3	Identificazione dei residui di Cys implicati nell'interazione fra la proteina composti mercuriali e i reagenti dei gruppi sulfidrilici.....	p.125
3.3	Valutazione e quantificazione dell'espressione di biomarcatori a seguito della somministrazione di farmaci	p.132
3.4	Valutazione e quantificazione della morte cellulare per necrosi e apoptosi a seguito della somministrazione di farmaci	p.142
3.5	Valutazione della funzionalità degli organelli citoplasmatici a seguito della somministrazione dei farmaci.	p.151

CAPITOLO 4: CONCLUSIONI

4.1	Inattivazione dei trasportatori OCTN2 di ratto e OCTN1 umano da parte dei reagenti mercuriali	p.132
4.2	Identificazione dei residui di Cys coinvolti nell'interazione fra OCTN1 e i reagenti dei gruppi SH	p.142
4.3	Implicazioni tossicologiche.....	p.151
4.4	Nefrotossicità indotta da farmaci su cellule primarie di rene.	p.151

	BIBLIOGRAFIA.....	p.169
--	--------------------------	--------------

ABSTRACT

The aim of my thesis was to find two different experimental models to study cellular and molecular xenobiotics toxicity. In the first part of the present work we studied the interaction between two different plasma membrane transporters (OCTN2 and OCTN1), mercury reagents and heavy metals. Mercury and heavy metals in general cause toxic effects in many tissues interacting with protein cysteine (Cys) thiols. Transport systems represent critical targets of mercurials. Indeed, the majority of transport systems of higher eukaryotes contain several Cys residues. One of the most up to date method of studying transport is the reconstitution of transporters in proteoliposomes. This method has been used as a useful approach to test the effect of HgCl₂, methylmercury (MeHg) and Cadmium on the carnitine (OCTN2) transporter, extracted from rat kidney brush border membranes and reconstituted in liposomes by removing the detergent with hydrophobic chromatography columns, and the human organic cation transporter (OCTN1) overexpressed in *E. coli*, purified by Ni-chelating chromatography and reconstituted in liposomes by detergent removal with a batch-wise procedure. Transport was measured as [³H]carnitine uptake into proteoliposomes containing carnitine (antiport reaction) in the case of rat OCTN2 and as [¹⁴C]tetraethylammonium uptake in the case of human OCTN1. Mercurials and heavy metals strongly inhibited the transport. Inhibition was reversed by 1,4-dithioerythritol (DTE), L-cysteine (Cys), and N-acetyl-L-cysteine (NAC) indicating that it was caused by covalent reaction of mercurials and heavy metals with Cys residue(s) of OCTN2 and OCTN1. The presence of substrate prevented the inhibition in rat OCTN2 transporter indicating that the mercurial binding residue (Cys) is in the substrate binding site. No substrate protection was found in the case of the human OCTN1, so probably mercurial and heavy metal binding residue is away from substrate binding site. For the human OCTN1 we also tested the effect of chemical reagents which are known to form mixed disulphides with proteins SH residues, MTS reagents. MTSEA exerted

inhibition of transport very similar to those observed for the heavy metals and as the toxic compounds. To ascertain the involvement of Cys residues in the interaction of the human OCTN1 with the xenobiotics and to identify the possible target of the reagents, 7 mutants were prepared in which the seven cysteines present in the transmembrane domains or in the extracellular loop were mutated to alanine. An additional mutant lacking two Cys residues has also been constructed (C50A/C136A). We studied the dose-response curves of the transporter for each inhibitor, the mercury reagents showed similar behavior, both HgCl₂ and MeHg strongly inhibited the WT and the mutants C81A, C113A, C236A, C270A and C374A. While a clear shift of the curves towards higher concentrations of the compounds was observed in the case of mutants C50A and C136A indicating a decrease of affinity of these mutants for the mercury reagents. The experiment on the double mutant C50A/C136A showed a nearly complete lack of inhibition by the two reagents demonstrating the two Cys residues were indeed the target of the mercury compounds. The homology model of the human OCTN1 confirms the experimental data obtained in this work, in fact the model shows that the two cysteine residues (Cys-50 and Cys-136) are exposed to the extracellular site of the plasma membrane and are accessible to sulfhydryl groups reagents.

In the present work we studied, also, biomarkers expression and nephrotoxic effect induced by drugs in human kidney primary cells model. Kidney is a primary target of drug-induced toxicity. Toxic effects on the kidney related to drugs are both common and expected, given the kidney's roles in plasma filtration and maintenance of metabolic homeostasis. As such, glomerular, tubular and renal interstitial cells frequently are exposed to concentrations of drugs, which can induce changes in kidney function and structure. We tested three different drugs: 2-Bromoethanamine an analgesic, cisplatin a chemotherapeutic agent and cyclosporine a immunosuppressive agent. We found that after the addition of these drugs on human primary kidney cells there is an increase in the expression of two different biomarkers:

Osteopontin (OPN) a distal tubule biomarker and KIM-1 a membrane glycoprotein expressed by proximal tubule cells after kidney injury. We also found the toxic concentrations after 24 hours of exposition to the three different drugs, we quantified the percentual of necrotic and apoptotic cells and we studied the toxicological effect of these drugs on cellular organelles like mitochondria. In conclusion proteoliposomes represent a suitable molecular model for studying the interaction of plasma membrane transport and toxic compounds, such as mercurials, and human primary cell culture is a valuable tool to study cell toxicity mechanisms of different drugs. Both the experimental models are a novel and potentially important tools in drug discovery and in the understanding of toxicity mechanism of xenobiotics compounds.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 IL TRASPORTO ATTRAVERSO LA MEMBRANA

Il trasporto attraverso le membrane biologiche rappresenta un aspetto principale delle funzioni cellulari, ovvero la capacità di ioni e di molecole organiche di spostarsi attraverso le membrane in maniera selettiva. Nel movimento dei soluti attraverso le membrane sono implicati tre tipi di trasporto fondamentalmente diversi:

- Diffusione semplice che consiste in un movimento diretto e spontaneo di molecole di soluto attraverso la membrana secondo gradiente di concentrazione.
- Diffusione facilitata dei soluti che è possibile soltanto grazie alla presenza di proteine di trasporto senza apporto di energia (trasporto passivo).
- Trasporto attivo che consiste nel passaggio attraverso le membrane di soluti contro gradiente di concentrazione con apporto di energia.

1.2 IL TRASPORTO ATTRAVERSO LA MEMBRANA: DIFFUSIONE SEMPLICE

Consiste nel movimento netto e spontaneo di un soluto da una regione in cui la sua concentrazione è più alta a una regione in cui la sua concentrazione è più bassa. A causa della natura idrofobica della parte interna della membrana, la diffusione semplice costituisce una modalità di trasporto di pertinenza solamente di piccole molecole relativamente apolari.

Esempi di molecole in grado di diffondere seguendo questo processo sono O_2 e CO_2 , ognuna dotata di una specifica velocità di diffusione.

Dal punto di vista termodinamico la diffusione semplice è un processo esoergonico in quanto non richiede energia metabolica, le singole molecole diffondono in entrambe le direzioni, ma il flusso netto avviene sempre nella direzione dell'energia libera minima, che nel caso di molecole prive di carica significa secondo gradiente di concentrazione.

Dal punto di vista cinetico, una caratteristica importante della diffusione semplice è che, all'interno di un ampio spettro di concentrazioni, la velocità di trasporto di una specifica

sostanza è direttamente proporzionale alla differenza di concentrazione di quella sostanza attraverso la membrana.

1.3 IL TRASPORTO ATTRAVERSO LA MEMBRANA: DIFFUSIONE FACILITATA

Molte sostanze presenti nelle cellule sono troppo grandi o troppo polari per poter attraversare la membrana per diffusione semplice, questi soluti possono quindi spostarsi all'interno o all'esterno delle cellule e degli organelli a velocità apprezzabili soltanto con l'aiuto di proteine di trasporto, che non sono enzimi ma analogamente a questi abbassano l'energia di attivazione necessaria per il trasporto.

Vengono generalmente distinte due classi di proteine che mediano la diffusione facilitata: i carrier o permeasi e le proteine canale. Le proteine canale possiedono un poro centrale attraverso cui fluiscono rapidamente i soluti quando il canale è aperto, diversamente le proteine carrier legano i soluti su un lato della membrana, vanno incontro a un cambiamento allosterico e, infine, lasciano i soluti sull'altro lato della membrana.

Le proteine canale hanno le seguenti caratteristiche: selettività per il soluto, un elevato tasso di permeazione per il soluto e un meccanismo di apertura e di chiusura (gating) del canale stesso. Infatti una delle differenze più importanti fra canali e permeasi è la velocità di traslocazione che risulta molto più alta per i canali rispetto alle permeasi [2,3].

Analogamente agli enzimi, le permeasi sono altamente specifiche per un singolo composto o un piccolo gruppo di composti correlati e talvolta persino per uno specifico stereoisomero. Inoltre il trasporto facilitato da carrier, come la catalisi enzimatica, segue la cinetica di saturazione. Questo tipo di trasporto ha V_{max} e K_m corrispondenti alla concentrazione del soluto trasportabile necessaria per ottenere la metà della V_{max} di trasporto. Ciò significa che la V_i del trasporto del soluto può essere matematicamente descritta dall'equazione usata per la cinetica enzimatica:

$$V = V_{\max} S / K_m + S$$

dove S rappresenta la C_i (concentrazione iniziale) del soluto su un lato della membrana (ovvero, sul lato esterno della membrana se si sta determinando la V_i del trasporto verso l'interno). Di conseguenza per la diffusione facilitata l'andamento della velocità di trasporto rispetto alla concentrazione del soluto è iperbolico [1].

1.4 IL TRASPORTO ATTRAVERSO LA MEMBRANA: TRASPORTO ATTIVO

Il trasporto attivo è un processo che differisce dalla diffusione facilitata poiché determina il movimento dei soluti sempre lontano dall'equilibrio termodinamico e perciò richiede sempre impiego di energia. Il trasporto attivo assolve a tre funzioni fondamentali: rende possibile l'assorbimento delle sostanze nutritive, consente ai prodotti di secrezione e ai materiali di rifiuto di essere eliminati dalla cellula e infine consente di mantenere le concentrazioni intracellulari di ioni inorganici specifici. Le proteine di membrana coinvolte nel trasporto attivo sono spesso chiamate pompe. Una delle distinzioni importanti fra trasporto attivo e diffusione semplice o facilitata riguarda la direzione del trasporto. La diffusione semplice e quella facilitata sono entrambe non direzionali rispetto alla membrana, ciò significa che il soluto si può spostare nell'una o nell'altra direzione essendo completamente condizionato dal predominante gradiente di concentrazione, il trasporto attivo invece possiede una direzionalità intrinseca, si dice perciò che il trasporto attivo è un processo unidirezionale. In base alla fonte di energia, il trasporto attivo viene considerato diretto o primario oppure indiretto o secondario. Nel trasporto attivo diretto l'accumulo delle molecole di soluto o degli ioni su un lato della membrana viene accoppiato direttamente a una reazione chimica esoergonica, di solito l'idrolisi di una molecola di ATP, le proteine di trasporto che sono attivate direttamente dall'idrolisi di ATP sono chiamate ATPasi di trasporto o pompe ATPasi. Il trasporto attivo indiretto invece dipende dal trasporto accoppiato di due soluti, in cui il

movimento di un soluto secondo il suo gradiente attiva il movimento dell'altro soluto contro il suo gradiente. L'accoppiamento di un processo favorevole con uno sfavorevole permette ad entrambi di avvenire con una diminuzione totale di energia libera. Questo processo di duplice trasporto può essere descritto sia come antiporto che come simporto. Nel caso di soluti privi di carica possiamo considerare il trasporto come una semplice reazione chimica per cui la variazione di energia libera per il trasporto di un soluto sarà uguale a:

$$\Delta G = RT \ln [S]_{\text{interno}} / [S]_{\text{esterno}}$$

dove R è la costante dei gas (8.315 J/mole K) e T è la temperatura assoluta. Per i soluti provvisti di carica invece dobbiamo tenere conto sia del gradiente di concentrazione sia del potenziale di membrana. Quando il soluto è uno ione il suo movimento, senza il contemporaneo spostamento di un altro ione con carica opposta in direzione contraria, determina la separazione endoergonica delle cariche positive da quelle negative, producendo un potenziale elettrico. Questo tipo di trasporto viene detto elettrogenico. Il costo energetico del movimento di uno ione dipende dal suo potenziale elettrochimico, cioè dalla somma del potenziale elettrico e del gradiente chimico.

Calcolare il ΔG per il trasporto degli ioni richiede quindi un'equazione a due termini:

$$\Delta G_t = RT \ln [S]_{\text{interno}}/[S]_{\text{esterno}} + ZF\Delta\Psi$$

dove Z è la carica dello ione, F è la costante di faraday (96480 J/V mole) $\Delta\Psi$ è il potenziale elettrico transmembrana (in volt) [2].

1.5 CLASSIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA

La classificazione dei meccanismi di trasporto TC è un sistema che permette di classificare le proteine di membrana tenendo conto sia delle caratteristiche funzionali che filogenetiche delle proteine. Tramite questo sistema di classificazione le proteine di membrana sono state

suddivise in oltre 600 famiglie. I sistemi di trasporto sono stati classificati in base a cinque criteri, ad ognuno dei quali corrisponde una lettera diversa: V, W, X, Y e Z .

La lettera V indica la classe del trasportatore, W la sottoclasse, X corrisponde alla famiglia del trasportatore, Y alla sottofamiglia, e Z si riferisce al substrato o alla classe di substrati trasportati. Due sistemi di trasporto appartenenti alla stessa sottofamiglia che trasportano lo stesso substrato hanno lo stesso valore TC, indipendentemente dal fatto che siano ortologi o paraloghi. Se nella proteina sono presenti più subunità queste vengono indicate con S1, S2, S3 e così via [4,5].

1.6 TECNICHE DI STUDIO DEI SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA

Le attività funzionali delle proteine di membrana sono modulate dalla struttura delle molecole lipidiche circostanti, quindi la composizione del doppio strato fosfolipidico può influenzare le interazioni delle proteine di membrana con lo strato fosfolipidico di cui è composta la membrana. Lo studio in vivo delle proteine di membrana risulta così difficile soprattutto per due motivi: il primo è correlato alla presenza nella struttura della proteina di trasporto di domini idrofobici, che rappresentano la porzione della proteina inserita nella membrana e limitano la solubilità della proteina in acqua; il secondo è rappresentato dalla necessità di disporre di due compartimenti fra cui seguire il trasporto catalizzato dalla proteina [6]. I primi studi sono stati effettuati in sistemi di membrane native (cellule intatte o mitocondri). In questi studi il compartimento interno è rappresentato dall'ambiente nativo intracellulare, mentre l'ambiente esterno risulta artificiale. Lo studio del trasporto viene così effettuato tramite l'utilizzo di substrati marcati con radioisotopi o molecole fluorescenti che permettono di visualizzare il passaggio dei substrati attraverso i due compartimenti cellulari.

Lo svantaggio di questo tipo di tecnica sta nel fatto che trattandosi di sistemi di membrana nativi la presenza di enzimi nei compartimenti interni, o di altre proteine di trasporto sulla

membrana plasmatica possono interferire con l'attività del trasportatore oggetto di studio, inoltre solo l'ambiente extracellulare, essendo artificiale può essere soggetto al controllo delle condizioni sperimentali [7].

Per tutte queste ragioni, per semplificare lo studio dei sistemi di membrana sono stati introdotti modelli artificiali di membrane costituiti da monolayers, bilayers su supporti solidi, liposomi e nanodischi, consentendo così un'indagine dettagliata della struttura e della funzione delle proteine di membrana.

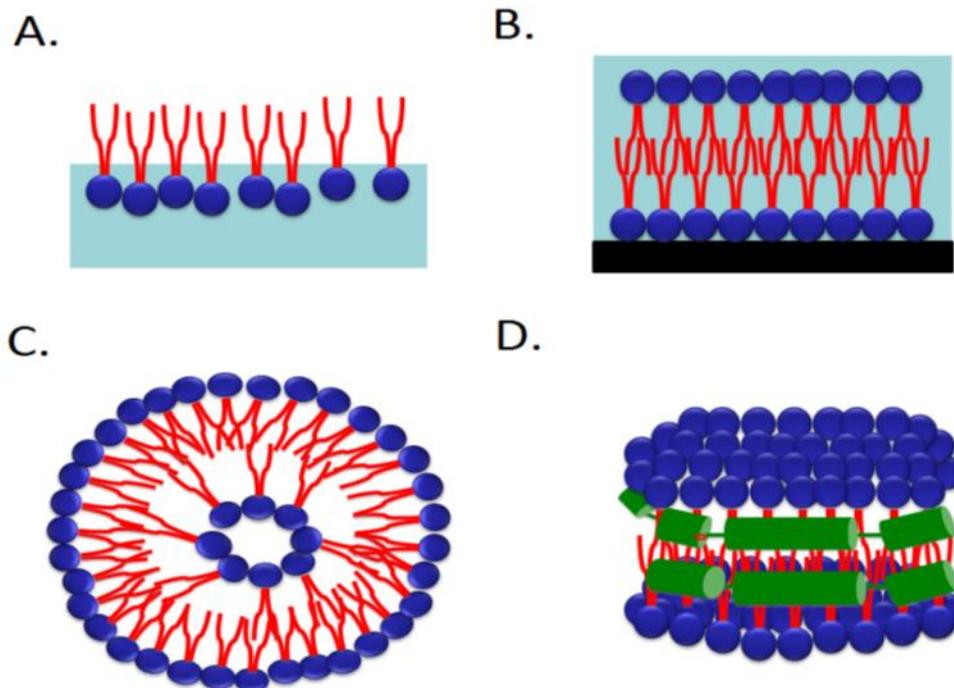


Figura 1. Immagine schematica di (A) monolayer, (B) bilayer lipidico su supporto solido, (C) liposomes e (D) nanodischi. Le code dei fosfolipidi sono indicate in rosso e le teste idrofiliche dei fosfolipidi in blu. I nanodischi contengono un sostegno proteico indicato in verde.

Tali modelli artificiali sono quelli che maggiormente si avvicinano alla struttura del doppio strato fosfolipidico delle membrane biologiche e permettono l'inserimento della proteina oggetto di studio in modo che la sua attività non venga influenzata dalla presenza di enzimi o altre proteine di membrana, come invece avviene nei modelli di membrane native. Tuttavia,

molti aspetti tra cui la struttura di fosfolipidi, devono essere presi in considerazione e ottimizzati per la creazione di un modello sperimentale funzionante, ad esempio, l'idrofobicità dei fosfolipidi determinata dalla lunghezza delle catene degli acidi grassi, e le proprietà chimiche delle teste dei fosfolipidi. Entrambi questi parametri sono infatti di fondamentale importanza nella stabilizzazione della struttura delle proteine di membrana.

Le vescicole lipidiche, note anche come liposomi, sono costituite da un bilayer fosfolipidico. I liposomi sono stati ampiamente utilizzati per più di 30 anni per ricostituire le proteine di membrana. Il diametro dei liposomi varia fra 50 e 250 nm a seconda delle tecniche usate per la preparazione. Per la formazione dei proteoliposomi spesso è richiesto l'utilizzo di detergenti che siano in grado di portare in soluzione le proteine e di inserirle in micelle miste. Ciò si deve alla presenza nelle molecole di detergente di una estremità idrofobica che si lega alle regioni idrofobiche delle proteine di membrana e di una estremità con carattere polare per cui si formano dei complessi proteina-detergente in grado di portare in soluzione le proteine di membrana. Le estremità polari dei detergenti possono essere elettricamente cariche, come nel caso del dodecilsolfato di sodio (SDS), oppure elettricamente neutre, come nel caso dei detergenti Triton. Se si allontana il detergente, in assenza di fosfolipidi, le molecole proteiche tenderanno ad aggregarsi e precipitare; se invece prima di allontanare il detergente si provvede a mescolare la proteina con fosfolipidi, allora la proteina si inserirà nel doppio strato lipidico formando i proteoliposomi. La rimozione del detergente utilizzato per la solubilizzazione della proteina può avvenire per diluizione, dialisi o assorbimento su particolari resine idrofobiche [6,8,9]. Una volta ricostituita la proteina in proteoliposomi il trasporto viene seguito analogamente a quanto detto per i sistemi cellulari, utilizzando molecole marcate con radioisotopi o sonde fluorescenti. I vantaggi nell'utilizzo di questa tecnica sono molteplici, ad esempio si ha la possibilità di controllare le condizioni sperimentali nel compartimento interno dei proteoliposomi, è possibile studiare l'effetto di

varie molecole su entrambi i lati dei proteoliposomi, studiare il tempo di raggiungimento dell'equilibrio da parte delle molecole radioattive, ed è infine possibile ottenere risultati riguardo la cinetica del trasporto. La ricostituzione nei liposomi è una tecnica che può essere utilizzata sia per lo studio delle proprietà funzionali di proteine di trasporto estratte dalla propria membrana nativa, sia per lo studio di proteine over- espresse, ad esempio nei batteri o nei lieviti [10].

1.7 ESPRESSIONE ETEROLOGA DI SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA

La necessità dell'espressione genica in sistemi eterologhi nasce dalla necessità di disporre di grandi quantità di peptidi di interesse pratico o scientifico e dalla difficoltà di esprimere geni, di qualunque natura, in organismi superiori complessi e soggetti a regolazioni non sempre pienamente comprese. Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana, come detto precedentemente, è limitato dalla necessità di ottenere membrane in cui studiare il trasporto, dalla necessità di estrarre le proteine dalle membrane native per ricostituirle in sistemi artificiali e dalla scarsa rappresentatività dei sistemi di trasporto di interesse nelle cellule e nei tessuti di partenza. La limitazione nella quantità di proteina è particolarmente svantaggiosa nei casi in cui si vogliono intraprendere studi di tipo strutturale.

Il livello di conoscenze di alcuni organismi semplici invece, ha stimolato lo sviluppo di numerosi sistemi di espressione eterologhi basati essenzialmente sull'utilizzo di appositi vettori di espressione. *E.coli* è sicuramente il più utilizzato sia nell'industria che nella ricerca. Tuttavia l'espressione presenta dei problemi legati, per esempio, alla difficoltà di ottenere una proteina che mantenga la conformazione nativa (i sistemi di folding dei batteri sono molto meno sofisticati di quelli eucariotici); un'altra difficoltà è rappresentata dalla mancanza, nei batteri, di adeguati sistemi di modificazione post-traduzionale importanti per l'attività biologica della proteina. È importante, perciò, costruire un adeguato vettore di espressione

costruendo cioè un plasmide replicativo contenente tutti i segnali necessari ad ottimizzare la corretta trascrizione e traduzione dei geni eterologhi nell'ospite in cui avviene l'espressione e in cui è possibile ottimizzare la stabilità dei prodotti di espressione.

Fra i sistemi eucariotici maggiormente utilizzati come ospiti vi sono i lieviti; i vantaggi nell'utilizzo dei lieviti comprendono una buona conoscenza della loro genetica e la facilità con la quale questi microorganismi possono essere coltivati in laboratorio. Il lievito più comunemente utilizzato è *Saccharomyces cerevisiae*, si tratta di un microorganismo che ha una velocità di crescita molto elevata, presenta un genoma molto semplice e la sua sequenza è conosciuta per intero. Un altro sistema eucariotico usato spesso per la produzione di proteine ricombinanti è rappresentato dagli oociti dell'anfibio *Xenopus laevis*, arrestati nella profase della prima divisione meiotica, questo sistema presenta il vantaggio che le proteine ricombinate vanno incontro a corrette modificazioni post traduzionali e vengono indirizzati verso gli specifici compartimenti cellulari. Le cellule ospite procariotiche maggiormente utilizzate per l'espressione eterologa di proteine di membrana per studi di tipo funzionali sono i batteri, in particolare *E. coli*, questo perché le probabilità di successo dell'over-espressione risulta essere molto alta, i costi sono ridotti e la velocità di crescita elevata, inoltre si dispone di un numero molto cospicuo di vettori di clonaggio utilizzabili e vi sono ampie conoscenze genetiche. Si possono utilizzare diversi ceppi di *E. coli* in modo da poter ottimizzare l'espressione delle proteine solubili [11,12,13,14].

L'over-espressione di sistemi di trasporto in *E. coli* però non è sempre accettata dal sistema metabolico dell'ospite ed in alcuni casi si incontrano situazioni di risposta allo stress cellulare. Un tipo di risposta incontrata spesso nei sistemi ricombinanti è l'accumulo di proteina target sotto forma di aggregati insolubili noti come corpi di inclusione. Questi aggregati proteici sono in generale mal ripiegati e quindi biologicamente inattivi [15]. *E. coli*, inoltre, non è in grado di effettuare la N-glicosilazione delle proteine espresse: ciò potrebbe costituire un

problema funzionale per i trasportatori che necessitano di tale modificazione post-trascrizionale. Nonostante questi svantaggi l'espressione eterologa in *E.coli* rimane il principale approccio sperimentale in grado non solo di fornire livelli di espressione elevati della proteina in studio, ma permette anche di effettuare studi di mutagenesi sito diretta per l'identificazione e la valutazione dell'importanza di specifici siti amminoacidici ad esempio nel processo di trasporto. In letteratura vi sono numerosi lavori che dimostrano l'over-espressione di trasportatori di membrana eucariotici in cellule batteriche, alcuni esempi sono il co-trasportatore umano Na⁺/glucosio (hSGLT1), l'espressione dei trasportatori umani OCTN1, OCTN2 e LAT1 e del trasportatore di topo OCTN3 [16,17,18,19,20].

1.8 LA CARNITINA SINTESI, OMEOSTASI E TRASPORTO

La carnitina (4-trimetilammino-3-idrossibutirrato) è una molecola idrofila che gioca un ruolo essenziale nel trasferimento di acidi grassi a catena lunga attraverso la membrana mitocondriale interna, per la loro β -ossidazione nella matrice mitocondriale. Nell'uomo è presente sia perché viene assunta direttamente attraverso la dieta sia tramite la biosintesi ed è mantenuta nei giusti livelli grazie al sistema di trasporto Na⁺-dipendente che consente il riassorbimento renale di oltre il 95% di carnitina dal filtrato glomerulare. Il fabbisogno di carnitina è di circa 80 mg/die per un adulto di 70 Kg, di cui circa 20 possono essere sintetizzati, la restante parte deve essere introdotta tramite l'alimentazione [21]. Nelle cellule animali gli enzimi coinvolti nel processo di ossidazione degli acidi grassi sono localizzati nella matrice mitocondriale. Gli acidi grassi liberi che entrano nel citosol dal sangue non possono passare direttamente nel mitocondrio attraverso le membrane mitocondriali. Per superare questo ostacolo il gruppo acilico degli acidi grassi, destinati alla β -ossidazione, viene legato transitoriamente al gruppo ossidrilico della carnitina, che si trova all'interno della cellula grazie alla presenza del trasportatore della carnitina OCTN2, da questo legame si

forma acil-carnitina, questa reazione di transesterificazione è catalizzata dall'enzima carnitina aciltransferasi I, presente sulla faccia esterna della membrana mitocondriale interna. L'estere acil-carnitina attraversa la membrana mitocondriale interna, raggiungendo la matrice mediante diffusione facilitata, favorita dal trasportatore acil-carnitina/carnitina della membrana mitocondriale interna. A questo punto il gruppo acilico viene trasferito enzimaticamente dalla carnitina al coenzima A mitocondriale per opera della carnitina aciltransferasi II, e la carnitina rientra nello spazio fra le due membrane attraverso il trasportatore acil-carnitina/carnitina [22]. La carnitina è una molecola chiave nell'ambito di diversi processi cellulari, come dimostra la sua presenza nei tessuti della maggior parte delle specie animali. Questa molecola svolge funzioni essenziali per la cellula mediate dai componenti del "sistema delle carnitine": enzimi distribuiti nel citosol ed in diversi organelli (mitocondri, perossisomi, reticolo endoplasmico) e sistemi di trasporto presenti nelle diverse membrane cellulari (plasmatica, mitocondriale, del reticolo endoplasmico e nucleare) [23]. In realtà la carnitina svolge molte altre funzioni all'interno della cellula:

- Partecipa al processo di detossificazione da metaboliti di scarto, da residui acilici tossici e farmaci.
- β - ossidazione nei perossisomi
- Il trasferimento di acetili o altri gruppi acilici a catena corta dai perossisomi ai mitocondri
- La regolazione del bilancio acilcoenzimaA-coenzimaA
- La riesterificazione del triacilglicerolo nel reticolo endoplasmico prima della secrezione sotto forma di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL)
- La stimolazione del metabolismo ossidativo del piruvato e degli aminoacidi a catena ramificata
- La sintesi e l'allungamento degli acidi grassi polinsaturi.

- Il ruolo determinante nella regolazione da parte dell'insulina della velocità del metabolismo dei grassi e del glucosio nel muscolo scheletrico. [24,25,26,27].

L'espletamento di queste funzioni richiede che la carnitina sia presente nei diversi distretti cellulari mantenendo precise concentrazioni; nei mammiferi l'omeostasi della carnitina risulta dal bilancio tra sintesi endogena, assorbimento intestinale con la dieta, distribuzione nei tessuti, escrezione e riassorbimento renale. L'omeostasi della carnitina è garantita dalla presenza di una complessa rete di enzimi e di proteine di trasporto che garantiscono l'ingresso della carnitina nel citosol, la sua distribuzione ai diversi distretti cellulari, il suo metabolismo ed efflusso [21,28]. Per tutte queste ragioni risultano di fondamentale importanza i trasportatori di carnitina in particolare quelli della membrana plasmatica dei reni e dell'intestino e quelli presenti sulle membrane degli organelli citoplasmatici come i mitocondri, reticolo endoplasmatico e perossisomi.

Il sistema mitocondriale della carnitina è costituito dalle transferasi CPT I e II e dal carrier mitocondriale della carnitina (CACT). Poiché la membrana mitocondriale interna è impermeabile al CoA e ai suoi derivati, viene utilizzata la carnitina come vettore di gruppi acilici. Sulla superficie esterna della membrana, il gruppo acilico è trasferito alla carnitina dall'enzima carnitina palmitoil transferasi I (CPT I). L'acil-carnitina attraversa la membrana mitocondriale interna per merito della traslocasi e il suo gruppo acilico è trasferito nuovamente al CoA dalla CPT II.

Il carrier mitocondriale della carnitina (CACT) è stato localizzato e ampiamente caratterizzato in diversi lavori. Esso appartiene ad una famiglia di proteine diversa da quella dei trasportatori di membrana plasmatica; catalizza uno scambio 1:1 tra acilcarnitina e carnitina, proveniente dalla matrice mitocondriale mediante CPT II. Il risultato di questo antiport è che la carnitina viene solo scambiata, mentre i gruppi acilici vengono trasportati dall'esterno all'interno dei mitocondri [25,26,29]. Questo sistema di trasporto può interagire ed essere inibito sia da

reagenti di gruppi sulfidrilici come ad esempio N-etilmaleimmide, Mersalyl e eosin 5-maleimide [30], o da farmaci come nel caso del mildronato o antibiotici β -lattamici [31,32]. A livello del reticolo endoplasmatico la carnitina permette la riesterificazione dei trigliceridi prima di essere secreti nelle VLDL (very low density lipoproteins). L'importanza del trasporto di carnitina nell'ER è collegata ai processi metabolici che richiedono gli acil-CoA citosolici. Tra gli enzimi che richiedono questi tioesteri nel reticolo endoplasmatico vanno annoverati: diacilglicerolo transferasi, orientata verso la porzione intraluminale, coinvolta nella sintesi del triacilglicerolo per la produzione delle VLDL, una aciltransferasi interna coinvolta nel metabolismo del colesterolo, una carnitina acetiltransferasi e carnitina palmitoiltransferasi interne che servono per l'acetilazione di composti intraluminali e allungamento di acidi grassi [33,34,35, 36].

L'esistenza di un sistema di trasporto per la carnitina del reticolo endoplasmatico è stata proposta sulla base di studi effettuati con microsomi intatti [37] e tramite la ricostituzione del sistema di trasporto in liposomi. Le proprietà di trasporto descritte per questo trasportatore sono diverse da quelle riguardanti il trasportatore mitocondriale, in quanto le sue caratteristiche sembrano avvicinarsi di più a quelle di un poro [26,38].

Infine è stata dimostrata la presenza di una transferasi per la carnitina responsabile del trasporto degli acil- CoA parzialmente ossidati dall'interno dei perossisomi al citosol per la conseguente ossidazione nel mitocondrio [39].

1.9 I CATIONI ORGANICI

I cationi organici sono molecole con una carica positiva a pH fisiologico. Essi comprendono una vasta gamma di composti endogeni di importanza fisiologica, tra cui i neurotrasmettitori monoamminici, colina, coenzimi e numerosi farmaci come vecuronio, cimetidina [40].

Questi fanno parte della categoria delle ammine primarie, secondarie, terziarie o quaternarie, che a pH fisiologico hanno carica netta sull'atomo di azoto. In base alla loro struttura tali cationi sono suddivisi in: composti monovalenti e relativamente piccoli ($PM < 400$), detti di "tipo I", tra cui il tetraetilammonio (TEA), e composti polivalenti di grandi dimensioni ($PM > 500$), detti di "tipo II" [41]. L'assorbimento a livello intestinale, la distribuzione e la secrezione biliare, intestinale e renale dei cationi organici avvengono ad opera di trasportatori di membrana. I cationi organici, difatti, non possono attraversare la membrana cellulare liberamente. Piccoli cationi organici possono essere trasportati da diversi canali ionici, anche se il loro contributo non è stato ancora chiarito. E' stato dimostrato che i cationi organici sono attivamente secreti dal sangue nelle urine attraverso le cellule epiteliali del tubulo renale, per mezzo di sistemi di trasporto specifici e multipli presenti sia sulla membrana basolaterale che apicale [40,42].

I trasportatori di cationi organici mediano la detossificazione di tessuti come reni, intestino, fegato e placenta mediante meccanismi dipendenti o indipendenti da gradienti di sodio, di pH e di potenziali di membrana. Sono importanti nell'assorbimento e nella secrezione di farmaci cationici, come cimetidina e metformina, delle sostanze xenobiotiche, come TEA e 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+), e dei cationi organici endogeni, come monoammine, neurotrasmettitori e creatina [40].

1.10 LA FAMIGLIA DEI TRASPORTATORI SCL22

Diversi trasportatori in grado di traslocare cationi organici sono stati caratterizzati funzionalmente e poi identificati con tecniche di biologia molecolare. Essi possono essere suddivisi in oligospecifici, che traslocano un singolo substrato principale e composti con una struttura molto simile a quella del substrato principale, e polispecifici, che traslocano substrati

strutturalmente diversi. A quest'ultimo gruppo appartiene la grande famiglia dei trasportatori di soluti SLC22A.

La famiglia comprende trasportatori di membrana plasmatica che catalizzano un trasporto elettrogenico di cationi organici (OCTs), trasportatori che catalizzano un trasporto elettroneutro di cationi organici e zwitterioni (OCTNs) e anche un nutrito gruppo di trasportatori coinvolti nel trasporto di anioni organici (OATs e il trasportatore di urato URAT1) [43]. Questa famiglia comprende sistemi di uniporto, antiporto e simporto presenti nei batteri, negli eucarioti, nelle piante e nei mammiferi. Gran parte dei trasportatori appartenenti a questa famiglia sono polispecifici, ovvero sono in grado di trasportare differenti substrati. Molti di questi trasportatori sono espressi nell'intestino, fegato e reni, in quanto i trasportatori appartenenti a questa famiglia giocano un ruolo fondamentale nell'assorbimento e nell'escrezione dei farmaci [44]. Il trasporto di cationi organici mediante uno qualsiasi dei tre sottotipi di OCT è: elettrogenico, indipendente da Na⁺, e reversibile rispetto alla direzione. La forza motrice è fornita unicamente dal gradiente elettrochimico del catione organico trasportato. OCTN1-3 e hCT2 possono funzionare sia come antiporter H⁺/catione organico (ad esempio, OCTN1), oppure come uniporter per cationi organici o cotrasportatori Na⁺/carnitina (per esempio, OCTN2). I trasportatori di anioni organici OAT1-5 e il trasportatore umano di urato URAT1 sono in grado di traslocare anioni in entrambe le direzioni e alcuni di essi (OAT1, OAT3 e URAT1) mediano lo scambio con anioni organici divalenti. I substrati endogeni includono neurotrasmettitori monoamine, colina, L-carnitina, α -ketoglutarato, cAMP, cGMP, prostaglandine e urato. La famiglia SLC22 appartiene alla superfamiglia MFS (the major facilitator superfamily). Da un punto di vista filogenetico, gli OCT, gli OAT e gli OCTN si sono formati dopo la divergenza tra vertebrati e invertebrati. Dal momento che la maggior parte dei trasportatori SLC22 sono polispecifici, numerosi ligandi possono agire come inibitori. Essi sono localizzati sia nella membrana basolaterale che

apicale di cellule polarizzate. I loro livelli di espressione sono modulati da citochine, ormoni, fattori di crescita, segnali extracellulari e cambiamenti di stato metabolico della cellula [44,45,46,47].

Tutti i trasportatori della famiglia SLC22 hanno una topologia simile: contengono 12 domini transmembrana (TMDs) ad α -elica, un grande anello extracellulare tra i TMDs 1 e 2, che porta da 2 a 6 potenziali siti di N-glicosilazione (NXS/T), un'ampia ansa intracellulare tra i TMDs 6 e 7 con sequenze consenso per la fosforilazione (S/T-X-R/K) ed estremità N-terminali e C-terminali intracellulari [44].

1.11 LA FAMIGLIA OCTN

I sistemi di trasporto di membrana plasmatica per la carnitina e per i derivati della carnitina appartengono alla famiglia degli OCTN (SLC22A). Sono state identificate, finora, tre isoforme appartenenti a questa famiglia, note come OCTN1, OCTN2 ed OCTN3 [47,48,49].

Questi trasportatori sono fisiologicamente essenziali per mantenere le concentrazioni sistemiche e tissutali appropriate di carnitina, regolandone il suo trasporto durante l'assorbimento intestinale, la distribuzione tissutale e il riassorbimento renale. Ogni isoforma di OCTN è responsabile dello svolgimento di una specifica funzione, come suggerisce la diversa localizzazione che hanno nei tessuti. Metodi immunocistochimici hanno rivelato che OCTN1 e 2 sono massimamente espressi nel rene, OCTN3 è soprattutto espresso a livello testicolare [49]. Più precisamente gli OCTNs costituiscono una "sotto" famiglia della famiglia dei trasportatori di membrana SLC22, che a sua volta appartiene alla superfamiglia dei trasportatori MFS (major facilitator superfamily), nella quale sono stati identificati più di 1000 membri. I membri della sottofamiglia OCTN condividono differenti porzioni della loro struttura, le sequenze amminoacidiche mostrano infatti ben il 66% di affinità. Gran parte delle similarità riguardano i 12 segmenti transmembrana, mentre la porzione C-terminale e il loop

idrofilico intracellulare risultano essere molto differenti. In particolare i segmenti transmembrana mostrano un grado medio di identità pari al 68%, il valore massimo di affinità si ottiene a livello del primo segmento transmembrana (86%), mentre il valore più basso di identità è presente nel terzo segmento transmembrana. Il grande loop extracellulare presenta un'identità di sequenza pari al 71%, mentre il loop intracellulare presenta un'identità del 50%. La porzione C-terminale mostra invece un'identità pari al 16%. Questi dati fanno ipotizzare che la specificità dei trasportatori è legata principalmente ai loop intracellulare ed extracellulare, alla porzione C-terminale, ed ai segmenti transmembrana 3, 7, 8, e 9. Il loop extracellulare presenta inoltre quattro residui amminoacidici di Cisteina, questi residui possono essere bersaglio di reagenti dei gruppi sulfidrilici [50]. Finora, studi funzionali sui sistemi di trasporto OCTN sono stati realizzati in vescicole di brush border, in sistemi cellulari che over-esprimono la proteina nel sistema di membrane artificiali dei proteoliposomi [18,51,52].

hOCTN1 è fortemente espresso a livello dei reni, trachea, midollo osseo, fegato, placenta, prostata, polmoni e neuroni. Esso trasporta tetraetilammonio (TEA) in maniera pH-dipendente. Questo fa pensare che hOCTN1 funzioni come un antiporter H^+ /catione organico. Ulteriori studi, inoltre, suggeriscono che il trasporto di TEA mediato da hOCTN1 è bidirezionale e non è influenzato dal potenziale di membrana o dal Na^+ . hOCTN1 può anche trasportare L-carnitina in maniera Na^+ -dipendente, ergotioneina e acetilcolina [53,54].

hOCTN2 è espresso nei reni, muscolo scheletrico, cuore e placenta. Questo trasportatore media un trasporto Na^+ -dipendente di carnitina. hOCTN2 è localizzato sulla membrana apicale delle cellule tubulari renali epiteliali. Esso è importante per il riassorbimento di L-carnitina in seguito a filtrazione glomerulare. OCTN2 è stato anche identificato in cellule epiteliali intestinali umane. Questa proteina trasporta carnitina in modo Na^+ -dipendente e cationi organici in modo Na^+ -indipendente, quindi, da un lato, funziona come un co-trasportatore di Na^+ e carnitina e dall'altro come trasportatore Na^+ -indipendente di cationi

organici. Una terza isoforma di OCTN, OCTN3, è stata identificata nel topo. I dati presenti in letteratura rispetto ad OCTN3 riguardano principalmente l'isoforma murina che sarebbe responsabile del trasporto Na^+ indipendente di carnitina, principalmente nei testicoli. Per quanto riguarda l'isoforma umana non è stato ancora identificato il cDNA ma l'espressione della proteina è stata verificata nello sperma[49].

In conclusione, OCTN1 e OCTN2 sembrano essere più rilevanti di OCTN3 per il trasporto quantitativo di cationi organici nel fegato e nei reni. Tuttavia, OCTN3 è il trasportatore più selettivo della carnitina, mentre OCTN1 è il meno specifico. Tutte e tre gli OCTN sono, comunque, in grado di trasportare carnitina e la loro più importante funzione fisiologica potrebbe essere il coinvolgimento nel mantenimento della sua omeostasi. Ciò è dimostrato dal fatto che difetti congeniti o acquisiti degli OCTN portano a carenza primaria o secondaria di carnitina sistemica.

1.12 IL SISTEMA DI TRASPORTO DI MEMBRANA PLASMATICA OCTN1

La proteina integrale di membrana SLC22A4 (OCTN1) è codificata dal gene umano *slc22a4*, localizzato nel cluster dei geni delle citochine, in posizione 5q31. La forma umana di SLC22A4 (hOCTN1) è composta da 553 amminoacidi. Presenta undici domini transmembrana, quattro siti di N-glicosilazione e cinque siti di fosforilazione per le proteine chinasi C. La sua struttura comprende un sito legante nucleotidi ed un altro sito tipico delle proteine trasportatrici degli zuccheri. Si pensa che il sito legante i nucleotidi, in base alla presunta localizzazione dei siti di N-glicosilazione, si trovi sulla porzione extracellulare tra i domini transmembrana tre e quattro [47]. OCTN1 è una proteina ubiquitaria, risulta fortemente espressa nell'epitelio renale, e a livelli più bassi nella trachea, ossa, fegato, muscolo scheletrico, prostata, pancreas, intestino, placenta, cuore, utero e neuroni [47,48,49]. La sua presenza è stata, inoltre, osservata in diverse linee cellulari cancerose umane tra cui

carcinoma polmonare A459, carcinoma colon-rettale SW 480, leucemia mieloide K-562 e le cellule HeLa S3 [55].

OCTN1 trasporta TEA (tetraetilammonio), che è un prototipo di catione organico, acetilcolina, ergotioneina e carnitina. Le Km misurate indicano che il trasportatore ha un'affinità maggiore per il TEA ed acetilcolina piuttosto che per la carnitina. Inoltre, la carnitina è trasportata con una minore efficienza rispetto al TEA [47]. La velocità iniziale calcolata per la carnitina è pari a 0.33 nmoli/min per mg di proteina, che è 8 volte inferiore rispetto alla velocità di trasporto calcolata per il TEA.

Il trasporto di carnitina catalizzato da OCTN1 è Na⁺-dipendente, mentre quello del TEA, che ha una carica netta positiva, è Na⁺-indipendente [51]. Più recentemente è stato dimostrato come OCTN1 sia in grado di trasportare ergotioneina, un antiossidante presente nelle piante e nei funghi e che raggiunge alte concentrazioni nel midollo osseo e negli eritrociti; per questo è stato ipotizzato che l'ergotioneina può proteggere eritrociti e monoliti dal danno ossidativo. Il ruolo di questo trasportatore potrebbe essere quello di consentire l'assorbimento di ergotioneina, assunto con la dieta [56,57].

Molto recentemente hOCTN1 è stato overespresso in *E. coli* e riscostituito in proteoliposomi [51], ed è stato evidenziato come catalizzi il trasporto bidirezionale di acetilcolina e la sua correlazione nel sistema non neuronale colinergico [54,58]. E' infatti noto che sia le cellule epiteliali (pelle, vie respiratorie, intestino) che le cellule del sistema immunitario (linfociti) esprimono tutti i componenti del sistema colinergico indipendentemente da innervazioni neuronali. In questi tessuti, l'acetilcolina non si comporta come neurotrasmettitore, ma è coinvolto nella regolazione delle funzioni cellulari di base quali ad esempio la proliferazione, la differenziazione, l'organizzazione del citoscheletro, rilascio locale di mediatori chimici (NO e citochine proinfiammatorie) [50,59,60].

OCTN1 mostra alti livelli di espressione in tali tessuti per cui è ipotizzabile che abbia un ruolo nella distribuzione dell'acetilcolina in queste sedi catalizzando il rilascio dell'acetilcolina neosintetizzata dalle cellule per attivare il recettore in modo sia autocrino che paracrino; una volta rilasciata essa andrà ad interagisce con recettori nicotinici e muscarinici espressi in diversi tessuti non neuronali.

Il Na^+ regola in maniera asimmetrica il trasporto di acetilcolina e compete con essa per il sito di legame al substrato. La K_m per l'acetilcolina è pari a 1 mM e la K_i per l' Na^+ è 1.2 mM. L'efflusso non è inibito dal Na^+ esterno, poiché l'acetilcolina interagisce con un sito di legame diverso: difatti, il sito di legame del substrato interno non interagisce con i cationi inorganici con la stessa efficienza di quello esterno, quindi gli ioni interni non competono con l'acetilcolina durante l'efflusso. Il K^+ , invece, stimola sia l'efflusso che l'uptake di acetilcolina e ciò fa pensare che interagisce con un sito di legame diverso da quello per l'acetilcolina, come del resto fa l'ATP.

In vitro, hOCTN1 promuove sia l'efflusso che l'uptake di acetilcolina, ma *in vivo*, dato che la concentrazione fisiologica del Na^+ esterno è superiore a 50 mM esso catalizza solo l'efflusso di acetilcolina. Comunque, l'uptake di acetilcolina ad opera di hOCTN1 non può essere escluso in quei tessuti in cui la concentrazione esterna di acetilcolina è talmente alta da spiazzare il Na^+ . Questo è possibile, ad esempio, nei tessuti neuronali, dove l'acetilcolina rilasciata per esocitosi dalle vescicole può raggiungere una concentrazione esterna di 0.5 M, più alta di quella del Na^+ . In questo contesto, il riassorbimento di acetilcolina ad opera di hOCTN1 può avere la funzione di modulare l'interazione recettore-ligando e dovrebbe essere ancora più importante in quei distretti cellulari in cui manca l'enzima di degradazione colinesterasi. Il trasporto catalizzato da hOCTN1 dipende dall'ATP intracellulare, che attua una regolazione allosterica, stimolando l'attività di trasporto. L'effetto non è dovuto alla fosforilazione della proteina né si tratta di un trasporto attivo primario attivato dall'idrolisi

dell'ATP, dato che l'ANTP (analogo non idrolizzabile dell'ATP) ha lo stesso effetto. Infine risulta evidente che hOCTN1 è fortemente inibito da reagenti dei gruppi SH, come il Mersalyl, p-OHMB e MTSES, e da reagenti dei gruppi amminici, come il PLP [54].

Il ruolo di hOCTN1 nel sistema colinergico nonneuronal apre nuove prospettive nella progettazione di specifiche terapie per patologie causate da alterazioni del metabolismo dell'acetilcolina. Nel cuore, OCTN1 può influenzare l'assorbimento e l'eliminazione dei farmaci che giocano un potenziale ruolo nella modulazione della funzione valvolare, e la generazione di acetilcolina da parte dell'innervazione parasimpatica del cuore. Infine è stata descritta una regolazione ormonale a lungo termine di OCTN1, ad esempio il testosterone è in grado di regolare l'espressione apicale di OCTN1 [50].

La trascrizione del gene SLC22A4, che codifica per hOCTN1 è inibita dalla trascrizione del fattore RUNX1 che si lega ad una sequenza consenso nel primo introne del gene SLC22A4. RUNX1 è espresso principalmente nelle cellule ematopoietiche e ha sia la funzione di attivare la trascrizione che di reprimerla, attraverso l'interazione con dei cofattori. La stimolazione di colture cellulari, in cui veniva fatto esprimere il gene hOCTN1, con il TNF α determinava un decremento dei livelli di mRNA di SLC22A4 [61].

1.13 IL SISTEMA DI TRASPORTO DI MEMBRANA PLASMATICA OCTN2

Il trasportatore OCTN2 è stato identificato per la prima volta in cellule HEK293 trasfettate con il cDNA umano codificante per OCTN2 [48]. Il gene che codifica per OCTN2 (SLC22A5) è localizzato sul cromosoma 5q31, è costituito da 10 esoni, da cui origina un trascritto di 3.5 Kb a cui corrisponde un prodotto proteico costituito da 557 amminoacidi. Il trascritto primario codificante per OCTN2 può subire splicing alternativo. La trascrizione del gene SLC22A5 produce 10 differenti mRNA, 8 varianti spliccate e 2 non spliccate, ad esempio è stata scoperta una variante di OCTN2 contenente un'inserzione di 24 amminoacidi in seguito a

splicing alternativo, tale forma (OCTN2VT) è localizzata nell'ER e sembra essere implicata nel trasporto di carnitina in tale compartimento [48,62]. L'espressione di OCTN2 è stata valutata in differenti tessuti mediante northern blotting, ibridizzazione in situ, western blotting e real time PCR quantitativa. OCTN2 è espresso nell'uomo in vari tessuti: nel cuore, in particolare a livello delle valvole cardiache e del miocardio, nel muscolo scheletrico, nel fegato, nel glomerulo, nei tubuli prossimali e distali dei reni, nella placenta, nell'intestino e anche in alcune aree del cervello come l'ippocampo e la corteccia.

OCTN2 condivide il 75,8% di omologia con OCTN1 e presenta 12 domini transmembrana, come risultato dallo studio del suo profilo idropatico. Di questi 12 segmenti transmembrana gli ultimi due, compresi tra il residuo in posizione 450 e l'estremità carbossiterminale, sembrano essere determinanti per il riconoscimento e il trasporto di carnitina mentre i cationi organici interagiscono con siti differenti. Il loop posto tra le α -eliche 10 e 11 possiede 5 residui di tirosina che sembrano essere il punto di interazione degli ioni Na^+ . Questa ipotesi è stata confermata da studi di mutagenesi sito diretta che hanno dimostrato che due mutazioni naturali E452K e Y449D riducono il trasporto di carnitina e diminuiscono l'attività stimolatrice del sodio nel trasporto della stessa. Ulteriori studi sulla struttura hanno evidenziato inoltre la presenza di tre siti di N-glicosilazione, di sei siti di fosforilazione per la proteina chinasi C, una firma molecolare di omologia a proteine di trasporto di zuccheri ed un dominio di legame ATP/GTP [49,63,64,65]. OCTN2 è un trasportatore di carnitina Na^+ -dipendente anche se è in grado di trasportare altri cationi organici come potassio, rubidio, cesio o colina in maniera Na^+ - indipendente. OCTN2 presenta un'alta affinità per la carnitina, con valori di K_m compresi tra 8 e 87 μM . I valori di V_{\max} mostrano una fluttuazione maggiore rispetto ai valori di K_m e ciò può essere dovuto ai diversi livelli d'espressione e alla diversa quantità di proteina correttamente foldata e inserita in membrana. Sia le variazioni dei valori di K_m che di V_{\max} possono essere dovuti all'interferenza da parte di altri sistemi di trasporto che

possono trasportare carnitina o al metabolismo intracellulare che converte la carnitina nei suoi derivati. Sono stati individuati altri substrati trasportati da OCTN2 come acetil-carnitina e TEA, anche se con un'affinità minore rispetto a quella per la carnitina. I valori di K_m per il TEA hanno un range compreso tra 0.3 e 74mM. Ciò è essenzialmente dovuto alla presenza di due K_m per il TEA, che indicano la presenza di un sito ad alta e di un sito a minore affinità di OCTN2 per questo substrato. Sulla base di studi di inibizione reciproci tra carnitina e TEA, è stato suggerito che entrambi i composti si legano allo stesso sito o in siti diversi che, in ogni caso, sono molto vicini. Per quanto riguarda la modalità di trasporto catalizzato da OCTN2, gli studi in sistemi cellulari hanno riportato una stretta dipendenza del trasportatore dal Na^+ . Valori di K_m da 0.4 a 18.5 mM sono stati riportati per il Na^+ a seconda delle condizioni sperimentali. Dunque, OCTN2 dovrebbe funzionare come un cotrasportatore Na^+ /carnitina [63,28]. In sistemi cellulari è stato mostrato che OCTN2 catalizza un co-trasporto di Na^+ , trans- stimolato dal precarico delle cellule con il TEA. Le stesse osservazioni sono state condotte in vescicole di brush- border isolate e poi nel sistema ricostituito dei liposomi [38]. La modalità di trasporto è un antiporto esterno di carnitina e Na^+ extraliposomiali, cioè extracellulari, e carnitina interna o altri substrati: questo spiega la trans-stimolazione precedentemente descritta in cellule e brush border.

I requisiti chimici che deve avere una molecola per poter essere traslocata o per interagire con OCTN2 sono stati definiti testando il trasporto e l'efficienza d'inibizione di diversi composti. Le proprietà più evidenti sono: (1) la presenza di un gruppo carbossilico (ad esempio, la colina non viene trasportata); (2) la presenza, sul lato opposto della molecola, di un gruppo amminico tri-sostituito (la dimetilglicina che manca di un gruppo N-metil interagisce e inibisce il trasportatore, ma non viene traslocata); (3) la distanza tra i due gruppi essenziali dovrebbe essere inferiore a cinque atomi di carbonio. Il pH ottimale (pH 6), differente da quello riportato in sistemi cellulari, si correla bene con il contesto fisiologico. Il valore di K_m

esterno trovato nel sistema ricostituito è 80 μM , quindi entro il range di K_m trovato nelle cellule, e la K_m per la carnitina sul lato interno del trasportatore è 1.2 mM. La differenza indica che il trasportatore è funzionalmente asimmetrico, il che corrisponde con l'unilateralità della regolazione da Na^+ e l'asimmetria strutturale della proteina OCTN2. E' interessante notare che il trasportatore ricostituito è inibito da reagenti dei gruppi SH, aggiunti sul lato esterno della membrana liposomiale, come MTSES, MTSET e p-CMBS, mentre non è inibito da reagenti idrofobici. La reazione chimica che porta all'inattivazione della funzione può essere spiegata con l'esposizione di residui di Cys verso il lato extraliposomiale. Infatti vi sono 4 residui di Cys presenti nella porzione idrofilica della proteina OCTN2 [38].

Recentemente è stato clonato, a partire dal cDNA di fibroblasti della pelle, e over-espresso il trasportatore OCTN2 umano [19]. Il trasportatore OCTN2 inoltre è molto importante sia da un punto di vista farmacologico che tossicologico, infatti, molti cationi organici ed esteri della carnitina utilizzati come farmaci per il trattamento di molte malattie, sono trasportati da OCTN2, esempio sono il verapamil, la pirlamina, la chinidina, le cefalosporine, lo spironolattone e il mildronato. Il mildronato ha una struttura strettamente correlata a quella della carnitina, il substrato fisiologico del trasportatore. Esso agisce come inibitore competitivo. E' un substrato eccellente di OCTN2 e l'efficienza del trasporto è ancora superiore a quella della carnitina [66]. E' stata inoltre dimostrata l'interazione di questo trasportatore con l'omeprazolo. Tale interazione avviene solo dopo attivazione acida, attraverso un duplice meccanismo d'azione. Nel caso del primo meccanismo d'azione l'omeprazolo interagisce covalentemente con i residui di Cys extracellulari di OCTN2, determinando una forte inibizione della sua funzione di trasporto con un meccanismo non competitivo. Il legame della carnitina al sito attivo favorisce la reazione del trasportatore con l'omeprazolo. Probabilmente, tale legame induce variazioni conformazionali che espongono i gruppi SH per la reazione con il farmaco. Per quanto riguarda il secondo meccanismo d'azione,

l'omeprazolo inibisce il trasportatore attraverso un'interazione non covalente con il sito di legame del substrato (inibizione competitiva). L'affinità del trasportatore per l'omeprazolo è paragonabile a quello per il substrato fisiologico. Ciò può essere dovuto alla presenza di un sito di legame per il substrato che ha dimensioni maggiori rispetto a quelle della carnitina [67,68]. Non sono molte le informazioni che si hanno riguardo la regolazione dell'espressione di questo trasportatore, i dati presenti in letteratura sembrano dimostrare che la sua espressione è influenzata da proteine che presentano domini PDZ. E' stato dimostrato che i quattro amminoacidi all'estremità N-terminale di OCTN2 legano il dominio PDZ di PDZK1, che è localizzato sulla membrana dei brush border. Poiché si è visto che l'uptake della carnitina aumentava quando PDZK1 veniva co-espresso con OCTN2, ma la concentrazione del trasportatore nella membrana plasmatica non cambiava, si è dedotto che PDZK1 poteva essere coinvolto nella regolazione di OCTN2 [69]. PPAR- α , infine, sembra essere correlato ad un aumento dell'espressione di OCTN2 nel fegato, muscolo scheletrico ed enterociti; il clofibrato, infatti, agonista di PPAR- α , induce un aumento della concentrazione di carnitina in tali tessuti [70].

1.14 OCTNs E PATOLOGIE NELL'UOMO

I membri della famiglia degli OCTN giocano un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi nell'organismo, per questo motivo difetti di queste proteine sono associati con diverse patologie, in particolare molte di queste patologie sono dovute a disordini nell'omeostasi della carnitina (deficienza primaria di carnitina PCD), infiammazioni croniche dell'intestino (Morbo di Chron), diabete, Alzheimer e cancro [50].

La deficienza primaria di carnitina (PCD) è una patologia autosomica recessiva dovuta ad un difetto del trasportatore OCTN2, a differenza della forma secondaria che invece è dovuta ad

alterazioni della carnitina palmitoiltransferasi 2 o del trasportatore CACT. Sono state identificate più di 100 mutazioni coinvolte nell'insorgenza di questa patologia.

Alcuni esempi sono la mutazione R282X presente in pazienti eterozigoti, e Y401X e Y458X, presenti in condizione di omozigosi. Queste tre mutazioni causano tutte una diminuzione del mRNA maturo di OCTN2 e come risultato si ha la sintesi di un trasportatore non funzionante.

Infine molto di recente sono state individuate altre mutazioni presenti in pazienti europei affetti da deficienza primaria di carnitina che aboliscono completamente il trasporto di carnitina: R169W, G242V in pazienti omozigoti, e W351R in pazienti eterozigoti [71,72].

Poiché PPAR- α regola positivamente l'espressione di OCTN2, i suoi agonisti potrebbero essere potenziali candidati per il trattamento di quelle forme di PCD caratterizzate da ridotta espressione di OCTN2 [50]. Carenza di carnitina e alterazioni del suo metabolismo sono state recentemente collegate anche a diabete mellito e obesità, la carnitina infatti gioca un ruolo fondamentale nel trasporto dei gruppi acilici dalla matrice mitocondriale e il citosol, sia nel fegato che in altri tessuti, provocando un aumento del metabolismo del glucosio [50].

Diverse mutazioni dei geni SLC22A4 e SLC22A5 (cioè OCTN1 e OCTN2, rispettivamente) sono coinvolte nell'insorgenza di patologie infiammatorie croniche dell'intestino, come ad esempio il morbo di Chron. Una mutazione nel gene SLC22A5 che si trova nella regione del promotore (trasversione 270G \rightarrow C) causa la completa compromissione del trasporto di carnitina. Come visto nel caso della deficienza primaria di carnitina il cattivo funzionamento del trasportatore della carnitina causa il suo accumulo nel sangue e disordini dei processi di β -ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri, nel caso del morbo di Crohn quello che è stato visto è che questa inibizione dei processi di ossidazione degli acidi grassi a livello della mucosa gastrointestinale, e in particolare nel colon, è associata ai processi ulcerativi e infiammatori che sono le maggiori manifestazioni cliniche presenti in questi pazienti. Inoltre

recentemente è stato visto come la somministrazione di carnitina a pazienti affetti da morbo di Crohn presentava effetti benefici [73].

Per quanto riguarda il gene SLC22A4 che codifica per OCTN1, è stata identificata una mutazione data dalla sostituzione di una leucina in fenilalanina in posizione 503 (L503F) associata al morbo di Crohn [74]. Il meccanismo alla base di questo fenotipo non è tuttora chiaro, ma si pensa che difetti nel trasporto di acetilcolina possano essere strettamente correlati con la patologia, l'acetilcolina ha infatti un'azione antinfiammatoria sia in cellule neuronali che non neuronali, risulta quindi molto interessante che la sostituzione L503F in hOCTN1 provoca una grave compromissione nel rilascio di acetilcolina [54,58].

Il cervello è l'organo metabolicamente più attivo dell'intero organismo, una delle caratteristiche del processo di invecchiamento è il decadimento della funzione mitocondriale, con conseguente compromissione della produzione di energia, danno cellulare, e morte. Il declino della funzione cerebrale è tipico di malattie neurologiche, come il morbo di Alzheimer e di Parkinson. In questo scenario, ogni intervento metabolico che potrebbe migliorare la funzione mitocondriale e la produzione di ATP possono avere una grande importanza. Carnitina e acilcarnitina entrando nelle cellule tramite OCTN2 o OCTN1, possono avere effetti benefici, come ad esempio la stimolazione del ciclo di Krebs e l'aumento della produzione di ATP [50]. Infine recentemente è stata osservata down-regulation dell'espressione di OCTN2 in diverse linee tumorali [75], e un collegamento fra OCTN1 e cancro [76], è stato visto infatti che OCTN1 viene overespresso nei tessuti tumorali, ed è coinvolto nell'uptake di farmaci antitumorali [77].

1.15 REAGENTI MERCURIALI

La tossicità del mercurio è un argomento di crescente interesse e restano ancora molti gli aspetti da chiarire riguardo ai meccanismi con cui il mercurio interagisce ed interferisce con i

processi biochimici. Studi recenti hanno dimostrato che l'esposizione al mercurio, così come ad altri metalli pesanti, potrebbe essere all'origine di diverse malattie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer, sclerosi multipla e sclerosi laterale amiotrofica; è stato inoltre individuato un possibile ruolo del thimerosal contenente etilmercurio nell'eziologia di disturbi dello sviluppo neurologico, quali l'autismo [78].

Il mercurio è presente naturalmente nell'ambiente ed esiste in diverse forme. Queste forme possono essere organizzati in due categorie: mercurio inorganico, che comprende il mercurio metallico elementare (Hg^0) e i suoi due stati di ossidazione, il catione mercurioso ($\text{Hg}-\text{Hg}^{++}$) ed il catione mercurico (Hg^{++}), e il mercurio organico [79].

Il mercurio elementare (Hg^0) non viene assorbito per ingestione ma viene introdotto nel corpo per inalazione, viene usato nei termometri e in diverse applicazioni domestiche e industriali, è volatile a temperatura ambiente, e forma un gas monoatomico che viene assorbito dai polmoni. Una volta assorbito questa forma di mercurio è liposolubile ed è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e la placenta dove viene ossidato a mercurio inorganico (Hg^{2+}) generalmente nella forma di catione mercurico e si accumula nel cervello dove rimane per anni [78]. Il processo di ossidazione del mercurio sembra coinvolgere le catalasi, l'atomo di mercurio infatti risulta capace di penetrare nel sito attivo della proteina che è già in possesso di una molecola di perossido di idrogeno, la risultante reazione trasferisce due elettroni dall'atomi di mercurio a quello di ossigeno [79]. Quando il mercurio si combina con elementi come il cloro, lo zolfo o l'ossigeno siamo in presenza di composti organici del mercurio. Questi composti di mercurio sono anche chiamati sali di mercurio. Normalmente i composti organici di mercurio sono polveri bianche o cristalli, eccetto il solfuro mercurico (noto anche come cinabro) che è rosso e diventa nero dopo l'esposizione alla luce [80]. Il mercurio inorganico (Hg^{2+}) si trova in diversi cosmetici e prodotti per la casa, ed è molto utilizzato nell'industria. Viene assorbito per ingestione o attraverso contatto con la

cute e difficilmente attraversa la barriera ematoencefalica. La maggior parte del mercurio organico viene escreta con le urine ma in molti casi tende ad accumularsi nei reni [78], in particolare è stato visto come il cloruro di mercurio (HgCl_2) tenda ad accumularsi nei reni anche per periodi molto lunghi causando danno renale cronico. In molti casi però è stato visto come il HgCl_2 abbia effetti neurotossici molto simili a quelli causati da una lunga esposizione al metilmercurio, il cloruro di mercurio infatti possiede la capacità di inibire le proteine di membrana grazie alla sua affinità per i gruppi sulfidrilici, ad esempio è stata vista come l'esposizione a cloruro di mercurio sia in grado di inibire il trasporto di glutammato negli astrociti, inoltre le dimensioni ridotte del HgCl_2 molto simili a quelle degli ioni Na^+ e Ca^+ suggeriscono come questo composto possa interferire e interagire con i canali ionici [81].

Quando il mercurio si combina con il carbonio, i composti che si vengono a formare prendono il nome di composti organici del mercurio. Da un punto di vista tossicologico si distinguono due classi di composti: quelli che degradano rapidamente il mercurio inorganico nel corpo, come il fenile di mercurio, e quelli che sono relativamente stabili, questi ultimi consistono di catene alchiliche brevi come i composti mercuriali etilici e metilici. Tuttavia, la più comune forma di mercurio organico presente nell'ambiente è il metilmercurio (noto anche come monometilmercurio), esso deriva dalla metilazione delle forme di mercurio inorganico da parte di microrganismi presenti nel suolo e nell'acqua. Nel sangue è accumulato preferenzialmente negli eritrociti dove lega l'emoglobina e la sua concentrazione è circa 20 volte superiore a quella del plasma. Del MeHg presente nel plasma l'1% circa è complessato con la cisteina, il resto è legato all'albumina. È assorbito efficacemente nel tratto gastrointestinale, giunge nel sangue e si distribuisce nei tessuti, attraversa facilmente la barriera ematoencefalica [80]. Il metilmercurio viene eliminato dal corpo principalmente tramite le feci, ma come nel caso del mercurio inorganico, esso viene secreto nella bile. Una frazione del mercurio biliare è riassorbita nella cistifellea e del tratto gastrointestinale,

creando così un ciclo enteroepatico. La capacità del MeHg di distribuirsi in tutto il corpo è spesso attribuita alla sua presunta liposolubilità. Tuttavia questa spiegazione è insostenibile date le caratteristiche chimico-fisiche del MeHg. Quest'ultimo sembra dimostrare un'elevata affinità per i gruppi –SH, infatti la maggior parte del MeHg nei tessuti è normalmente coniugato con molecole solubili in acqua contenenti gruppi sulfidrilici principalmente cisteina, glutatione (GSH), albumina, emoglobina e altri polipeptidi contenenti tioli [79].

1.16 INTERAZIONE DEI COMPOSTI MERCURIALI CON LE PROTEINE DI MEMBRANA

Un cospicuo gruppo di sostanze con potenziali effetti sugli organismi animali, incluso l'uomo, può essere identificato in base alla capacità di reagire con i gruppi tiolici (SH) delle proteine. Tali gruppi sono contenuti in quasi tutte le proteine animali come residui di Cys. I composti xenobiotici che interagiscono con i gruppi SH, risultano essere, pertanto, di notevole interesse per la salute umana. Tale interesse è ulteriormente aumentato dalla scoperta che il numero di residui di Cys nelle proteine aumenta nel corso dell'evoluzione; ciò significa che le proteine degli organismi superiori contengono un numero maggiore di Cys rispetto alle proteine omologhe di organismi meno evoluti [82]. Questo comporta che gli xenobiotici, che reagiscono con i gruppi SH, interagiranno più efficientemente con i mammiferi rispetto agli organismi di specie meno evolute, e i loro effetti saranno, pertanto, molto rilevanti per la salute dell'uomo [83].

La capacità del MeHg di distribuirsi in tutto il corpo è spesso attribuita alla sua presunta liposolubilità e alla sua affinità per i gruppi –SH, infatti la maggior parte del MeHg nei tessuti è normalmente coniugato a molecole contenenti gruppi sulfidrilici solubili in acqua, principalmente cisteina (Cys), glutatione (GSH), albumina, emoglobina, omocisteina (Hcy), N-acetilcisteina (NAC), metallothionein (MT). Diversi studi hanno dimostrato che gli ioni di

mercurio sono in grado di legarsi in maniera covalente a molecole contenenti gruppi tiolici, questi coniugati sembrano essere stabili a pH compresi fra 1 e 14 [84]. La costante di affinità del mercurio per i gruppi tiolici si aggira infatti intorno all'ordine di 10^{15} - 10^{20} , mentre ad esempio l'affinità del mercurio per l'ossigeno è di circa dieci ordini di grandezza inferiore [85].

Numerosi studi negli ultimi 20 anni hanno ipotizzato l'implicazione di qualche forma di "mimetismo molecolare" nell'uptake di questi coniugati del mercurio o degli ioni di mercurio organici ed inorganici. Si parla di "mimetismo molecolare" quando i metalli si legano ai siti nucleofili di molecole biologiche formando complessi in grado di "mimare" strutturalmente e funzionalmente i substrati endogeni che normalmente si legano a proteine di trasporto, canali ed enzimi. Il motivo per cui si presume che gli ioni mercurio siano implicati in questo meccanismo di mimetismo molecolare sta nel fatto che alcuni dei coniugati costituiti da mercurio e gruppi tiolici non proteici, quali ad esempio Hcy o GSH, sono strutturalmente simili a composti endogeni come cistina, omocistina, glutatione disolfuro (GSSG) o metionina. Di conseguenza si crede che queste specie del mercurio siano in grado di entrare dentro le cellule sfruttando il "mimetismo molecolare" di questi composti, e legandosi ai siti delle proteine di trasporto [85]. In alcuni studi è stato infatti dimostrato come gli effetti neurotossici e l'accumulo di mercurio nel cervello siano dovuti proprio ad un fenomeno di "mimetismo molecolare", ovvero la capacità del metil mercurio di legarsi a L-cisteina, formando un composto strutturalmente simile alla metionina.

La L-metionina è un substrato del trasportatore di aminoacidi neutri di tipo L (LAT-1) e presenta per esso un'elevata affinità. LAT-1 funziona come uno dei principali sistemi di trasporto di nutrienti verso la barriera emato-encefalica essendo altamente espresso nelle cellule endoteliali dei capillari nel cervello. Dato il suo ruolo cruciale nel trasporto di aminoacidi essenziali durante lo sviluppo cerebrale, i livelli di mRNA di LAT-1 nella

barriera emato-encefalica sono particolarmente elevate durante il periodo prenatale, seguite da una down-regolazione nel periodo post-natale. LAT-1 trasporta preferenzialmente amminoacidi aromatici e ramificati come Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, His e Met. In conclusione si è ipotizzato che LAT-1 sia in grado di trasportare in maniera efficiente il MeHg attraverso le membrane cellulari qualora questo sia coniugato a una molecola di Cisteina (CH₃Hg-S-Cys) [86]. Altri studi mostrano invece come il fenomeno del mimetismo molecolare sia alla base dell'accumulo di mercurio a livello renale, in particolare si è visto che il sistema di trasporto di amminoacidi B⁰ è in grado di trasportare il MeHg coniugato a una molecola di cisteina. Il coniugato CH₃Hg-S-Cys infatti presenta una struttura simile a quella della metionina, uno degli aminoacidi trasportato con maggiore affinità dal sistema di trasporto B⁰, inoltre tale sistema di trasporto è localizzato a livello della membrana plasmatica delle cellule epiteliali del tubolo prossimale, zona corrispondente al punto dove il MeHg tende ad accumularsi ed ad esplicare i suoi effetti tossici [87].

La capacità dei composti mercuriali di interagire con i gruppi SH dei residui di Cisteina è stata inoltre dimostrata tramite mutagenesi sito diretta. Per il trasportatore umano di cationi organici OCT2 è stato visto come i residui di cisteina 451 e 474 siano coinvolti nell'interazione del trasportatore con il cloruro di mercurio, inibendo notevolmente il trasporto di TEA da parte di OCT2. Sono stati infatti creati 4 differenti mutanti, uno in cui tutti e quattro i residui di cisteina di OCT2 sono stati convertiti in alanina, e quattro varianti di questo mutante, in ognuno dei quali una delle 4 Cisteine è stata ripristinata. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il mutante in cui tutte le cisteine sono state convertite in alanina non presenta una riduzione del trasporto di TEA, il suo profilo è infatti del tutto simile a quello della proteina WT, mentre solo i mutanti in cui le cisteine 451 e 474 sono state ripristinate presentano una riduzione del trasporto. Tramite mutagenesi sito diretta quindi non solo è stata evidenziata la capacità dei composti mercuriali di interagire con i gruppi SH delle proteine ma

è stato possibile identificare i residui di cisteina responsabili di questo legame [88]. Diversi studi inoltre hanno dimostrato come l'interazione dei composti mercuriali con i sistemi di trasporto di membrana riduca notevolmente il trasporto dei substrati endogeni di queste proteine, ad esempio in questo lavoro di tesi si è visto come il trasportatore di cationi organici OCTN2 interagisce con HgCl_2 e MeHg grazie a residui di Cisteina presenti nel sito attivo della proteina causando una notevole riduzione del trasporto di carnitina [89]. Risultati del tutto simili, ovvero una forte inibizione del trasporto a seguito dell'interazione delle proteine con composti mercuriali, sono stati ottenuti per il trasportatore di amminoacidi $\text{B}^0\text{AT1}$, per il trasportatore di glutamina/amminoacidi ASCT2, e per il trasportatore mitocondriale ornitina/citrullina [90,91,92].

1.17 OBIETTIVI E IMPORTANZA DELLO STUDIO DEI COMPOSTI XENOBIOTICI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è lo studio dell'effetto di xenobiotici a livello molecolare su sistemi di trasporto di membrana in modo da ottenere nuove conoscenze sul meccanismo di tossicità, questo principalmente per due motivi:

- molti di questi composti vengono a contatto con l'uomo, come contaminanti ambientali e come composti farmacologici usati in terapia
- gli organismi superiori rappresentano un target selettivo di tali composti poiché le loro proteine contengono più residui di Cys rispetto a quelle degli organismi meno evoluti.

Inoltre molti degli xenobiotici che reagiscono con i gruppi SH sono poco conosciuti, nonostante gli effetti specifici sugli organismi superiori. Pertanto, l'obiettivo di definire il meccanismo di induzione degli effetti di questi xenobiotici a livello molecolare oltre a colmare le lacune nelle conoscenze di tali composti, ha importanti risvolti sulla salute umana. Comprendere i meccanismi dell'induzione della tossicità può fornire, a breve termine, le basi

della prevenzione e cura degli effetti collaterali dei farmaci, a medio e lungo termine, inoltre, tali conoscenze possono contribuire alla progettazione di nuovi composti farmacologici con migliori proprietà terapeutiche. Per conseguire questi obiettivi sono necessari sistemi sperimentali modello che devono essere riproducibili e atti a misurare parametri cinetici che possono descrivere, qualitativamente e quantitativamente, l'effetto di tali composti a livello molecolare. Inoltre la conoscenza del genoma umano ci permette di poter inserire mutazioni a livello della sequenza che codifica per le proteine coinvolte nel trasporto di questi composti in modo da poter visualizzare eventuali cambiamenti di tali parametri. Un sistema sperimentale che può essere usato è la tecnologia dei liposomi. Questo modello è rappresentato da vescicole costituite da un bilayer fosfolipidico nelle cui membrane i singoli trasportatori sono inseriti con la stessa orientazione che hanno nella membrana biologica nativa. Il trasporto catalizzato da ogni sistema è monitorato usando composti radioattivi. L'interazione e l'effetto degli xenobiotici sui trasportatori può così essere descritto e quantificato mediante analisi cinetiche. I parametri daranno diverse informazioni sul tipo di interazione (reversibile o irreversibile) e, quindi sulla possibilità di invertire gli effetti di tossicità. Gli xenobiotici da testare possono essere scelti tra: composti inorganici, ioni di metalli pesanti per i quali è nota l'interazione con i gruppi SH, composti organici quali farmaci e contaminanti chimici ambientali. Per scegliere i composti con le suddette caratteristiche, si possono effettuare screening bioinformatici sulla base della struttura chimica, analisi di similarità degli effetti collaterali e ricerca in banche dati. Grazie a questa strategia sarà anche possibile trovare nuovi composti, la cui tossicità risulta ancora sconosciuta, capaci di interagire con i trasportatori. Mediante queste strategie sono stati già identificati molti composti farmacologici che interagiscono con i gruppi SH delle Cys delle proteine. Lo studio dell'interazione degli xenobiotici selezionati ed i sistemi modello permetterà una visione complessiva dei meccanismi di azione di questi composti relativamente alla loro tossicità ed aiuterà nella

predizione di potenziali effetti di reagenti simili la cui azione sugli organismi animali è ancora completamente sconosciuta. Inoltre questi studi potranno avere applicazioni future, come la sintesi di farmaci di nuova generazione la cui tossicità potrebbe essere facilmente predetta dal modello sperimentale.

1.18 INSUFFICIENZA RENALE INDOTTA DA FARMACI

Il rene come il fegato gioca un ruolo importante nell'eliminazione di numerosi xenobiotici, quali ad esempio i farmaci, tossine e metaboliti endogeni. L'eliminazione dei farmaci coinvolge la filtrazione glomerulare, la secrezione tubolare e il riassorbimento a livello tubolare. Di tutti questi processi, la secrezione e il riassorbimento nei tuboli renali sono essenzialmente processi saturabili, e le proteine di membrana mediano il trasporto di queste sostanze. I sistemi di trasporto responsabili della secrezione renale dei farmaci sono stati classificati in due categorie: trasportatori di cationi organici (OCT) o trasportatori di anioni organici (OAT) (figura 2).

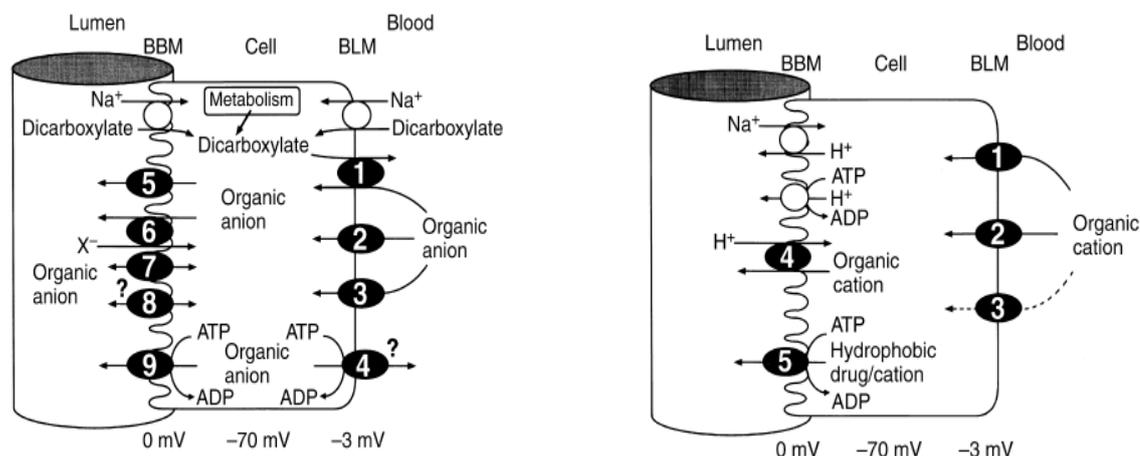


Figura 2: trasportatori di cationi e anioni organici: l'uptake degli anioni organici attraverso la membrana basolaterale è mediato dai trasportatori OAT 1(1A), OAT2 (2A), OAT3 (3A). I farmaci anionici coniugati con il glutatione vengono espulsi dalla cellula nel sangue grazie a MRP1. L'uscita degli anioni organici attraverso la membrana dei brush border è mediata da un trasportatore di anioni organici potenziale dipendente (5A) e da un trasportatore anione/anione (6A). L'uptake dei cationi organici attraverso la membrana basolaterale è invece mediato dai trasportatori di cationi organici OCT1 (1B), OCT2 (2B), OCT3 (3B), l'uscita dei cationi organici attraverso la membrana dei brush border è mediata da un antiporto H⁺/ cationi organici (4B), e da la glicoproteina P (5B) che è coinvolta nell'escrezione dei farmaci idrofobici [93].

Il trasporto dei farmaci avviene effettivamente grazie a due classi distinte di trasportatori di membrana, uno localizzato a livello della membrana basolaterale che regola l'uptake dei farmaci dal sangue e l'altro posizionato a livello delle membrane dei brush border per mediare l'uscita dei farmaci all'interno del lume tubolare del rene. Oltre a queste due classi di trasportatori giocano un ruolo importante i trasportatori primari ATP-dipendenti e le proteine appartenenti alla famiglia di resistenza multifarmaco.

Il riassorbimento di gran parte dei farmaci dal filtrato glomerulare è mediato da trasportatori oligopeptidici localizzati a livello delle membrane dei brush-border del tubolo prossimale che possono influenzare il profilo farmacocinetico e l'efficacia del farmaco, pertanto il trasporto renale dei farmaci è il risultato di un'interazione continua fra trasportatori di ioni organici e in alcuni casi i trasportatori di nutrienti presenti a livello delle cellule tubolari del rene [93].

Numerosi sono i fattori che rendono il parenchima renale particolarmente esposto a danno da farmaci. Il flusso di sangue a livello renale è pari a circa il 25% della gittata cardiaca e questo giustifica l'elevata esposizione del rene al farmaco. Molte cellule renali lavorano in un ambiente relativamente ipossico a causa dell'elevato metabolismo richiesto per trasportare i vari soluti;

questo e il carico di lavoro cellulare aumentano la sensibilità cellulare al danno indotto da farmaci. In aggiunta, la biotrasformazione di alcuni farmaci a livello renale e la produzione di radicali dell'ossigeno determinano stress ossidativo che, a sua volta, porta a danno renale.

Inoltre la midollare è esposta a concentrazioni molto elevate di farmaci a causa del potere di concentrazione che possiede il rene. Infine, la cellula del tubulo prossimale è esposta a concentrazioni intracellulari elevate di farmaci grazie a meccanismi di trasporto apicali o basolaterali. Oltre a possedere meccanismi di captazione, la cellula tubulare, attraverso proteine di trasporto apicale, elimina le tossine accumulate nel citoplasma; una diminuita

efficienza di questi trasportatori o meccanismi di competizione fra sostanze endogene ed esogene determinano accumulo di sostanza tossica e danno cellulare con apoptosi e necrosi.

Le caratteristiche proprie di un farmaco giocano un ruolo altrettanto importante nello sviluppo di nefrotossicità. L'esposizione ad alte dosi o a prolungate terapie potenzia gli effetti tossici renali di un farmaco nefrotossico. Anche la carica positiva di un determinato farmaco può aumentare il rischio di tossicità verosimilmente perché si lega alle cariche negative dei fosfolipidi di membrane. Infine, l'impiego combinato di più farmaci può risultare in un aumento della nefrotossicità. [94]

I meccanismi con cui un farmaco può causare un danno renale sono svariati, come ad esempio alterazioni emodinamiche, danno cellulare diretto verso l'epitelio tubulare, ostruzione tubulare causata dalla precipitazione della tossina o di suoi metabolite, edema, infiammazione interstiziale e fenomeni trombotici. Nelle fasi iniziali il danno si manifesta con cambiamenti della funzione tubulare, comprese alterazioni della concentrazione di urina e di elettroliti, in assenza di provvedimenti il danno può peggiorare fino a un declino completo della funzionalità renale [95]. A livello cellulare il danno si manifesta con alterazioni del citoscheletro e della polarità della cellula, con errata localizzazione delle molecole di adesione e di altre proteine di membrana come $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasi}$ e β -integrine, disfacimento dei brush border e innesco di apoptosi e necrosi. A seguito di un danno prolungato le cellule vitali e non vitali risultano desquamate, lasciando così regioni dove le membrane basolaterali rimangono l'unica barriera tra il filtrato e l'interstizio peritubulare. Questo permette il refluire del filtrato, specialmente in circostanze in cui la pressione nei tubuli aumenta a causa di ostruzioni intratubulari causate dalla presenza di detriti nel lume che interagiscono con proteine come ad esempio la fibronectina. Questo danno epiteliale causa il rilascio di mediatori pro-infiammatori come ad esempio citochine e vasoconstrictori, con conseguente infiammazione diffusa. Un danno renale diffuso può inoltre causare alterazioni nell'espressione genica, con

conseguente aumento dell'espressione di proteine come ad esempio KIM-1 (kidney injury molecule 1) o NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) o attivazione di nuovi percorsi di trasduzione. A differenza di altri organi i reni hanno però la capacità di ripristinare le cellule che sono state perse a seguito di un insulto tossico, le cellule sopravvissute al danno partecipano così a questo processo rigenerativo grazie a una serie di eventi quali ad esempio distribuzione e migrazione cellulare verso le aree soggette all'insulto tossico, differenziazione e proliferazione cellulare, in modo da ristabilire la funzionalità del nefrone [96]. Esistono diverse categorie di farmaci coinvolti in questo meccanismo di tossicità renale (Figura 3):

Oncologici. I sali di platino (cisplatino e, in misura minore, carboplatino e oxaliplatino) sono associati a tossicità renale dose-dipendente con conseguente necrosi e apoptosi cellulare. L'ifosfamide spesso causa danno renale irreversibile, in alcuni casi anche dopo la prima somministrazione. Il metotrexato ad alte dosi può causare insufficienza renale acuta attraverso la formazione di cristalli e l'ostruzione intrarenale. Il raltitrexed qualche volta può causare anche insufficienza renale acuta. L'aldesleuchina, una citochina, può provocare stravasamento capillare, con conseguente ipotensione, inadeguata perfusione renale e una insufficienza renale acuta funzionale transitoria.

Cardiologici. Diversi farmaci per la cura di patologie cardiologiche possono causare insufficienza renale acuta funzionale, tra cui gli ACE-inibitori. Riducono la perfusione renale nelle situazioni in cui la perfusione glomerulare dipende dal sistema renina-angiotensina (in casi di ipovolemia, disidratazione, insufficienza cardiaca o stenosi dell'arteria renale). La disidratazione e la combinazione di più farmaci come ad esempio i FANS aumentano il rischio dell'insufficienza renale. L'insufficienza renale dovuta ai diuretici può talvolta comportare altri meccanismi, come l'ipersensibilità e l'ostruzione renale dovuta a calcoli contenenti triamterene o il suo metabolita.

FANS e analgesici. I FANS, compresa l'aspirina e gli inibitori della COX-2, possono causare insufficienza renale funzionale dovuta all'inibizione della sintesi delle prostaglandine, soprattutto nelle situazioni in cui la perfusione glomerulare dipende dall'effetto vasodilatatore delle prostaglandine (ipovolemia, disidratazione, insufficienza cardiaca, stenosi dell'arteria renale). Gli analgesici non-oppioidi, quando assunti regolarmente per lunghi periodi o ad alte dosi, possono causare nefropatia cronica. L'insufficienza renale acuta organica è stata riportata con alcuni FANS e con floctafenina.

Antinfettivi. Gli aminoglicosidi come la gentamicina possono causare insufficienza renale acuta organica. I fattori di rischio includono la dose e la durata del trattamento, l'età avanzata, l'insufficienza renale, la disidratazione e la combinazione con altri farmaci nefrotossici.

Gastroenterologici. Alcuni farmaci usati in gastroenterologia possono portare ad un rischio raro e imprevedibile di tossicità renale. Casi di nefrite interstiziale acuta sono stati riportati con gli inibitori di pompa protonica, come l'omeprazolo. Anche gli antagonisti-H2 possono causare la nefrite interstiziale che si risolve però dopo la sospensione del trattamento. I derivati dell'acido aminosalicilico, come la mesalazina, che sono usati per il trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali talvolta possono provocare insufficienza renale, compresa la nefrite interstiziale.

Immunosoppressori. La Ciclosporina e il Tacrolimus possono causare insufficienza renale organica, dose-dipendente, generalmente reversibile. Sirolimus ed everolimus aggravano la tossicità renale della Ciclosporina.

Psichiatrici/neurologici. Il litio può causare insufficienza renale in caso di overdose oppure, occasionalmente, durante un trattamento di lunga durata.

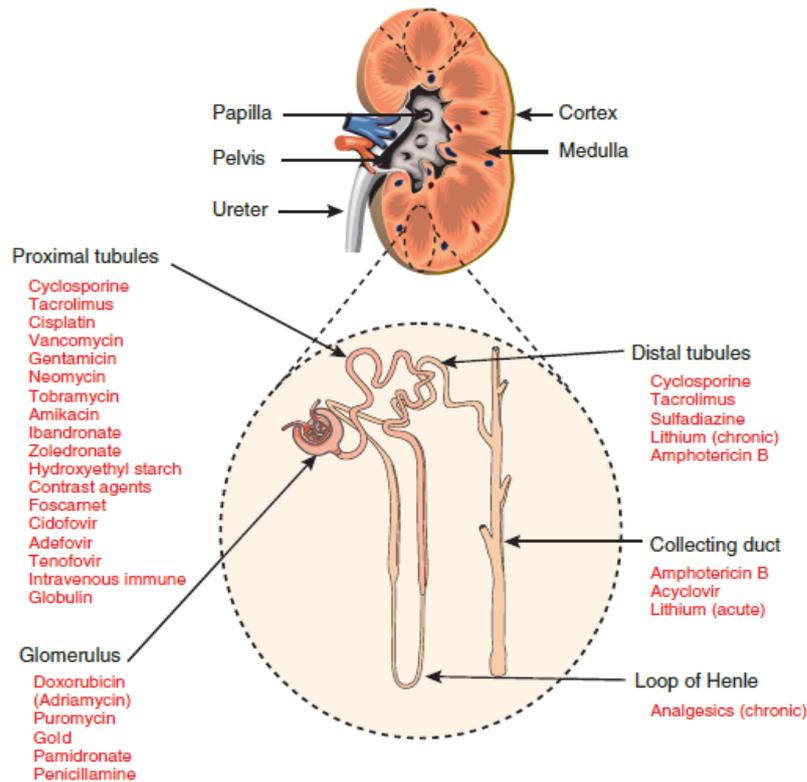
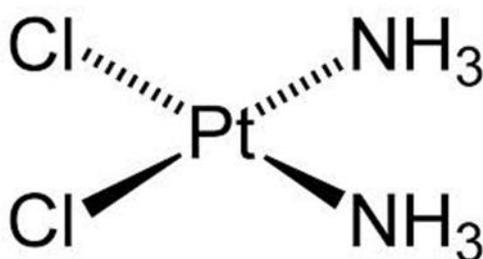


Figura 3: Nefrotossicità da farmaci: nella figura sono mostrati a quale livello del nefrone i farmaci esplicano la loro tossicità.

1.19 CISPLATINO CARATTERISTICHE GENERALI, MECCANISMO D'AZIONE E NEFROTOSSICITÀ



Il cisplatino (cis-Diamminedichloroplatinum (II) o cis-DDP) è un citostatico complesso metallo inorganico che fu sintetizzato da Perone nel 1845. Solo dopo 120 anni fu scoperta casualmente la sua attività biologica, quando studiando la crescita batterica in un campo elettrico, si vide che gli elettrodi al platino inibivano la divisione di *Escherichia coli* e ne inducevano una crescita in forma filamentosa. Fu così scoperta una nuova classe di agenti antitumorali in grado di inibire la divisione ma non la crescita cellulare. Esso è il primo

antitumorale al platino introdotto in clinica. Il cis-DDP è uno dei più potenti farmaci chemioterapici ed è molto attivo in un ampio spettro di neoplasie, tra cui i tumori polmonari, dell'esofago e dello stomaco, del cervello e del tratto genitourinario (testicolo, ovaio e vescica) [97].

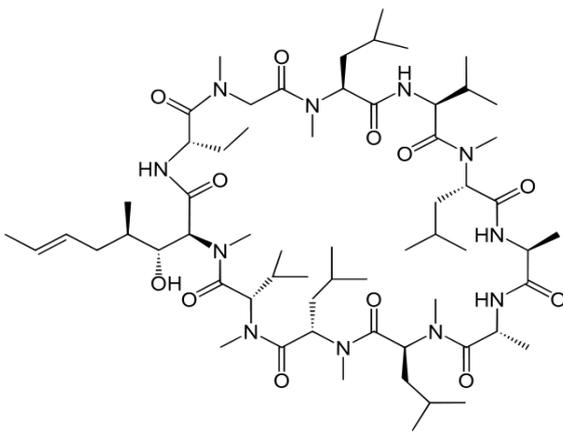
Il cisplatino è una piccola molecola costituita da uno ione platino centrale circondato da quattro ligandi, due gruppi amminici e due cloridrici; quando quest'ultimi sono disposti in posizione cis la molecola ha attività chemioterapica, se sono in posizione trans non ha attività [98]. L'uptake cellulare del cisplatino non è ancora ben conosciuto, ma sembra che questa molecola entri nella cellula, in parte, passivamente per diffusione attraverso i canali transmembrana e in parte per diffusione facilitata attraverso un sistema di trasporto di membrana non ancora identificato. A seguito della diffusione entro la cellula, i due ioni cloruro presenti nel cis-DDP vengono sostituiti da due molecole di acqua, generando una molecola carica positivamente e molto reattiva, detta complesso monoidrato. Quest'ultima è la forma citotossica, in quanto è in grado di interagire con siti nucleofili come proteine cellulari, la membrana fosfolipidica, i microfilamenti del citoscheletro, molecole contenenti gruppi tiolici, l'RNA e il DNA cellulare e mitocondriale [99]. Il meccanismo d'azione del cisplatino non è ancora ben conosciuto. Viene considerato un analogo degli agenti alchilanti, sembra che solo l'1% del cis-DDP intracellulare sia in grado di interagire con il DNA nucleare creando dei legami crociati con il filamento di DNA e tra proteine e DNA. La maggior parte dei complessi intra-filamento si formano tra guanine adiacenti e tra guanine e adenine attigue e rappresentano rispettivamente il 65% e il 25% del totale dei complessi formati [100]. Il legame del cis-DDP con il DNA nucleare causa una inibizione della sintesi dell'acido nucleico dose dipendente. Una delle prime forme di citotossicità del cisplatino avvengono a carico dei mitocondri, ma anche verso proteine con funzioni cruciali per la cellula a causa dell'elevata affinità del chemioterapico per i gruppi sulfidrilici. La

somministrazione clinica del cisplatino comporta effetti collaterali, quali la nefrotossicità, la neurotossicità e la resistenza di cellule tumorali. La nefrotossicità è dovuta all'attivazione all'interno delle cellule di meccanismi d'infiammazione, apoptosi o morte cellulare, stress ossidativo, oltre che da una vasocostrizione precoce che determina un danno ischemico. L'ingresso nelle cellule del cisplatino avviene in parte per diffusione glomerulare passiva, in parte grazie ad un trasportatore definito "Organic Cationic Transporter" (OCT), situato sulla membrana basolaterale della cellula tubulare sia nel tubulo prossimale sia in quello distale. Diverse vie metaboliche conducono all'apoptosi: la via mitocondriale, quella mediata dal reticolo endoplasmatico, caspasi dipendente o indipendente, quella mediata dal p53 (proteina che, preservando la stabilità del genoma, sopprime neoplasie nascenti), attivata dal DNA danneggiato dal cisplatino e lo sbilanciamento tra regolatori molecolari delle proteine del ciclo cellulare (cyclin-dependent kinase, CDK). La cascata infiammatoria innescata dal TNF- α (tumor necrosis factor alpha) e l'inibizione del Proliferator-Activated Receptor- α (PPAR- α) nelle cellule tubulari giocano anch'esse un ruolo patogenetico. Oltre l'apoptosi anche lo stress ossidativo è coinvolto attivamente nella patogenesi del danno renale acuto indotto da cisplatino. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) agiscono direttamente sui componenti cellulari quali ad esempio i lipidi, proteine e DNA distruggendo la loro struttura. I ROS sono prodotti tramite la xantina ossidasi, nei mitocondri, e grazie a NADPH ossidasi nelle cellule. In presenza di cisplatino, i ROS vengono prodotti attraverso tutte queste vie giocando così un ruolo cruciale nella patogenesi del danno renale acuto.

Anche l'ipossia gioca un ruolo fondamentale nella nefrotossicità indotta da cisplatino, tale fenomeno è causato dalla diminuzione di afflusso di sangue osservata durante le prime fasi di nefrotossicità. Studi recenti evidenziano che l'infiammazione ha un ruolo importante nella patogenesi del danno renale indotto da cisplatino. Il cisplatino infatti aumenta l'espressione di TNF- α , citochine, molecole di adesione (ICAM) e del il recettore TNF. In particolare TGF- α

ha un ruolo centrale nel mediare il danno renale, induce, infatti, apoptosi, produce ROS e coordina l'attivazione di un gran numero di citochine nel rene. Il cisplatino può anche indurre fibrosi a livello dei tuboli renali, accompagnata da infiltrazione di macrofagi e linfociti [101].

1.20 CICLOSPORINA CARATTERISTICHE GENERALI, MECCANISMO D'AZIONE E NEFROTOSSICITÀ



La scoperta di Borel, nel 1972, delle proprietà immunosoppressive della ciclosporina, un metabolita fungino estratto dal *Tolipocladium inflatum*, ha contribuito enormemente alla rapida crescita e al successo clinico del trapianto di organi, in particolare di cuore, fegato e rene. Essa rappresenta una classe

completamente nuova ed importante di farmaci immunosoppressivi. Molti dei suoi effetti selettivi sulle cellule T sembrano essere correlati all'inibizione selettiva dell'attivazione mediata dal TCR. La ciclosporina inibisce la produzione di citochine da parte delle cellule TH in vitro e inibisce lo sviluppo dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ maturi nel timo. La ciclosporina è un peptide ciclico, costituito da 11 aminoacidi e ha peso molecolare di 1202 Daltons. Le proprietà immunosoppressive della ciclosporina sono state scoperte nei topi in cui è in grado di sopprimere la produzione di anticorpi. Altre proprietà comprendono l'inibizione in vivo della produzione di cellule che formano anticorpi, inibizione della reazione GVH, del rigetto dei trapianti di cute, del rigetto di tipo ritardato degli allotrapianti di organi solidi e delle reazioni di ipersensibilità ritardata. L'assenza di mielo-inibizione è stata il vantaggio principale rispetto agli altri farmaci immunosoppressivi, suggerendo un meccanismo d'azione

relativamente specifico per i linfociti. Altre cellule infiammatorie sono molto meno sensibili ai suoi effetti inibitori. Gli studi sugli effetti della ciclosporina sui linfociti T hanno dimostrato: inibizione dei linfociti T che producono IL-2 e dei linfociti T citotossici, inibizione dell'espressione del gene IL-2 nei linfociti T attivati, non inibizione dei linfociti T attivati in risposta all'IL-2 esogena, inibizione dell'attivazione dei linfociti T a riposo in risposta a linfocine alloantigeniche ed esogene, inibizione della produzione di IL-1 e inibizione dell'attivazione mitogena (concanavalina A) dei linfociti T che producono IL-2. Queste risposte dei linfociti T coinvolgono linfociti CD4+ (TH) e/o linfociti CD8+ (T citotossici/suppressor) e l'inibizione sembra avvenire a livello dell'attivazione e forse anche della maturazione delle cellule quiescenti. L'aggiunta di steroidi ha consentito di abbassare il dosaggio della ciclosporina e ha diminuito la nefrotossicità (il principale effetto collaterale del farmaco). La ciclosporina è metabolizzata a livello epatico dagli enzimi del citocromo P-450. I farmaci che aumentano o diminuiscono la funzione del citocromo P-450 possono aumentare o diminuire in maniera importante i livelli ematici di ciclosporina.

I potenziali effetti indesiderati della ciclosporina comprendono la nefrotossicità, l'ipertensione, l'ipercalcemia, l'irsutismo, l'ipertrofia gengivale, tremori ed altre turbe neurologiche, il diabete e un certo grado di epatotossicità. La nefrotossicità costituisce uno degli effetti collaterali più comuni causando un danno renale acuto o cronico, anche se il completo meccanismo di tossicità rimane tuttora non del tutto noto. Molti studi hanno dimostrato un significativo ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In diversi studi è stato dimostrato che i glomeruli dei ratti trattati con la ciclosporina incrementavano la produzione di ROS e il processo di perossidazione dei lipidi. In particolare la ciclosporina causa un aumento della produzione dei ROS da parte dei mitocondri, questo meccanismo può essere causato sia da un aumento diretto della loro produzione sia da una diminuzione dei sistemi antiossidanti. L'aumento della produzione di ROS causa la formazione di un poro a

livello della membrana interna dei mitocondri, la ciclosporina infatti promuove l'ossidazione della cardiolipina, il fosfolipide maggiormente presente sulla membrana mitocondriale e questo causa un'alterazione della stabilità e della fluidità della membrana mitocondriale. Questi fenomeni mitocondriali sono inoltre strettamente correlati con l'aumento dell'apoptosi nelle cellule tubolari ed endoteliali, il danno a livello mitocondriale infatti porta a una variazione della membrana mitocondriale e alla formazione del suddetto poro, il quale permette il rilascio nel citoplasma di tutti quei fattori apoptotici quali caspasi e citocromo C. Infine recentemente si è scoperto che la CsA, modulando la forma inducibile dell'enzima NO sintasi (iNOS), induce apoptosi delle cellule renali attraverso la neo-trascrizione della proteina tumor suppressor p53 [102].

1.21 CARATTERISTICHE GENERALI, MECCANISMO D'AZIONE E NEFROTOSSICITÀ DELLA BROMOETILAMMINA

La 2-bromoetilammina è una molecola spesso utilizzata per simulare l'effetto tossico causato da una somministrazione prolungata di analgesici. I farmaci analgesici sono utilizzati per lenire il dolore riducendolo, senza però intervenire sulle cause che lo hanno provocato. Questa classe di farmaci comprende molecole molto diverse da loro e principalmente: farmaci analgesici periferici come paracetamolo e antipiretici, FANS (farmaci antinfiammatori non steroidei), antidolorifici oppioidi, anticonvulsivi e antidepressivi triciclici. In molti casi il dolore è conseguenza di un processo infiammatorio. Esistono numerose dimostrazioni che il dolore infiammatorio risulta dall'azione sinergica di due fenomeni: la stimolazione iperalgesica che non provoca nocicezione ma abbassa la soglia di eccitazione del recettore del dolore e la stimolazione algescica che determina attivazione del recettore del dolore. Le prostaglandine e le prostaciline sono probabilmente i più importanti mediatori iperalgesici presenti nell'area in cui si verifica la reazione infiammatori. Ai farmaci anti-infiammatori non

steroidi (FANS) si attribuiscono tre azioni fondamentali esplicate attraverso il blocco dell'enzima ciclo-ossigenasi: antidolorifica, antipiretica ed antinfiammatoria. L'arresto della produzione di prostaglandine e prostacicline, per effetto del blocco enzimatico, spiega l'efficacia contro il dolore e le manifestazioni infiammatorie. L'azione antipiretica sembra sia da ascrivere all'inibizione della sintesi di prostaglandine nell'area preottica dell'ipotalamo. Assumono il nome di analgesici quei FANS che in termini farmacodinamici esplicano prevalentemente i loro effetti antagonizzando la stimolazione iperalgesica [103]. Gli analgesici oppioidi od oppiacei costituiscono il prototipo dei farmaci che agiscono sui meccanismi centrali del dolore legandosi a recettori i cui ligandi naturali sarebbero costituiti da peptidi encefalici denominati encefaline, endorfine e dinorfine. Uno dei meccanismi ritenuti più probabili nell'azione farmacologica degli analgesici consiste in un processo dimostrato per l'azione fisiologica delle encefaline: queste molecole andrebbero a legarsi a recettori presenti su terminali presinaptici di neuroni liberanti neurotrasmettitori, la cui azione eccitatoria sui recettori di un terzo neurone medierebbe l'effetto dolorifico. Il legame di encefaline ed analgesici ai recettori presinaptici agirebbe da inibitore di questi neuroni. Nella mediazione intracellulare dell'effetto degli oppioidi, l'inibizione dell'adenilato ciclasi è l'evento che si conosce da più lungo tempo. Il legame dell'analgesico naturale o di sintesi con il recettore, ne determina l'interazione con una proteina N inibitrice (NI) che lega il GTP con conseguente inibizione adenilatociclasica. La ridotta produzione di cAMP impedisce la normale attivazione delle proteine chinasi, non consentendo la fosforilazione delle proteine di membrana. Ne risulta un aumento della conduttanza per lo ione K^+ ed una riduzione della conduttanza per il Ca^{++} . Le principali classi di recettori per gli oppioidi sono tre, con relativi sub-tipi: μ (μ_1 , μ_2), δ , K (K_1 , K_2) [104].

In passato la nefropatia da analgesici era una delle più frequenti cause di patologie renali. E' caratterizzata da nefrite interstiziale cronica, spesso associata a necrosi papillare. La prima

manifestazione è una diminuzione della filtrazione glomerulare. Successivamente si manifesta fibrosi interstiziale, specialmente nella zona midollare, con successiva necrosi papillare. A meno che non si interrompe l'abuso di analgesici il danno renale indotto tende a progredire fino ad uno stadio terminale. Tuttavia, sono necessarie grandi quantità di questi farmaci e una somministrazione prolungata per indurre uno stato cronico della patologia renale. I meccanismi con cui questi farmaci come il BEA inducono un danno renale includono lo stress ossidativo e l'inibizione cronica della sintesi di prostaglandine vasodilatatrici con conseguente danno ischemico. Infezioni urinarie sono frequenti nei pazienti con nefropatia da analgesici [105].

1.22 BIOMARCATORI CONVENZIONALI DI TOSSICITÀ RENALE, VANTAGGI E LIMITI DEL LORO UTILIZZO

Il danno renale acuto a seguito di un danno renale prolungato è una condizione molto frequente che presenta un alto rischio di morte. Storicamente l'individuazione e la diagnosi del danno renale vengono effettuate grazie all' utilizzo di marcatori convenzionali della funzionalità renale quali la creatinina sierica e i livelli di urea. Questi marcatori convenzionali sono ancora oggi di gran lunga utilizzati nella normale pratica medica.

CREATININA SIERICA

La creatinina è un aminoacido composto, che deriva dalla conversione non enzimatica di creatina in creatinina-fosforica a livello del muscolo scheletrico e dal metabolismo epatico dell'acido guanidinaminoacetico. La creatinina è una molecola di 113 Da che viene rilasciata nel plasma ad una quota relativamente costante, è liberamente filtrata non viene ne riassorbita ne metabolizzata dal rene. La clearance della creatinina è comunemente utilizzata come indicatore della GFR (glomerular filtration rate) e la concentrazione sierica della molecola (Scr) gode di una relazione inversa con la GFR stessa: se questa diminuisce, indice di una

diminuzione delle funzionalità renale, la creatinina nel sangue aumenta e viceversa. Ci sono delle limitazioni però, nell'uso della SCr come marker della funzione renale:

- produzione e rilascio di creatinina nel sangue possono essere altamente variabili. Differenze nell'età, nel sesso, nell'introduzione dietetica e nella massa muscolare possono influire molto sulle concentrazioni basali della proteina, ugualmente questa variabilità può essere determinata da stati patologici (es. rabdomiolisi).
- Studi hanno dimostrato come i farmaci possono alterare la secrezione di creatinina, determinando fenomeni di incremento, transitorio e reversibile, della creatinina sierica.
- Elementi patologici concomitanti possono ridurre l'accuratezza con cui si rilevano i valori ematici di creatinina mostrando falsi aumenti della proteina; un esempio è la chetoacidosi diabetica, l'aumento degli acetoacetati nel sangue, disturba la misurazione di creatinina con i comuni metodi, questo fenomeno prende il nome di "reazione di Jaffe".
- Infine, il tempo necessario affinché la creatinina si accumuli nel sangue con valori da risultare diagnostici è molto lungo, questo ritarda il momento della diagnosi con la possibilità che si siano già instaurati processi patologici irreversibili.

UREA SIERICA

L'urea è una molecola di 60 Da, solubile in acqua, derivante dal metabolismo delle proteine, viene comunemente usata come marker sierico della ritenzione o diminuzione dei soluti uremici. Un aumento acuto della concentrazione sierica di urea è indicativo di sviluppo della "sindrome uremica" con ritenzione di una larga varietà di tossine uremiche. L'accumulo di urea predispone a effetti metabolici, biochimici e fisiopatologici avversi, poiché si incrementa lo stress ossidativo; si ha alterazione del co-trasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ con conseguente

deregolazione del potassio e dell'acqua intracellulare ed infine alterazioni dell'apparato immunitario.

L'urea, come la creatinina, è legata al GFR da un rapporto inverso, se l'urea sierica aumenta vuol dire che la GFR è diminuita; malgrado ciò l'uso di questa molecola è ancora più problematico, dato che sono numerosi gli agenti extra renali che possono modificarne la concentrazione nel sangue. La sua produzione non è costante e la sua concentrazione può variare in funzione dell'apporto dietetico di proteine, ma anche di stati critici del paziente, in seguito per esempio a trauma o a sepsi, emorragie gastrointestinali e terapie farmacologiche prolungate soprattutto a base di corticosteroidi. Inoltre la clearance dell'urea non è costante: si stima che un 40-50% dell'urea filtrata è riassorbita a livello del tubulo prossimale e distale e che in condizioni in cui si ha un notevole decremento del volume circolante di sangue, a livello del tubulo renale, aumenta il riassorbimento di Na^+ e H_2O che stimola un conseguente riassorbimento di urea. Questo finisce con il sottostimare il GFR, indipendentemente da una non parallela variazione della creatinina sierica. Il rapporto urea-creatinina sierica viene comunemente usato per definire la condizione di "azotemia prerenale".

In conclusione l'urea come la creatinina è indice di funzionalità del GFR ma non è comunque attendibile, per tempi e concentrazioni, come indicatore della fase "acuta" del danno renale. Questo perché Scr è un marker funzionale, non strutturale.

MISURE DI BIOCHIMICA URINARIA E INDICI DERIVATI

Attualmente nella pratica clinica hanno preso piede numerosi test di biochimica urinaria (escrezione di Na^+ o di urea) utili per lo studio dello stato tubulare del nefrone e di conseguenza utilizzati per la diagnosi e follow-up del danno renale. Purtroppo non godono di una facile maneggevolezza e non di rado i risultati ottenuti possono risultare forvianti. Per esempio: la frazione escrezionale di Na^+ si basa sul principio che vede, il sodio filtrato, riassorbito. Questo è tipico in corso di azotemia prerenale nella quale la funzione tubulare è

totalmente conservata, la FeNa risulterà $< 1\%$; al contrario in corso di danno tubulare la FeNa risulterà $> 1\%$, ma la FeNa è frequentemente maggiore dell'1% nei pazienti trattati con diuretici ed è stata ritrovata inferiore dell'1% in pazienti che presentano varie condizioni cliniche tipo: sepsi, rabdomiolisi ed esposizione ai mezzi di contrasto radiologici. Lo stesso vale per la frazione escrezionale di urea per la quale i risultati, oltre che di macchinoso rilevamento, risultano spesso indici non troppo attendibili della funzionalità renale.

Come accennato precedentemente un marcatore ideale della funzionalità renale dovrebbe quindi idealmente incorporare caratteristiche fortemente operative. Dovrebbe essere endogeno, non tossico, totalmente filtrato, né secreto né riassorbito, non dovrebbe essere influenzato dai composti esogeni quali i farmaci, e dovrebbe essere solubile in acqua, di facile reperimento, facilmente gestibile dalla pratica clinica, velocemente quantizzabile attraverso l'analisi dei liquidi sierici comunemente usati (sangue ed urine), deve essere sensibile alle più piccole variazioni della funzione renale e dovrebbe permettere il monitoraggio di tutto il processo patologico, facendone intuire traiettoria e percorso. Infine dovrebbe essere d'aiuto nell'individuare i vari sottotipi di danno renale e la provenienza.

Al momento, la diagnosi del danno renale si avvale delle variazioni sieriche di creatinina ed urea, poche volte anche degli altri test urinari. Purtroppo questi marcatori risultano poco attendibili, hanno infatti delle limitazioni: non riflettono realmente nel tempo le variazioni dinamiche del GFR e non si esprimono su quale sia il danno, inoltre richiedono del tempo per accumularsi e risultare quantitativamente alterati nel sangue, determinando un inevitabile ritardo nella diagnosi. In definitiva vari studi hanno permesso di confermare che gli attuali marcatori utilizzati per la diagnosi di danno renale, ovvero creatinina ed urea, sono solo dei surrogati, che non godono di tutte le caratteristiche suddette, questo obbliga la ricerca a volgere lo sguardo verso la sperimentazione di nuovi biomarcatori di funzionalità renale, che ci permettano di utilizzare i convenzionali solo come complemento per la diagnosi [106].

1.23 CARATTERISTICHE DI UN BIOMARCATORE

Il termine “biomarcatore” (biological marker) è stato introdotto per la prima volta nel 1989, secondo tale definizione viene considerato biomarcatore un qualsiasi parametro biologico quantificabile e misurabile, come ad esempio concentrazioni di specifici enzimi o ormoni, distribuzione di uno specifico fenotipo nella popolazione, o presenza di sostanze biologiche, utilizzabile per la diagnosi precoce di malattie, valutazione del rischio di sviluppare specifiche patologie, studi epidemiologici, valutazione del rischio correlato ad agenti presenti nell’ambiente e studio di processi metabolici [107].

Secondo la classificazione descritta da Frank e Hargreaves anno?, esistono tre differenti categorie di marcatori:

- Biomarcatori di Tipo 0: marcatori del decorso naturale di malattia che correlano longitudinalmente con gli indici clinici conosciuti, cioè i sintomi, durante tutti gli stadi di malattia.
- Biomarcatori di Tipo I: marcatori che interagiscono con il meccanismo d’azione del farmaco sebbene non sia riconosciuto che tale meccanismo sia associato all’esito di malattia.
- Biomarcatori di Tipo II: marcatori le cui variazioni apportano benefici clinici. Questi marcatori devono essere attinenti al meccanismo d’azione del farmaco e alla fisiopatologia della malattia, per questo sono molto più difficili da sviluppare rispetto al Tipo 0 o Tipo I [108].

Un buon biomarcatore deve possedere alto valore prognostico e predittivo, ossia essere in grado di predire una malattia e di indirizzarla verso quei trattamenti che potrebbero avere maggior successo. Le caratteristiche richieste a un buon marcatore biologico sono:

- una correlazione specifica con la malattia,
- un’adeguata predittività sul tipo di trattamento e sulla risposta,

- la possibilità di effettuare la determinazione con precisione e in tempi brevi,
- essere relativamente insensibile a errori di campionamento,
- la sua valutazione non deve richiedere interventi invasivi,
- deve prevedere la durata a la gravità della patologia,
- deve essere generato dalle cellule danneggiate, proporzionale all'entità del danno ed essere specifico per un determinato tessuto o tipo cellulare.
- deve essere applicabile sia sull'uomo che sugli animali [95].

Le fasi necessarie allo sviluppo di un nuovo biomarker che risulti effettivamente utile nella diagnostica e nella pratica clinica sono cinque. La prima fase è preclinica o fase di “scoperta”: si cerca di individuare quelle molecole che potrebbero avere le caratteristiche di un marker. In questa fase, i biomarcatori vengono inizialmente osservati e descritti nella fisiopatologia di modelli animali. La seconda e terza fase sono costituite dalla scelta di una metodica affidabile in grado di testare il biomarcatore su campioni ristretti di individui e di verificare che sia dotato di tutte le caratteristiche precedentemente elencate. La quarta fase ha come compito la sperimentazione della molecola su popolazioni di pazienti per poter ritenere la molecola effettivamente universale e indipendente. Se la quarta fase si svolge con successo, ne seguirà una quinta mirata ad inglobare l'utilizzo dei nuovi biomarcatori nella pratica clinica [109].

1.24 NUOVI BIOMARCATORI DI TOSSICITÀ RENALE

Gli effetti che agenti tossici possono avere a livello renale sono molteplici, visto che esistono una moltitudine di composti in grado di danneggiare i reni a seguito di vari meccanismi, alcuni dei quali ancora oggi sconosciuti. Per tale motivo negli ultimi anni è diventato sempre più necessario identificare precocemente l'insufficienza renale indotta ad esempio da farmaci, grazie a marcatori predittivi che possano riflettere il danno renale ad uno stadio ancora reversibile, permettendo di attuare tempestivamente tutti quegli interventi necessari, e che

consentono di identificare la sede specifica del danno renale [110]. Ad oggi sono stati identificati diversi biomarcatori in grado di predire il danno renale in una fase ancora precoce (Figura 4).

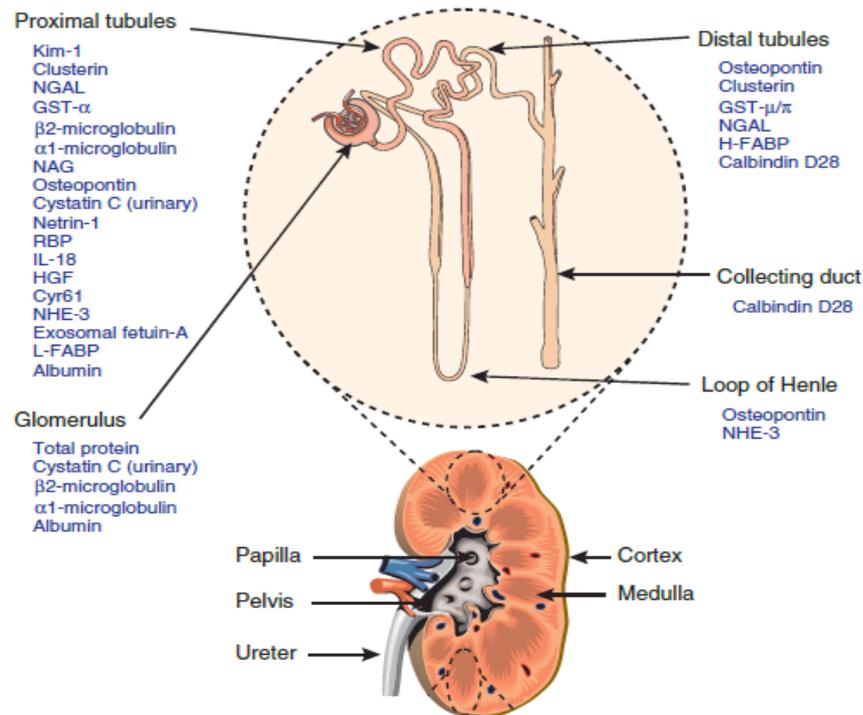


Figura 4: biomarcatori di danno renale: l'immagine mostra a livello di quale segmento del nefrone si ha l'espressione di ogni biomarcatore.

N-ACETILGLUCOSAMINA (NAG) è un enzima lisosomiale espresso nel tubulo prossimale del rene, è stato ampiamente studiato e si è dimostrato essere un marcatore persistente e sensitivo di patologie tubulari. Incrementi della concentrazione di NAG sono stati evidenziati a seguito dell'esposizione e farmaci nefrotossici, malattie glomerulari croniche, nefropatia indotta da diabete, alte concentrazioni di NAG sono state inoltre rilevate in pazienti con AKI (acute kidney injury) ancora in uno stato precoce. Fra i farmaci che possono aumentare la concentrazione urinaria di NAG vi sono analgesici, farmaci antiinfiammatori non steroidei e farmaci antireumatoidi. Il vantaggio nell'usare come biomarcatore NAG è la sua alta

sensibilità. Lievi alterazioni delle cellule epiteliali prossimali di brush border possono infatti causare il rilascio di NAG nelle urine e questo fa sì che questo marcatore possa essere direttamente correlato con patologie tubulari. Inoltre la sua concentrazione nelle urine è facilmente rilevabile grazie a saggi enzimatici colorimetrici. Lo svantaggio invece è che l'attività di NAG è inibita da urea endogena e da un numero elevato di nefrotossine come molti metalli pesanti.

β 2-MICROBULINA (β 2M) è una proteina di 11,8 kDa ed è presente sulla catena leggera delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, che a sua volta è espresso sulla superficie di tutte le cellule nucleate.

β 2M è filtrata dai glomeruli e quasi interamente riassorbita dalle cellule tubolari prossimali, tale processo può essere ostacolato dalla presenza di AKI. Un aumento dell'escrezione nelle urine di β 2M è stato osservato a seguito di esposizione a nefrotossine, trapianto renale e a seguito di cardiocirurgia, facendo sì che venisse considerato un biomarcatore precoce del danno tubolare, il suo aumento nelle urine infatti precede di 4-5 giorni l'aumento di creatinina nel siero. Purtroppo l'utilizzo della β 2M nella valutazione del danno renale è stato ostacolato dalla instabilità che questa molecola ha nelle urine. La molecola viene facilmente degradata, infatti, a temperatura ambiente e in urine con pH inferiore a 6,0.

α 1-MICROGLOBULINA (α 1M) è una proteina di 27-33 kDa sintetizzata dal fegato. La forma libera è prontamente filtrata dal glomerulo e riassorbita dalle cellule del tubulo prossimale. A differenza di β 2M, α 1M è stabile anche a pH differenti, inoltre si è dimostrato essere un biomarcatore sensibile e molto precoce delle disfunzioni del tubulo prossimale, la sua concentrazione infatti aumenta a seguito di lesioni iniziali del rene quando il danno istologico ancora non è evidenziabile [111].

CYSTATINA-C è una proteina di 13KDa non glicosilata, appartenente alla superfamiglia degli inibitori delle proteasi a cisteina, prodotta e rilasciata nel sangue con una velocità

costante da tutte le cellule nucleate. E' filtrata a livello glomerulare, riassorbita e completamente catabolizzata dai tubuli renali Questa molecola è un ottimo indicatore della funzionalità renale. Purtroppo le sue piccolissime dimensioni ed il completo metabolismo a livello tubulare non la rendono rilevabile nell'urina. Inizialmente si credeva che la concentrazione della molecola fosse indipendente da età, sesso, massa muscolare o variazioni nella dieta, solo recentemente si è dimostrato che non è così, infatti alti livelli, sopra la norma, di cistatina-C si sono ritrovati in pazienti maschi, anziani, molto alti e di peso aumentato, con l'abitudine al fumo ed elevati livelli di proteina C reattiva. A differenza però di creatinina ed urea, la cistatina-C gode di due caratteristiche peculiari: pazienti con danno renale acuto mostrano nel sangue livelli aumentati della molecola, anche del 50% rispetto ai valori basali e con un anticipo sulla creatinina di 2-3 giorni; pazienti con danno renale mostrano con una certa facilità cistatina-C nelle urine, fenomeno invece assente, come precedentemente detto, nel paziente sano [110].

La MICROALBUMINA da tempo è stata definita come un utile marcatore di sviluppo e progressione di patologie renali, in particolare nefropatia indotta da diabete.

Storicamente, si pensava che la microalbuminuria derivasse da alterazioni della filtrazione glomerulare, da variazioni della pressione intraglomerulare o da modifiche strutturali dei podociti. Studi recenti sui ratti però hanno dimostrato che nella normale filtrazione glomerulare si potrebbero rilasciare livelli più alti di albumina rispetto a quello che si pensava. Un aumento della concentrazione di microalbumina è stato rilevato anche a seguito di trattamento con agenti chemioterapici nefrotossici quali Cisplatino e Metotrexato, o con antibiotici a breve e lungo termine come la Gentamicina. Lo svantaggio nell'utilizzo della microalbumina come marcatore sta nel fatto che la sua concentrazione può aumentare anche a seguito di attività fisica intensa, ematuria o infezioni del tratto urinario [111].

KIM-1 (Kidney injury molecule 1) è una glicoproteina di membrana caratterizzata da un dominio Ig-like e da uno mucin-like, entrambi posti nel versante extracellulare, ed è conosciuta anche come recettore cellulare del virus dell'epatite A (HAVCR). In condizioni fisiologiche, KIM-1 è espressa dall'epitelio del tubulo prossimale in minima quantità e non risulta rilevabile nelle urine. In studi preclinici e clinici è stato dimostrato che KIM-1 urinario è una molecola sensibile e specifica per danno renale acuto. Studi su animali indicano che l'espressione di KIM-1 aumenta ogni volta che il rene è sottoposto ad un insulto di natura ischemica o tossica che causi una dedifferenziazione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

Recentemente è stato dimostrato che mRNA di KIM-1 aumenta in caso di danno tubulare più di qualsiasi altro gene conosciuto e che in caso di danno tubulare prossimale il dominio extracellulare di KIM-1 è clivato da una metalloproteasi ed eliminato con le urine dove può essere quantificato. Poiché nessun altro organo produce KIM-1 in quantità significative, questa molecola risulta altamente specifica di danno renale. In tutti i lavori la misurazione dei valori urinari di KIM-1 risulta un metodo sensibile e specifico per individuare il danno. Inoltre, a differenza di NGAL, i livelli urinari di KIM-1 non sono influenzati da infezioni del tratto urinario o da una nefropatia cronica sottostante, tuttavia nelle fasi estremamente precoci di danno renale KIM-1 ha mostrato una sensibilità inferiore paragonata a NGAL [112]. Per questo motivo è stato dimostrato che la misurazione combinata di KIM-1, NAG e NGAL, consente la diagnosi precoce di danno renale acuto molto prima dell' aumento di creatinina sierica [113].

La CLUSTERINA è una glicoproteina multiforme così chiamata a causa della sua capacità di suscitare raggruppamento (clustering) delle cellule del Sertoli. L'espressione di Clusterina è indotta dal rene a seguito di danno renale causato da agenti tossici, ostruzione ureterale, o nefrectomia totale parziale. La clusterina, come Kim-1, è espressa dalle cellule tubulari

dedifferenziate a seguito di danno renale o a seguito di patologie come rene policistico e carcinoma. La forma umana nucleare della clusterina (nCLU) è pro-apoptotica e la forma secretoria (sCLU), che è upregolata in risposta a qualsiasi stress molecolare, è antiapoptotica promuovendo quindi la sopravvivenza cellulare. Risultati recenti dimostrano che farmaci mirati alla forma secretoria antiapoptotica di clusterina possono diventare strumenti promettenti per la terapia del cancro, specialmente nel trattamento di tumori che iperesprimono sCLU, come quelli del rene, prostata, colon, seno e polmoni. La concentrazione di clusterina si misura tramite metodo radioimmunologico, inoltre aumenti dell'espressione di questa proteina sono stati collegati ad aumenti nell'espressione di NAG e di creatinina sierica in un modello di danno renale indotto da Gentamicina.

L'IL-18 è una citochina proinfiammatoria rilasciata in risposta a un danno. Il suo coinvolgimento è stato descritto in numerose malattie infiammatorie, che coinvolgono diversi tessuti, come l'artrite infiammatoria, sclerosi multipla, malattia infiammatoria intestinale, epatite cronica, lupus sistemico eritematoso, e psoriasi. Studi su pazienti con allotrapianto di rene hanno mostrato come elevati livelli urinari di IL-18 predicano la comparsa di una necrosi tubulare acuta sino a 24-48 ore prima che i tradizionali strumenti clinici, in particolare la creatininemia, si alterino o che compaia una insufficienza clinicamente evidente. A seguito di danno renale acuto il precursore di IL-18(24 kDa) è enzimaticamente scisso mediante l'enzima di conversione IL-1 β in modo da produrre la forma matura di IL-18 (18-kDa).

L' OSTEOPONTINA (OPN) è una fosfoproteina di 44-kDa sintetizzata a più alti livelli nell'osso e nel tessuto epiteliale. La forma epiteliale di OPN si trova ad alti livelli nelle urine umane e si pensa che agisca come inibitore della formazione di ossalato di calcio, contribuendo a prevenire la precipitazione minerale. OPN è anche associata a una serie di altre funzioni, quali ad esempio regolazione della funzione osteoclastica durante la formazione dell'osso, genesi tumorale, accumulo di macrofagi e protezione verso il processo

di apoptosi. OPN è espressa nei reni sani di uomo e topo in modo specifico a livello dei rami ascendenti dell'ansa di Henle e del tubolo distale, ma può essere espressa a livello di tutti i segmenti glomerulari e tubulari a seguito di danno renale. Sono stati rilevati livelli elevati di mRNA di OPN in biopsie renali di pazienti con ipertensione e arteriosclerosi in associazione con un aumento dell'espressione di α -actina da parte dei fibroblasti interstiziali e una maggiore deposizione di collagene di tipo IV.

OPN è anche significativamente over-espressa in modelli sperimentali di danno renale causati da Gentamicina, Cisplatino, Ciclosporina e Sevoflurano [111].

Diversi studi hanno dimostrato che OPN promuove l'accumulo dei macrofagi, e potrebbe così giocare un ruolo importante nel danno renale indotto dai macrofagi.

D'altra parte però, OPN ha anche un'azione renoprotettiva, ad esempio aumenta la tolleranza verso ischemia acuta, inibendo l'ossido nitrico e riducendo i livelli di perossido, e promuove la sopravvivenza delle cellule esposte ad ipossia, diminuendo l'apoptosi e partecipando alla rigenerazione delle cellule.

L'ormone paratiroideo, vitamina D, calcio, fosfato e alcune citochine aumentano l'espressione di OPN in vitro o in vivo, mentre gli ormoni sessuali femminili, gli ACE-inibitori e gli antagonisti del recettore dell'angiotensina II diminuiscono l'espressione di OPN in alcune forme di danno renale [114].

Le proteine di legame degli acidi grassi (FABPs) sono piccole proteine citoplasmatiche di 14 kDa, abbondantemente espresse nei tessuti con un attivo metabolismo degli acidi grassi. Due tipi di FABPs sono state isolate dal rene umano. Il tipo di FABP del fegato (L-FABP) è riassorbita dal tubulo prossimale mediante endocitosi megalina-dipendente ed è localizzata nel citoplasma delle cellule del tubulo prossimale, nel fegato e nell'intestino tenue. In topi transgenici L-FABP, i livelli nelle urine di questa proteina ha permesso di identificare in maniera accurata e precoce danni sia istologici che funzionali nell'AKI indotto da ischemia.

La lipocalina granulocitaria associata alla gelatinasi, meglio conosciuta come Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), è una proteina di piccole dimensioni (circa 25.000 dalton) della famiglia delle lipocaline. Inizialmente NGAL venne identificata nei neutrofili, a seguito dell'attivazione dei recettori toll-like. Successivamente, nuove scoperte evidenziarono che le cellule tubulari renali sono capaci di produrre NGAL entro poche ore dall'instaurarsi di un evento dannoso. NGAL ha una funzione di trasporto di sostanze lipofiliche (ad esempio vitamina E e acido arachidonico), del ferro ed è coinvolto nella differenziazione delle cellule epiteliali tubulari e dei nefroni. Diversi studi animali di danno ischemico renale in seguito a ri-perfusione evidenziarono che il gene di NGAL fosse tra i 7 geni altamente sovra-regolati e la proteina facilmente rilevabile nelle urine entro due ore dal danno ischemico [111].

1.25 CELLULE PRIMARIE NUOVO MODELLO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DI NEFROTOSSICITÀ INDOTTA DA FARMACI.

Il costo impressionante per portare un farmaco sul mercato, unito all'elevato tasso di fallimenti dei potenziali composti, a causa dell'inaspettata tossicità per l'uomo nelle prime fasi cliniche, rendono indispensabile lo sviluppo di modelli per meglio predire la tossicità dei farmaci più rilevanti per l'essere umano. La nefrotossicità indotta dai farmaci rimane particolarmente difficile da predire sia nelle fasi pre-cliniche che in quelle cliniche e passa spesso inosservata finché il paziente non dev'essere ricoverato. Si stima che ci vogliono 9 anni e costi tra gli 0.8 e 1.7 miliardi di dollari per portare un farmaco attraverso i trial clinici, e che circa l'8% dei farmaci che entrano nella fase I raggiungeranno poi il mercato. Questo basso tasso è causato da diversi fattori, tra i quali la mancanza di metodi ben consolidati in grado di prevedere con precisione l'utilità clinica e la tossicità dei farmaci durante lo sviluppo pre-clinico. Attualmente gran parte degli studi di tossicità indotta da farmaci si basano su

esperimenti su modelli animali quali ad esempio i roditori. I modelli animali offrono il vantaggio di un sistema complesso tuttavia, la biologia animale differisce per molti aspetti da quella umana a causa delle differenze fisiologiche ed ambientali, rendendoli così in grado di prevedere le risposte umane solo in una certa misura. Oltretutto i test su, ad esempio, i roditori, vengono effettuati un gran numero di volte e con animali altamente ordinati con gli stessi background genetici, età, fattori ambientali e stati di malattia. Inoltre solo il 50% della tossicità in roditori è predittiva di tossicità nell'uomo. Queste condizioni non possono venir riprodotte e controllate nell'uomo, soprattutto nelle prime fasi cliniche. A questo va aggiunto che nel caso di nefrotossicità indotta da farmaci, le persone più sensibili sono quelle con condizioni renali insufficienti o quelle già in trattamento con farmaci nefrotossici. Queste persone non vengono normalmente incluse negli studi clinici e così la loro risposta si saprà solo quando verranno trattati con un farmaco approvato.

Per tutti questi motivi risulta sempre più importante sviluppare nuovi modelli sperimentali, lo scopo di questa tesi infatti è quello di proporre le colture primarie di rene come modello per la valutazione della tossicità indotta da farmaci, grazie alla quantificazione di biomarcatori di tossicità renale quali in particolare l'osteopontina e KIM-1, valutazione di cambiamenti in eventi cellulari quali apoptosi, necrosi e proliferazione a seguito della somministrazione del farmaco e identificazione dei danni indotti a livello di organelli cellulari come ad esempio mitocondri e i lisosomi. Le colture cellulari derivano direttamente dal tessuto animale o umano; le cellule isolate da un qualsiasi tessuto sono in grado di compiere un numero finito di divisioni cellulari in vitro, dopodiché vanno incontro a degenerazione e morte. Tale fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita e si indica come senescenza. Le applicazioni delle cellule primarie sono svariate e comprendono: studi di fenomeni legati alla crescita, differenziamento e morte cellulare, studi genetici, studio dei meccanismi cellulari/molecolari coinvolti nelle funzioni cellulari, strumenti per la biologia

molecolare (amplificazione genica, produzione o estrazione di proteine), test di tossicità e strumenti per la terapia (terapia genica, cellule staminali, terapia cellulare).

In questo lavoro di tesi in particolare sono state utilizzate cellule corticali di rene ottenute da topo, ratto e uomo, le cellule prossimali e distali sono state isolate ottenendo così una popolazione eterogenea.

I vantaggi nell'utilizzo di questa metodica per studi tossicologici sono svariati :

- Riduzione notevole della sperimentazione animale
- Standardizzazione facile del protocollo
- Elevata riproducibilità
- Larga disponibilità di tipi cellulari
- Controllo della variabili ambientali quali ad esempio pH e temperatura
- Semplicità d'uso e costi limitati
- Possibilità di valutare in breve tempo gli effetti di un numero considerevole di molecole
- Monitoraggio della tossicità in una cellula molto vicina allo stato in vivo
- Tossicità in uomo e possibilità di valutare le varie tossicità tra specie.

Lo svantaggio nell'utilizzo di questo modello sperimentale però sta nel fatto che spesso non si può fare a meno di valutare l'effetto della molecola su un modello sperimentale in vivo, poiché molecole fortemente attive in vitro possono poi risultare molto meno attive o addirittura inattive in vivo. La necessità di passare dalle colture cellulari a un sistema più complesso è legata ai limiti intrinseci degli studi farmacologici in vitro. Infatti, l'attività di un farmaco è funzione di diversi parametri di cui non si tiene conto in un sistema cellulare, quali l'assorbimento, la distribuzione, le concentrazioni ottenibili nell'organo e nella cellula bersaglio, il metabolismo e l'escrezione. In generale, le colture cellulari sono sistemi statici in cui spesso la concentrazione intra ed extracellulare della molecola in esame non varia

significativamente nel corso del periodo di osservazione; è quindi del tutto possibile che le concentrazioni e i tempi di esposizione ai quali un'attività farmacologica è osservabile non abbiano grande relazione con la situazione in vivo.

Nonostante questo svantaggio, ovvero la necessità di confermare i risultati ottenuti in vitro anche su modelli in vivo, le colture cellulari rappresentano uno strumento importante per lo screening preliminare di numerose molecole farmacologiche, la loro semplicità e riproducibilità permettono infatti di poter analizzare meccanismi sia cellulari che molecolari, e di ridurre al minimo la sperimentazione animale [115].

Diversi lavori hanno dimostrato come le cellule primarie di rene umano rappresentino un valido modello per lo studio dei meccanismi di trasporto e di regolazione di diversi composti xenobiotici, valutando ad esempio l'espressione di trasportatori di membrana e il meccanismo con il quale i composti xenobiotici causano nefrotossicità [116].

Alla luce dei risultati ottenuti in letteratura, quindi, lo scopo di questa tesi è quello di utilizzare tale modello sperimentale per la valutazione e la quantificazione della nefrotossicità indotta da farmaci grazie allo studio di biomarcatori di danno renale precoce.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 PREPARAZIONE DI VESCICOLE DI MEMBRANA DI BRUSH-BORDER DI RENE DI RATTO

Da cinque ratti sacrificati, si prelevano i reni. Da ciascun rene, con l'ausilio di un bisturi, si tagliano delle sottili fettine della zona corticale; da ogni rene si ottiene circa un grammo di materiale. Dieci grammi di fettine di corteccia così ottenuti vengono messi in un becker contenente una soluzione isotonica di tampone T1 contenente saccarosio 0.3 M, Tris/HCl (Idrossimetilamminometano/HCl) 12 mM (pH 7.4) ed EGTA (Glicoletilene-bis(2-amminoetil)-N,N,N',N'-acido tetraacetico) 5 mM, alla temperatura di circa 4°C. Il saccarosio è necessario per evitare che ci sia uno sbilanciamento di pressione osmotica e quindi la lisi delle vescicole di membrana plasmatica per ingresso di acqua, il Tris/HCl pH 7.4 consente di mantenere il pH fisiologico (valore di pH al quale è mantenuta la funzionalità e lo stato nativo delle proteine) ed, infine, l'EGTA serve a chelare eventuali ioni, presenti nella soluzione. Il tessuto viene ulteriormente tagliato con le forbici in modo da ridurlo a pezzetti piccolissimi, e lavato con la stessa soluzione di saccarosio, in modo da eliminare la maggior quantità possibile di sangue presente nel campione. Al tessuto vengono quindi aggiunti 60 ml del tampone T1 diluito 1:5, ed il tutto viene frullato per tre minuti. Il frullatore è costituito da un contenitore di vetro dalle pareti incavate, con all'interno lame d'acciaio inclinate con diversi angoli, per permettere la massima efficienza di sminuzzamento del campione. All'omogenato così ottenuto (circa 80 ml) si aggiungono 21 ml di MgCl₂ 12 mM finale. Si agita la sospensione e si lascia a riposo per 15 minuti in ghiaccio a 4 °C. La funzione dell'MgCl₂ è quella di separare la membrana apicale (brush border) da quella basolaterale. Tutte le operazioni finora descritte vanno effettuate in camera fredda, in quanto molte componenti cellulari sono termolabili. Trascorsi i quindici minuti, l'omogenato viene suddiviso equamente in sei provettoni da 250 ml che, inseriti in un apposito rotore da centrifuga (una centrifuga eppendorf 5810R, con rotore F 34-6-38), vengono sottoposti ad un campo

centrifugo corrispondente a 1600 g (4500 rpm) per quindici minuti. Questo metodo di centrifugazione differenziale si basa sulla diversa velocità di sedimentazione di particelle con diversa forma e densità, per cui l'omogenato di tessuto che deve essere suddiviso nelle sue varie componenti, viene separato in un certo numero di frazioni per centrifugazioni successive, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato. Per ogni passaggio, il valore di campo centrifugo applicato viene scelto in modo da generare nel tempo predeterminato, la sedimentazione di un particolare componente della miscela. Il sedimento ottenuto da questa prima centrifugazione contiene globuli rossi, cellule intatte, nuclei, frammenti di membrana cellulare, mitocondri e strutture pesanti delle cellule; viceversa le particelle più leggere, tra cui le vescicole di membrana di brush-border, vengono mantenute in sospensione, cioè costituiscono il sovrinatante. Tale sovrinatante viene versato in provettoni da 250 ml ciascuno che, inseriti nell'apposito rotore, vengono sottoposti ad un campo centrifugo corrispondente a 12000 g per trenta minuti. Il sovrinatante ottenuto da questa nuova centrifugazione viene eliminato poiché, in questo caso, contiene altri organelli e componenti cellulari; le vescicole di brush-border, invece, si trovano nel pellet che, a questo punto, viene risospeso con 30 ml del tampone T1 diluito 1:2. La sospensione viene omogeneizzata utilizzando un pestello in teflon ad estremità arrotondate del diametro di 2.5 cm, mosso a mano all'interno di un tubo di vetro della stessa dimensione e forma del pestello. Il tessuto è forzato a passare tra le pareti del tubo di vetro, che viene mantenuto fermo, mentre il pistone mobile ruota. Lo spazio libero tra il pestello e la parete del tubo è mantenuto entro dimensioni precise, di solito comprese fra 0.05 mm e 0.5 mm, in modo da non distruggere gli organuli intaccellari e le vescicole di membrana. Le forze frizionali che si generano sono maggiori alla superficie del pestello e minori vicino alle pareti del tubo e dipendono, anche se in misura minore, dalla velocità di rotazione del pestello. Il tubo di vetro è tenuto immerso in ghiaccio durante il processo di omogeneizzazione, in modo da limitare l'innalzamento della

temperatura e, quindi, evitare la denaturazione delle proteine. All'omogenato ottenuto si aggiunge la soluzione di $MgCl_2$ 12 mM finale, e si lascia a riposo per quindici minuti. Trascorso questo lasso di tempo, ha inizio il processo di lavaggio, vale a dire che il solubilizzato viene nuovamente suddiviso in tubi da centrifuga e sottoposto ad un campo centrifugo corrispondente a 1600 g per quindici minuti. Questa volta si recupera il sovrantante, che viene ulteriormente sottoposto ad un campo centrifugo pari a 12000 g per trenta minuti. Il pellet così ottenuto viene risospeso con 30 ml della soluzione T1 diluita 1:2, e sottoposto ad un nuovo ciclo di omogeneizzazione, utilizzando il potter di vetro ed il pestello. Il solubilizzato viene sottoposto per l'ultima volta all'azione di un campo centrifugo di 12000 g per trenta minuti, trascorsi i quali, si elimina il sovrantante e si recupera il pellet con 1 ml di soluzione T1 (diluita 1:2). A questo punto la sospensione è suddivisa in aliquote da 50 μ l in provette di tipo eppendorf. Queste preparazioni vengono conservate a -20 °C, anche per periodi lunghi di tempo, e scongelate al momento della solubilizzazione.

2.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE NEI

BRUSH-BORDER

La quantità di proteine presenti nelle preparazioni di brush-border, è determinata con il metodo del reattivo del Biuretto. Tale reattivo è costituito da una soluzione alcalina di solfato di rame contenente tartrato di sodio e potassio. Gli ioni rameici formano un complesso di coordinazione con quattro gruppi $-NH$ presenti in altrettanti legami peptidici, sviluppando una reazione colorimetrica che dà un picco di assorbanza alla lunghezza d'onda di 564 nm. Il metodo, essendo basato sull'interazione degli ioni rameici con i legami peptidici, è universale e molto riproducibile. Il principale svantaggio è nella scarsa sensibilità, non dimostrandosi adeguato nella misurazione di concentrazioni inferiori a 1 mg/ml. Tale reattivo è preparato sciogliendo 45 g di tartrato di sodio e potassio in 200 ml di NaOH 0.2 M, in un pallone da un

litro; a questa soluzione si aggiungono 15 g di $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e si agita bene fino ad ottenere una soluzione omogenea. Per il dosaggio delle proteine si preparano soluzioni contenenti 10 μl di sospensione di brush-border, 50 μl di colato di sodio al 3%, 1 ml di reattivo del Biureto. Le miscele così preparate, dopo agitazione, vengono riscaldate a bagno-maria per 15 minuti, al riparo dalla luce; a questo punto si legge l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 564 nm, che è il valore al quale il complesso, formato dalle proteine con lo ione Cu^{2+} in ambiente alcalino, assorbe. Utilizzando una scala di taratura ottenuta con varie concentrazioni note (comprese tra 0.2 μg e 4 μg) di albumina di siero bovino, si risale alla concentrazione incognita delle proteine.

2.3 SOLUBILIZZAZIONE DEL TRASPORTATORE OCTN2

Il processo che precede la ricostituzione prende il nome di solubilizzazione. Le preparazioni di brush-border, conservate a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in aliquote da 50 μl , vengono scongelate e mantenute in ghiaccio ad una temperatura di $4\text{ }^\circ\text{C}$. Ad esse vengono aggiunti 80 μl di C_{12}E_8 al 3%; questa operazione deve essere molto rapida in modo da evitare qualsiasi processo di denaturazione. Il C_{12}E_8 (dodecilottaossietilenetere) è un detergente non ionico, ossia una molecola anfipatica, formata nella sua struttura lineare, da una testa polare costituita da un polietere che prende contatto con l'ambiente e le porzioni idrofiliche della proteina di membrana, ed una coda idrofobica che interagisce con la porzione lipofila del trasportatore. Il processo di solubilizzazione porta alla formazione di micelle costituite dal detergente e dalla proteina che, in questo modo, resta in soluzione nella sua conformazione nativa, anche dopo estrazione dalla membrana plasmatica. La sospensione, dopo agitazione su vortex, viene sottoposta per 5 minuti all'azione di un campo centrifugo di 6000 g. Prelevato il sovrinatante, si procede alla ricostituzione.

2.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE NEI CAMPIONI

La concentrazione delle proteine presenti nei campioni, misurata dopo la solubilizzazione, è determinata con il metodo del Lowry (Folin-Ciocalteu). Il gruppo fenolico dei residui tirosinici di una proteina, quando reagisce con il reattivo di Folin-Ciocalteu, sviluppa una reazione colorimetrica, con un picco di assorbimento ad una lunghezza d'onda di circa 660 nm. Questo reattivo è formato da una miscela di tungstato, molibdato e fosfato di sodio. Questo metodo è sensibile fino a concentrazioni di 10 µg/ml ed è probabilmente il più diffuso, malgrado sia un metodo soggetto ad interferenze da parte di alcune sostanze come Tris, tamponi dipolari quali Pipes ed HEPES, ed EDTA e richiede un tempo di incubazione preciso per avere dati riproducibili. La reazione, inoltre, dipende dal pH ed è indispensabile avere un pH compreso tra 10.0 e 10.5. Il principio su cui si basa il saggio si pensa sia la produzione di ioni rameici, che riducono il reattivo di Folin-Ciocalteu.

La soluzione di Lowry (Folin- Ciocalteu) è costituita da una miscela contenente:

- 6.6 ml di Na₂CO₃ al 2% in NaOH 0.1 M;
- 0.075 ml di tartrato di sodio e potassio all'1%;
- 0.075 ml di CuSO₄ • 5H₂O allo 0.5%;
- 0.75 ml di SDS al 10%.

La proteina solubilizzata in C₁₂E₈ al 2% oppure in un tampone contenente solfato di sodio 20 mM, Pipes 10 mM e Triton X 100 al 3% (TNS), viene diluita di 10 volte. Da questa soluzione si preparano tre prove da 5 µl, 10 µl e 40 µl. A queste prove si aggiunge H₂O, fino ad un volume finale di 50 µl. Importante è anche preparare una prova di controllo in cui non viene messa la proteina, ma solo 50 µl del detergente usato per la solubilizzazione. In questo modo sarà possibile valutare l'assorbanza del detergente e quindi sottrarre questo valore all'assorbanza ottenuta dall'analisi dei singoli campioni in cui sono presenti sia proteine che

detergente. Ad ogni prova si aggiunge prima 1 ml del reattivo del Lowry, si attende per 15 minuti e successivamente si aggiungono 100 μ l del reattivo di Folin (1 Folin : 2 H₂O). Si attende per altri 30 minuti, facendo avvenire la reazione al buio, ed infine si legge l'assorbanza di ogni prova allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 546 nm. Tramite una scala di taratura, ottenuta con varie concentrazioni note di proteina standard, generalmente albumina bovina sierica, si risale alla concentrazione incognita della proteina.

2.5 PURIFICAZIONE DI hOCTN1 OVER-ESPRESSO: CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Per maneggiare proteine over-espresse, al fine di poterne studiare la funzione, è necessario eseguire una serie di procedimenti sperimentali e sfruttare quindi tecniche quali: la centrifugazione, l'elettroforesi e la cromatografia che consentano di purificare la proteina di nostro interesse, in altre parole isolarla da un pool di proteine batteriche, presenti in un lisato, sfruttando le sue caratteristiche chimiche e fisiche. La cromatografia permette di separare le proteine contenute in una miscela, sfruttando la differente affinità nei confronti della fase stazionaria e della fase mobile; in questo modo le proteine più affini alla fase stazionaria verranno trattenute e rallenteranno la loro corsa, mentre quelle più affini alla fase mobile attraverseranno il sistema cromatografico più velocemente ed eluiranno in tempi più brevi. La tecnica di purificazione utilizzata in questo lavoro è eseguita attraverso una cromatografia su colonna per affinità in cui la separazione avviene in base all'interazione reversibile tra la proteina di interesse, o una porzione di questa, e un ligando specifico accoppiato alla matrice cromatografica. Nel caso in esame, la proteina over-espresa è stata ottenuta fusa con una coda di poli-istidine in grado di legare ioni Nichel immobilizzati nella fase stazionaria, costituita da agarosio; questo legame è dovuto alla caratteristica dell'amminoacido istidina di avere una forte affinità di legame per ioni metallo, quindi per il nichel immobilizzato sulla

matrice. Quel che accade è che i gruppi elettrondonatori, presenti sull'anello imidazolico dell'istidina, formano rapidamente legami di coordinazione con il metallo immobilizzato, trattenendo così la proteina. Il metodo di eluizione della proteina legata alla matrice può variare; nell'eluizione per spiazzamento, ad esempio, aggiungendo imidazolo fresco al tampone di eluizione si creerà una competizione con l'anello imidazolico dell'istidina per il legame con il nichel che provocherà il distacco della proteina che verrà perciò eluita. È importante, in queste fasi, creare un gradiente crescente di imidazolo, per permettere alle proteine legate in maniera aspecifica alla fase stazionaria di essere allontanate. La resina utilizzata nella purificazione di SLC22A4 (OCTN1) è la "HIS select Nickel Affinity Gel" della Sigma; la fase stazionaria di questa resina è costituita da sfere di agarosio al 6%, complessate con nichel chelato, in grado di legare proteine ricombinanti con tag di istidina in condizioni native o denaturanti. La capacità di legame della resina è pari a 15 mg di proteina per ogni millilitro di resina impaccata. Il letto cromatografico utilizzato è rappresentato da una colonnina di vetro "Glass Econo-Column" della Bio-Rad, lunga 5 cm e spessa 0.5 cm; tale colonnina è collegata ad una pompa peristaltica della GE Healthcare a singolo canale peristaltico con un range di velocità di flusso pari a 0.8-1 ml/min.

Il protocollo utilizzato per la purificazione di OCTN1 consiste di tre fasi:

➤ Preparazione della colonna cromatografica;

La colonna è collegata alla una pompa peristaltica e lavata con acqua bidistillata e degassata; dopodiché si impaccano 500 µl di resina successivamente lavati con tre volumi di colonna di acqua bidistillata e degassata, per eliminare l'eccesso di etanolo al 30% in cui la resina è conservata e che ha la funzione di preservarla dalla contaminazione da parte di muffe. Dopo aver eliminato l'etanolo, la colonna viene tamponata con 8 ml del seguente buffer degassato:

- Tris/HCl 20 mM pH 8;
- NaCl 200 mM;
- Glicerolo 10%;

- Sarkosyl 0.1%.

➤ Preparazione del campione:

Si centrifugano 3 ml di lisato di Rosetta Gami 2 (DE3) in cui è stato espresso OCTN1, per 5 minuti a 12000 RPM a 4°C. Il pellet che si forma viene risospeso con 500 µl di Tris/HCl 0,1M (per ogni 500 µl di lisato) a pH 8.0 e poi nuovamente centrifugato sempre per 5 minuti a 12000 RPM a 4°C. Il secondo pellet ottenuto viene risospeso con una serie di composti con varie funzioni: 100 µl di un reagente riducente (DTE 100 mM), 400 µl di una soluzione di Urea 8M e 54 µl di una soluzione di Sarkosyl al 10% ed infine il tutto viene diluito a 1.1 ml utilizzando lo stesso buffer usato per tamponare la resina (tampone Sarkosyl). La soluzione ottenuta è centrifugata per 10 minuti a 12000 RPM a 4°C, dopodiché il sovrinatante viene prelevato e caricato sulla colonna cromatografica.

➤ Corsa cromatografica ed eluizione del campione:

Dopo aver caricato il campione, le proteine fuse con il tag di 6 istidine saranno trattenute dalla fase stazionaria, mentre tutte le altre saranno eluite. Per allontanare tutte le proteine che non si sono legate alla resina o che si sono legate in maniera aspecifica, la colonna è lavata con 5 ml di uno specifico buffer di lavaggio. Si procede, in seguito, caricando prima 3 ml del primo tampone di eluizione contenente imidazolo ad una concentrazione di 10 mM. L'eluizione della proteina dalla colonna si esegue aggiungendo il tampone contenente Imidazolo 50 mM. I tamponi di lavaggio e di eluizione degassati sono così composti:

Tampone di lavaggio

- Tris/HCl 20mM pH 8;
- NaCl 200mM;
- Glicerolo 10 %;
- Triton-X100 0.1 %;

Tampone di eluizione Imidazolo 10mM

- Tris/HCl 20mM pH 8;
- NaCl 200mM
- Glicerolo 10 %;
- Triton-X100 0.1 %;
- Imidazolo 10mM.

Tampone di eluizione Imidazolo 50Mm

- Tris/HCl 20mM pH 8;
- Glicerolo 10 %;
- Triton-X100 0.1 %;
- Imidazolo 50mM.

2.6 PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI

I liposomi vengono preparati solubilizzando 1 g di fosfolipidi (Fluka), parzialmente purificati e contenenti il 60% di L- α -fosfatidilcolina, in 10 ml di acqua all'interno di un becker. La sospensione ottenuta viene sottoposta ad un'agitazione costante per circa 2 ore in camera fredda, ad una temperatura di 4 °C, in modo da risultare omogenea e facilitare, quindi, le successive fasi ricostitutive. Alla fine di questa procedura, si preparano aliquote di circa 1 ml in provette tipo eppendorf conservate a -20 °C, per evitare che i fosfolipidi perdano le loro caratteristiche chimiche alterando le successive fasi di ricostituzione della proteina. La sospensione di fosfolipidi, al momento dell'utilizzo, viene scongelata lentamente a temperatura ambiente e sonicata con un sonicatore Branson alla potenza di 40 watt, a 4°C (in quanto la sonicazione sprigiona calore che potrebbe alterare i fosfolipidi), per 2 minuti in "pulse" di 0.3 s con intervalli di 0.7 s. La sonicazione è un processo che sfrutta gli ultrasuoni per creare, in pochi minuti, liposomi unilamellari, a partire dalle strutture multilamellari in cui

sono associati i fosfolipidi. Questi ultimi, infatti, in ambiente acquoso, si assemblano spontaneamente a formare delle vescicole sferiche, energeticamente stabili, dette liposomi con un diametro medio di circa 50 nm, benché presentino dimensioni varie. Si tratta di sistemi artificiali molto simili alle membrane biologiche che, come queste, presentano una membrana costituita da un doppio strato fosfolipidico. Le teste polari idrofiliche sporgono, quindi, sia verso il mezzo acquoso esterno che verso il compartimento interno, instaurando legami a idrogeno con le molecole di acqua. Le code lipidiche, al contrario, interagiscono tra loro nel bilayer, mediante interazioni idrofobiche non covalenti.

2.7 INCORPORAZIONE DELLA PROTEINA OCTN2 NEI LIPOSOMI: RICOSTITUZIONE

Una volta che la proteina è solubilizzata, deve essere inserita nelle membrane liposomiali, dove potrà essere studiata. Il processo di incorporazione nei liposomi delle proteine solubilizzate prende il nome di ricostituzione. Ciò significa che la proteina verrà inserita all'interno della membrana dei liposomi. In tale sistema artificiale si ha il vantaggio di eliminare le interferenze determinate da tutte le altre proteine di membrana. In questi esperimenti, la ricostituzione viene effettuata mediante il metodo della rimozione del detergente attraverso passaggi ripetuti su resina idrofobica XAD-4 (Fluka). La procedura consiste nella rimozione del detergente da una miscela di micelle miste, costituite essenzialmente da detergente, proteine e fosfolipidi.

Le micelle si formano perché i detergenti, possedendo una porzione idrofilica e una porzione idrofobica, possono intercalarsi fra le proteine e i fosfolipidi, visto e considerato che si tratta di molecole piccole e con ridotte teste polari.

La composizione della miscela di partenza, in un volume totale di 700 µl è la seguente:

- 50 µl di proteina solubilizzata in C₁₂E₈ al 3%;

- 95 ml di detergente C₁₂E₈ al 10%;
- 100 µl di liposomi (10 mg di fosfolipidi);
- L-carnitina 15 mM
- Hepes/Tris 20 mM a pH 6.0;
- H₂O bidistillata degassata fino a raggiungere il volume di 700 ml.

Dopo adeguata agitazione su vortex, questa miscela viene passata 15 volte attraverso una colonna di resina XAD-4 pre-equilibrata con un tampone, la cui composizione è scelta in base a quella della miscela di partenza, in modo da bilanciare la pressione osmotica, evitando la lisi dei proteoliposomi e facilitando il corretto inserimento della proteina nella membrana artificiale.

Al termine dei 15 passaggi previsti per la ricostituzione di OCTN2, il detergente è stato allontanato e l'eluato contiene i liposomi con la proteina incorporata in membrana (analogamente alle situazioni native cellulari) e le altre molecole della miscela al loro interno. Tutte le operazioni sono effettuate a temperature comprese fra i 20 °C e i 30 °C.

2.8 PREPARAZIONE DELLE COLONNE XAD-4

La resina amberlite XAD-4 (Fluka), utilizzata nella preparazione delle colonne XAD-4, è idrofobica ed appartiene agli adsorbenti polistirenici non polari. Questi ultimi sono particolarmente usati per l'adsorbimento, dalle soluzioni acquose, di sostanze non polari o agenti tensioattivi. La resina, usata per rimuovere detergenti non ionici, presenta pori con diametro di circa 40 Å. L'adsorbente è neutro, composto da un gran numero di microsferi altamente intrecciate, tali da formare una struttura microreticolare che conferisce alla resina un'elevata area superficiale e una porosità abbastanza uniforme. Prima di preparare le colonne XAD-4 per la cromatografia, la resina deve essere lavata per quattro volte in volume di metanolo pari a circa due volte quello della resina in modo da eliminare l'aria presente nei

pori della resina stessa, e poi risciacquata con acqua bidistillata fino alla scomparsa del metanolo. Terminata la procedura di lavaggio la resina viene conservata, sempre in acqua bidistillata, a 4 °C. Per effettuare la cromatografia, vengono preparate delle piccole colonne di circa 0.5 x 3.6 cm, introducendo innanzitutto una piccola quantità di ovatta allo scopo di trattenere la resina, che è aggiunta in quantità sufficiente a raggiungere l'altezza di 3.5 cm. La quantità di XAD-4 messa in colonna è calcolata in rapporto alla quantità di detergente. Il rapporto XAD-4/detergente (m/m) è uguale a 42. In tali condizioni sperimentali, la tecnica cromatografica di adsorbimento, permette di eliminare, dalla miscela di ricostituzione, il detergente non ionico C₁₂E₈ in eccesso facilitando, al contempo, il corretto inserimento del trasportatore all'interno della membrana artificiale. La cromatografia per adsorbimento, prevede l'utilizzo di alcuni materiali solidi, noti nel loro insieme con il nome di adsorbenti, i quali riescono a trattenere alcune molecole sulla loro superficie, discriminandole da altre. Si tratta di un processo che coinvolge forze di interazioni deboli, non elettrostatiche, e che si verifica solo in corrispondenza di specifici siti di adsorbimento. Il detergente C₁₂E₈, eluendo più volte in colonna (fino a 15 passaggi nel caso del trasportatore OCTN2), instaura forze di interazione maggiori con la resina rispetto agli altri componenti, per cui esso verrà trattenuto dalla colonna. Dopo 15 passaggi su colonna si effettua la strizzatura della colonna cromatografica con una tettarella, recuperando così tutti i proteoliposomi purificati dal detergente.

2.9 INCORPORAZIONE DELLA PROTEINA hOCTN1 NEI LIPOSOMI: RICOSTITUZIONE

Nel caso della proteina hOCTN1 la ricostituzione viene effettuata con la tecnica del batchwise a temperatura ambiente incubando la miscela di ricostituzione con la resina amberlite XAD-4.

La composizione della miscela di ricostituzione di partenza, nel caso del nostro trasportatore di cationi organici è costituita da:

- 5 µl di acido etilenediaminotetraacetico (EDTA), un agente chelante dei cationi mono e bivalenti (nicel) che potrebbero eluire con la proteina;
- 120 µl di detergente al 10% (Triton-X100) necessario per mantenere in soluzione la proteina ed evitarne la precipitazione che impedirebbe la ricostituzione;
- 120 µl di liposomi al 10% e sonicati a 40 Watt per due minuti un pulse si ed un pulse no (P: 01-01 Amplificazione: 30%);
- 200 µl di proteina purificata (vedi paragrafo 2.5);
- 14 µl di tampone TRIS/HCl pH 8,5 500mM, necessario a mantenere il pH a valori fisiologici.
- 41 µl ATP 276 mM

Il tutto è portato a un volume finale di 700 µl con acqua bidistillata. La miscela ottenuta si agita sul vortex per renderla omogenea; in questa fase i proteoliposomi sono ancora organizzati in strutture micellari miste che diverranno liposomi attivi solo in seguito all'eliminazione del detergente attraverso la tecnica del batchwise.

2.10 BACHWISE PER LA RICOSTITUZIONE DI hOCTN1

La tecnica del batchwise è basata sulle proprietà dell'amberlite di assorbire il detergente permettendo la formazione di proteoliposomi; la resina viene pesata in provette da 2 ml (0.5 g). La rimozione del detergente avviene durante incubazione delle micelle miste con la resina poste in agitazione a 1400 RPM e a 23°C per 40 minuti (Termomixer della Eppendorf); dopo questo intervallo di tempo, si ottengono i proteoliposomi purificati dal detergente.

2.11 PREPARAZIONE DELLE COLONNE SEPHADEX G-75

Per separare le molecole in base alle loro dimensioni e forma, vengono sfruttate le proprietà di “setaccio molecolare” di molti materiali porosi. I materiali più utilizzati a questo scopo sono dei composti organici polimerici che possiedono una rete tridimensionale di pori che conferisce loro le proprietà di un gel. Per tale motivo questo tipo di cromatografia prende il nome di gel-filtrazione. Una colonna di particelle di gel o di granelli di vetro poroso si trova in equilibrio con una fase mobile, adatta per la separazione voluta. Il principio su cui si basa questo processo è l’eluizione, in tempi diversi, delle molecole caricate in colonna, in funzione delle differenti dimensioni. Le molecole più grosse sono completamente escluse dai pori e quindi passano attraverso gli spazi interstiziali e compaiono per prime nell’eluato. Le molecole più piccole, invece, si distribuiscono tra la fase mobile all’interno ed all’esterno del setaccio molecolare e perciò transitano in colonna con una velocità inferiore, eluendo quindi per ultime. Pertanto, i liposomi vengono eluiti per primi proprio perché di dimensioni maggiori rispetto a tutte le molecole che possono trovarsi al loro esterno. I gel che vengono più comunemente utilizzati sono destrani con un certo numero di legami crociati. Il destrano, presente in commercio con il nome di Sephadex G-75, è un polisaccaride costituito da unità di glucosio unite da legami β -1,6 glucosidici. L’agente che determina la formazione dei legami crociati è l’epicloridrina. La Sephadex G-75, stabile fino a pH 12 e altamente idrofila, è una resina secca, sotto forma di sferette, che una volta “svellata” forma dei pori che permettono una separazione molecolare compresa tra 3000 e 8000 Da. Prima dell’utilizzo, la resina viene fatta svellare (“rigonfiare”) in acqua bidistillata alla temperatura di circa 80 °C per tre ore. Successivamente al raffreddamento, viene degassata utilizzando una pompa da vuoto ad acqua per circa un’ora. Segue l’impaccamento della colonna, che viene di norma eseguito introducendo la sospensione precedentemente preparata, utilizzando sempre acqua degassata,

in una colonna di vetro caratterizzata da un setto poroso posizionato sul fondo in grado di trattenere la resina.

La colonna di vetro utilizzata ha un diametro di 0.75 cm ed un'altezza di 15 cm; tale altezza permette un'opportuna separazione dei proteoliposomi da tutte le molecole con dimensioni minori. La colonna così preparata viene, quindi, pre-equilibrata attraverso due lavaggi con un tampone contenente Hepes/Tris 20 mM a pH 6.0 e saccarosio 15 mM nel caso di OCTN2 e Tris/HCl 10mM pH 8.5 nel caso di OCTN1, in base ai costituenti della miscela di ricostituzione. Anche in questo caso, come per le colonne XAD-4, la funzione del tampone è quella di equilibrare le pressioni osmotiche, ed evitare la lisi dei proteoliposomi e mantenere il pH a valori desiderati. A questo punto è possibile cromatografare i 550-570 µl di proteoliposomi ottenuti dalle XAD-4. Onde evitare fenomeni di diffusione, si attende che la colonna vada a secco prima di eluirla aggiungendo il tampone, goccia a goccia. Lungo la colonna si viene, così, a formare una banda compatta di proteoliposomi che, essendo visibile, permette l'aggiunta di volumi sempre maggiori di tampone. Nel momento in cui l'eluato si intorbidisce, si possono raccogliere fino a circa 600 µl di proteoliposomi, mentre i substrati posti all'esterno, che interferirebbero con le misure di trasporto, vengono trattenuti dalla resina e successivamente eliminati attraverso una serie di lavaggi con acqua bidistillata e degassata.

Questo stesso tipo di resina è usata per eliminare il substrato radioattivo che è rimasto fuori dai liposomi al termine del trasporto. In questo caso, le colonne Sephadex G-75 hanno dimensioni di 0.7 cm x8 cm.

Quando la resina viene impaccata nelle colonne, è importante che il riempimento della colonna sia uniforme, cioè non si devono creare degli strati discontinui che potrebbero falsare i risultati. Per ottenere ciò, bisogna evitare che le colonne vadano a secco prima che sia completato il riempimento con la resina. Una volta pronte, si effettua un esperimento di

taratura, mediante il quale si stabiliscono i volumi di tampone di NaCl 50 mM da utilizzare come eluente. Nell'esperimento di taratura la miscela di ricostituzione viene preparata come descritto in precedenza, con l'eccezione dell'incorporazione nei liposomi di ^3H -carnitina anziché "fredda". Il prodotto della ricostituzione viene passato sulla colonna XAD-4 come in tutti gli altri esperimenti. Dopo aver tamponato le colonne in esame con NaCl 50 mM, 100 μl di eluato XAD-4 vengono caricati su due colonne scelte come campione. Ciascuna di esse viene eluita con 100 μl di NaCl 50 mM per trenta volte in maniera tale da avere trenta prove per ogni colonna. Ad ogni passaggio si raccoglie l'eluato e ad ogni prova vengono aggiunti 3 ml di miscela scintillante Pico-fluor 40 (PerkinElmer) che permette la lettura della radioattività. Perché le colonne siano funzionali, è necessario che il substrato radioattivo esterno (non trasportato) ed i proteoliposomi con il radioattivo interno, siano distanziati da 1-2 ml di eluato, in modo che il segnale radioattivo letto dallo scintillatore non derivi dalla ^3H -carnitina esterna ai proteoliposomi. Per ottenere questa condizione, la resina deve raggiungere un'altezza di circa 8 cm nella colonna. I dati ottenuti, riportati in grafico, permettono di stabilire le frazioni contenenti maggiori radioattività. La conoscenza di tali dati permette di stabilire i volumi di NaCl 50 mM con cui eluire la colonna. I primi 900 μl eluiti non contengono radioattività. Ne consegue che i volumi di tampone da aggiungere in colonna per l'eluizione dei 100 μl di proteoliposomi, sono 100 μl , 200 μl , 200 μl e 400 μl , che corrispondono nel loro insieme ai 900 μl da eliminare in quanto non contenenti radioattività. Dal grafico si evince, ancora una volta, che il successivo millilitro di eluato corrisponde al picco di radioattività presente nei proteoliposomi, pertanto, vengono effettuate due aggiunte consecutive di 500 μl di NaCl 50 mM. Chiaramente le varie aggiunte sono fatte ogni qualvolta le colonne sono andate a secco, onde evitare fenomeni di diffusione.

2.12 MISURA DI TRASPORTO DELL'UPTAKE DI SUBSTRATO RADIOATTIVO NEI PROTEOLIPOSOMI

L'eluato ottenuto dalle Sephadex G-75 e contenente i proteoliposomi viene agitato sul vortex per rendere la sospensione quanto più possibile omogenea, dopodiché viene suddiviso in aliquote da 100 µl che rappresentano le prove per la determinazione del trasporto. L'attività di trasporto viene misurata come quantità di [³H]-Carnitina (OCTN2) o [¹⁴C]-TEA (OCTN1), substrati radioattivi dei trasportatori, che viene trasportata nell'unità di tempo all'interno dei proteoliposomi.

Nelle prove si aggiungono 10 µl di substrato radioattivo (TEA o carnitina), composto in parte dal carrier free (¹⁴C-TEA, ³H-Carnitina) e in parte dal substrato freddo (TEA 1mM o carnitina 0.1 mM), in base ai seguenti rapporti:

- 6.5 µl di carrier free e 130 µl di freddo per il TEA
- 4 µl di carrier free e 130 µl di freddo per la carnitina.

Nel caso del trasportatore OCTN2 l'attività di trasporto è stata calcolata tramite l'aggiunta di [³H]-Carnitina 10 µM e NaCl 50 mM a proteoliposomi contenenti carnitina 15 mM, mentre il trasporto viene stoppato tramite l'aggiunta di mersalyl 50 µM. Nel caso di hOCTN1 l'attività di trasporto è stata calcolata tramite l'aggiunta di [¹⁴C]-TEA 0,1 mM, mentre il trasporto è stato stoppato tramite l'aggiunta di PLP (piridossal fosfato) 2 mM. Nei controlli l'inibitore viene aggiunto al tempo zero in quanto il valore di radioattività ottenuto da queste prove, indica la quantità di substrato entrato nei proteoliposomi per semplice diffusione ed è, quindi, il valore da sottrarre ad ogni prova per ottenere esclusivamente la quantità di substrato trasportato in maniera specifica dalla proteina. Prima dell'aggiunta del substrato radioattivo ai campioni, i proteoliposomi vengono messi a contatto, nel caso dei nostri esperimenti, con i reagenti mercuriali MeHg e HgCl₂ in presenza o assenza dell'agente riducente dei gruppi sulfidrilici DTE 2 mM. Per gli esperimenti di cinetica la velocità iniziale del trasporto è stata

misurata dopo 15 minuti di trasporto utilizzando due diverse concentrazioni di MeHg (4 μ M e 7 μ M) e HgCl₂ (3 μ M e 6 μ M).

Per gli esperimenti di efflusso i proteoliposomi contenenti carnitina 15 mM sono stati passati attraverso una Sephadex G-75 in modo da rimuovere il substrato esterno e, successivamente, incubati con [³H]carnitina 1 μ M in presenza di NaCl 50 mM per 75 minuti a 25°C. La radioattività esterna in eccesso viene, quindi, eliminata da un'ulteriore passaggio sulle colonne Sephadex G-75. Il trasporto viene misurato in seguito all'aggiunta all'esterno di carnitina fredda, o reagenti mercuriali alle concentrazioni indicate nelle leggende alle figure e stoppato come descritto in precedenza. L'attività di trasporto viene misurata come percentuale di radioattività residua rispetto al tempo 0.

Terminato il trasporto, bisogna eliminare l'eccesso di radioattivo, che non è stato trasportato all'interno del proteoliposoma, poiché potrebbe falsare la misura della radioattività, che risulterebbe sovrastimata; anche in questo caso la separazione avviene mediante cromatografia per gel filtrazione su apposite colonne equilibrate prima dell'uso con NaCl 50 mM. L'eluato, costituito dai proteoliposomi con all'interno il substrato radioattivo, viene raccolto in apposite vials alle quali si aggiungono 3 ml di miscela scintillante Maxifluor. Dopo agitazione, le prove sono lette in un contatore a scintillazione liquida (Beckman LS7500) per misurarne la radioattività.

2.13 CALCOLO DELL'ATTIVITÀ DI TRASPORTO

La radioattività del campione è letta attraverso uno scintillatore in fase liquida (Beckman LS-7500) ed è espressa in colpi per minuto (cpm). Il campione è miscelato con una soluzione (cocktail) che contiene uno o più scintillatori. Questi contatori sono utilizzati soprattutto per misurare i β -emettitori deboli, quali ³H, ¹⁴C e ³⁵S, frequentemente usati in biologia.

Al campione da leggere vengono aggiunti 3 ml della miscela scintillante Pico-fluor 40 (PerkinElmer). Il segnale di fluorescenza viene poi rilevato dai fotomoltiplicatori dello scintillatore e convertito in segnale elettrico che è quindi letto in cpm. I dati ottenuti vengono elaborati facendo la media dei cpm relativi ai campioni uguali, ed al valore ottenuto si sottrae quello dei campioni di riferimento per ottenere il valore del trasporto reale.

L'attività di trasporto nel tempo, espressa come nmoli di substrato trasportato per mg di proteine, si ricava dalla seguente formula:

$$\text{attività di trasporto} = dCPM / A.S. / \text{mg proteina} / t$$

dove:

- dCPM rappresenta la radioattività interna ai proteoliposomi ottenuta per sottrazione dei CPM relativi ai campioni del trasporto dai campioni inibiti a tempo zero (bianco).
- mg corrisponde alla quantità di proteina presente nei campioni.
- t rappresenta il tempo di trasporto.
- A.S. è l'attività specifica del trasportatore che può essere calcolata nel seguente modo:

$$A.S. = R.T. / \text{nmoli}$$

dove:

- R.T. rappresenta la radioattività totale ovvero i cpm relativi al solo radioattivo, cioè ai 10 μl di soluzione preparata con *carrier free* e substrato freddo, alla concentrazione desiderata;
- nmoli rappresenta invece le nmoli totali di substrato contenute in 10 μl della medesima soluzione di substrato radioattivo, impegnate nel trasporto.

2.14 ELABORAZIONE DEI DATI SPERIMENTALI

I dati sperimentali che si ottengono dalle misure di trasporto, devono essere interpolati in

equazioni appropriate ed elaborati con specifici software. Dopo aver calcolato le attività, come descritto nel paragrafo precedente, i dati sono stati elaborati al computer mediante un programma di interpolazione non lineare (Grafit).

Per analizzare i vari aspetti funzionali e cinetici del trasporto sono state utilizzate le seguenti equazioni:

- Equazione di Michaelis-Menten:

$$V_0 = ([S] \cdot V_{\max}) / (K_m + [S])$$

- Equazione di Lineweaver-Burk, ovvero l'inverso dell'equazione di Michaelis-Menten:

$$1/V_0 = [K_m / (V_{\max} [S])] + 1/V_{\max}$$

dove:

V_0 = velocità iniziale del trasporto;

V_{\max} = velocità massima del trasporto;

K_m = concentrazione di substrato ([S]) alla quale $V = 1/2 V_{\max}$;

[S] = concentrazione di substrato.

- Equazione esponenziale di primo ordine per valutare il trasporto nel tempo:

$$y = A (1 - e^{-kt})$$

dove:

t = tempo

k = costante di I ordine

A = radioattività massima interna ai proteoliposomi all'equilibrio.

- Equazione IC_{50} :

$$y = 100\% / [1 + (x / IC_{50})^s]$$

dove:

s = un fattore di pendenza;

x = valore di inibizione;

IC_{50} = indica la concentrazione di inibitore alla quale l'attività del trasportatore si riduce del 50%. Il parametro più basso è 0 mentre quello più alto è 100. Si assume che il valore di y diminuisca all'aumentare del valore di x .

2.15 ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS

Nel caso della proteina OCTN1 overespressa in *E.Coli* per verificare la purificazione e quantificare la proteina si effettua quotidianamente una elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (dodecilsolfato) di 10, 15 e 20 μ l della soluzione contenente la proteina purificata utilizzata per la ricostituzione; in particolare si utilizza un sistema di mini gel le cui dimensioni sono 8 x 10 cm e lo spessore è 0.75 mm.

La soluzione per la preparazione del gel di separazione al 12% è costituita da:

- 2.117 ml di acrilamide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);
- 1.1 ml di Tris/ HCl 1.8 M a pH 8.8;
- 1.983 ml di H₂O
- 0.05 ml di SDS al 10%.

La soluzione per la preparazione del gel di concentrazione è costituita da:

- 0.2 ml di acrilammide / bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);
- 0.12 ml di Tris/ HCl 0.6 M a pH 6.8;
- 0.85 ml di H₂O;
- 0.012 ml di SDS al 10%.

TEMED (tetrametilendiammina) (5 μ l per il gel di separazione e 3 μ l per il gel di concentrazione) ed ammonio persolfato al 10% (35 μ l per il gel di separazione e 25 μ l per il gel di concentrazione) sono utilizzati come catalizzatori nella reazione di polimerizzazione. I campioni proteici sono solubilizzati con un tampone contenente Tris 10 mM, SDS 3.5%,

glicerolo al 10%, β -mercaptoetanolo o 1.4-ditioeritritolo 100 mM e blu di bromofenolo allo 0.01% a pH 6.8. Il tampone di corsa contiene Tris 25 mM, glicina 1.4%, SDS allo 0.1% a pH 8.3. La colorazione dei gel di poliacrilammide è effettuata seguendo il protocollo Silver staining, il quale prevede l'agitazione del gel, staccato dal supporto, per i seguenti tempi nelle seguenti soluzioni:

- 30' Destaining Solution;
- 30' in Gluteraldeide al 10%;
- 15' soluzione di 50 ml di H₂O + 16.6 μ l DTE 0.5M;
- 20' soluzione di 50 ml di H₂O + 0.05gr AgNO₃ 0.1 %

Terminata l'agitazione con l'argento, si procede con la soluzione di sviluppo costituita da una soluzione di Na₂CO₃ 0.03M (50ml) e Formaldeide al 37% (40 μ l); questa soluzione ha la duplice funzione di eliminare l'argento in eccesso e permettere la visualizzazione delle proteine che hanno corso su gel. Questa reazione è stoppata con l'aggiunta di una piccola quantità di Acido Citrico in polvere che provoca una reazione di effervescenza che ferma lo sviluppo.

2.16 ISOLAMENTO E MESSA IN CULTURA DI CELLULE PRIMARIE DI RENE

I reni prelevati da topi WT vengono completamente decapsulati e privati di ogni tessuto grasso presente sulla superficie al di sotto di una cappa sterile, con un bisturi viene rimossa la parte corticale del rene ed eliminata la zona midollare, le porzioni corticali di rene così ottenute vengono tagliate fino ad ottenere una pastura omogenea, che a sua volta viene divisa equamente in due tubi Falcon contenenti 37,5 ml di isolation medium RMPI 1640 e 250 μ l Collagenasi D e invertite dolcemente. Il mezzo RMPI preparato precedentemente contiene siero fetale bovino (5%) e penicillina/streptomicina (2%).

Le Falcon vengono così lasciate per 15 minuti in un bagnetto termico a 37°C, dopo di che agitate vigorosamente per 2 ore in un incubatore a 37°C. A seguito delle due ore i tessuti saranno stati completamente digeriti dalla soluzione di Collagenasi D, le sospensioni vengono così filtrate in due nuovi tubi Falcon, si porta a volume di 50 ml con nuovo mezzo RMPI 1640 e si centrifuga per 7 minuti a 204.6 x g per rimuovere il Collagenasi D.

A seguito delle centrifugazione il sopranatante viene rimosso e il pellet viene risospeso con 5 ml di mezzo RMPI, si porta a volume di 50 ml con nuovo mezzo RMPI e si centrifuga per 7 minuti a 204.6 x g per rimuovere completamente qualsiasi residuo di Collagenasi. Il sovranatante viene rimosso di nuovo e il pellet risospeso con 5 ml di RMPI.

I 10 ml di sospensione così ottenuti nelle due Falcon vengono aggiunti al gradiente di Percoll precedente preparato, inclinando le Falcon a 45° e facendo gocciolare la sospensione lentamente, in modo che si depositi sopra il gradiente, le due Falcon vengono così centrifugate per 25 minuti a 1277.9 x g. Il principio su cui si basa questa metodica consiste nel fatto che una miscela di cellule può essere separata per centrifugazione secondo gradiente di densità. Quando una sospensione di cellule viene centrifugata, il tasso di sedimentazione delle cellule sarà proporzionale alla forza applicata e alla soluzione in cui sono sospese le cellule.

Così, applicando una forza centrifuga fissa, il tasso di sedimentazione sarà proporzionale alla dimensione delle cellule, alla loro densità e alla densità del mezzo circostante.

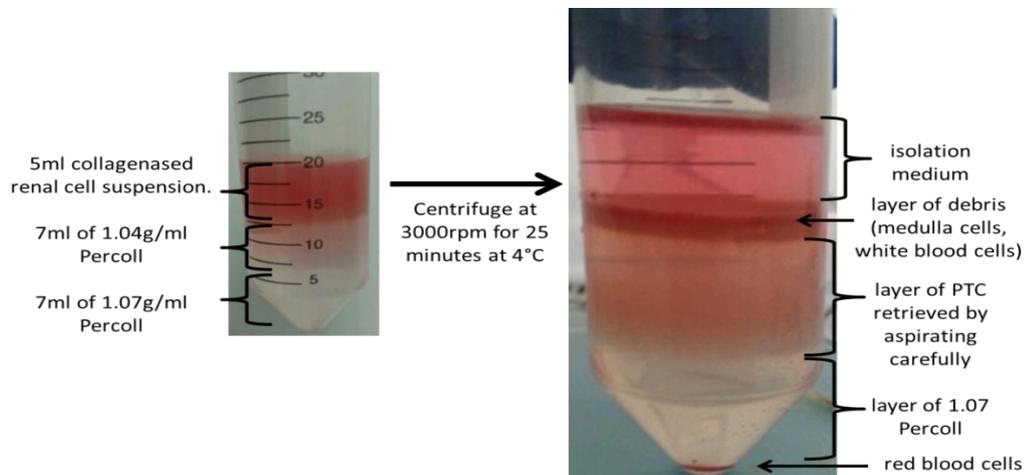
Utilizzando questo principio, la miscela di cellule può essere passata attraverso una serie di gradienti e quindi le cellule possono essere separate. La soluzione di Percoll consiste di particelle colloidali di silice di 15-30 nm di diametro e può essere utilizzato per creare i range di gradienti necessari per separare le cellule. Le cellule si depositeranno in una posizione di equilibrio esattamente dove il gradiente di densità della soluzione sarà uguale alla densità delle cellule.

Le cellule sono separate esclusivamente sulla base di differenza di densità, e non di dimensione.

- Soluzione stock di Percoll : Il Percoll viene diluito in HBSS 10X, 9 parti di Percoll in una parte di HBSS.
- Gradiente di densità 1,04 : 5 ml di soluzione stock di Percoll e 12 ml mezzo di isolamento RMPI.
- Gradiente di densità 1,07 : 10 ml di soluzione stock di Percoll e 8 ml di PBS 1X.

Infine per creare il gradiente sulla superficie del quale verranno posizionate le cellule si aggiungono 7 ml della soluzione 1,07 sul fondo della Falcon e 7 ml della soluzione 1,04 sopra il gradiente 1,07, piegando la Falcon di 45° e facendo scendere la soluzione lentamente.

Il gradiente di Percoll serve a separare le cellule corticali renali ad esempio dalle cellule del sangue come i globuli rossi che si depositeranno sul fondo della Falcon.



Al termine della centrifuga vengono raccolte le cellule fra i due gradienti e messe in due nuove Falcon, si raggiunge volume di 50 ml e si centrifuga per 7 minuti a 204.6 x g , il sovrantante viene eliminato e il pellet risospeso con 50 ml di nuovo mezzo RMPI e ricentrifugato per 7 minuti a 204.6 x g . Il sovrantante viene rimosso e il pellet viene

risospeso con 5 ml di mezzo di coltura renale REGM. Il mezzo di coltura contiene idrocortisone, fattore di crescita epidermico umano, siero fetale bovino, epinefrina, insulina, tirosina, transferrina e 1% penicillina/streptomicina. A questo punto le cellule vengono contaminate e piastrate in filtri permeabili di policarbonato ad una densità di 100000 cellule per filtro in 500 µl di mezzo di coltura REGM. Le cellule vengono lasciate crescere in un incubatore a 37°C, 5% CO₂ e 95% O₂ per 6-8 giorni cambiando il mezzo di coltura ogni 3 giorni. Le cellule cresceranno sul fondo del supporto creando un monolayer e una popolazione eterogenea di cellule distali e prossimali.

2.17 AGGIUNTA DI FARMACI ALLE COLTURE CELLULARI E FISSAGGIO DELLE CELLULE

Dopo circa 6-7 giorni i farmaci vengono aggiunti direttamente al mezzo di coltura. Vengono preparate tre soluzioni stock di Cisplatino (Sigma), Ciclosporina A (Sigma) e BEA (Sigma), Cisplatino e BEA sono solubili in acqua mentre la Ciclosporina risulta solubile in etanolo.

Vengono aggiunti 500 µM di mezzo di coltura contenenti i farmaci in ogni filtro di policarbonato sul quale è cresciuto il monolayer di cellule. Le cellule vengono lasciate per 24 ore nell'incubatore a 37°C. Come controllo viene usato un supporto contenente il monolayer di cellule sul quale viene aggiunto mezzo di coltura senza il farmaco.

Dopo 24 ore le cellule vengono rimosse dall'incubatore lavate con PBS 1X, e lasciate in frigorifero per 10 minuti in paraformaldeide (PFA) al 2%, a seguito dei dieci minuti la PFA 2% viene rimossa e le cellule conservate in PBS 1X in frigorifero. Una volta fissate le cellule sono utilizzabili fino ad un mese.

2.18 ESTRAZIONE DI PROTEINE E SAGGIO PROTEICO

L'estrazione di proteine permette di ottenere proteine in soluzione. Le cellule devono essere rotte e il contenuto proteico rilasciato in una soluzione chiamata crude extract.

Le cellule vengono sottoposte a condizioni stressanti (alte pressioni, cicli di congelamento/scongelamento, utilizzo di detergenti, sonicazione).

Per estrarre le proteine in condizioni native si eseguono i seguenti passaggi:

- Lavare le cellule con 1X PBS per due volte;
- Lisare le cellule con 1 ml RIPA buffer 1X. Mantenere in costante agitazione per 10 minuti a 4°C. Il Ripa buffer contiene Tris-HCl (agente che previene la denaturazione delle proteine) NaCl (previene l'aggregazione non specifica delle proteine) Na-deossilato (detergente non ionico per l'estrazione di proteine), al Ripa Buffer viene aggiunta una tavoletta di inibitore di proteasi in modo da ridurre la degradazione delle proteine a seguito dell'estrazione (Roche)
- Centrifugare a 13201.3 g 10 min 4°C. Il sovrantante è il "native total cell lysate".
- Il lisato proteico così ottenuto viene conservato in congelatore a -80 ° C.

Una volta estratte le proteine bisogna quantificarle in modo da poter valutare la loro precisa concentrazione nel lisato. In questo lavoro di tesi è stato usato il saggio proteico BCA (Pierce BCA protein assay kit), questo saggio si basa sull'utilizzo di un detergente a base di acido bicinconico (BCA) per la rivelazione colorimetrica e la quantificazione di proteine totali. Questo metodo combina la riduzione da parte delle proteine del Cu^{2+} a Cu^{1+} in ambiente alcalino, tale riduzione Cu^{2+} in catione rameoso viene rilevata tramite colorimetria utilizzando un unico reagente contenente acido bicinconico. Il prodotto di reazione di color viola di questo saggio è formato dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rameoso. Questo complesso idrosolubile esibisce una forte assorbanza a 562 nm e la colorazione viola del complesso è tanto più intensa tanto più è alta la concentrazione di proteine.

In una piastra da 96 pozzetti vengono aggiunti 20 μ l per ogni campione di lisato proteico ottenuto, a questi vengono aggiunti 200 μ l del reagente BCA (working reagent) e la piastra viene incubata al buio per 30 minuti a 37°C. Il reagente BCA è costituito da due soluzioni differenti, il reagente A contenente carbonato di sodio, bicarbonato di sodio e acido biconconico, e il reagente B contenente solfato di rame. I due composti vengono miscelati fra di loro secondo il seguente rapporto: 50 parti di reagente A in una parte di reagente B.

Al termine dei trenta minuti di incubazione la reazione colorimetrica si è sviluppata e viene letta l'assorbanza dei campioni a 562 nm. Le concentrazioni delle proteine vengono così determinate in riferimento a dei campioni standard (albumina di siero bovino) di cui le concentrazioni di proteina sono note, il saggio sugli standard viene effettuato simultaneamente insieme ai campioni ignoti. Grazie alle concentrazioni note degli standard è possibile creare una curva standard che permetterà di risalire alle concentrazioni dei nostri campioni.

2.19 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE IN SDS E WESTERN BLOT

La separazione delle proteine è effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (sodio dodecilsolfato) al 12%. E' usato un sistema di mini gel le cui dimensioni sono 8 x 10 cm e lo spessore è 1.5 mm. La soluzione per la preparazione del gel di separazione è costituita da:

- 12% acrilammide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%) ;
- 0.37 M di Tris (triidrossimetilamminoetano)/HCl 1.5 M a pH 8.8 (468 mM finale)
- 5 ml di H₂O;
- 0.1 % di SDS 10%.

La soluzione per la preparazione del gel di concentrazione è costituita da:

- 3.9 % di acrilammide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);
- 0.12 M di Tris/HCl 0.5 M a pH 6.8
- 4,07 ml di H₂O;
- 0.1 % di SDS al 10%.

Alle soluzioni di separazione per innescare la polimerizzazione vengono aggiunti 0.05 % μ l di TEMED e 0.05% di ammonio persolfato (APS), mentre al gel di concentrazione vengono aggiunti 0.01% di TEMED e 0.05% di ammonio persolfato. I campioni vengono caricati su gel con una concentrazione pari a 10 μ g/ μ l (diluiti in RIPA buffer). Prima di essere caricati ai campioni vengono aggiunti sample buffer 4X e reducing buffer 1X, e lasciati per dieci minuti a 70°C. Il Western Blot è una tecnica che permette di valutare quanto è espressa una proteina e dove è localizzata, sfrutta prima una elettroforesi denaturante (SDS-PAGE) per far separare le varie proteine in funzione della massa, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzerebbero la migrazione. Questa tecnica consente di trasferire le proteine separate su gel di poliacrilammide in dodecilsolfato di sodio, ad una membrana di nitrocellulosa e successivamente evidenziare la proteina di interesse utilizzando come sonda anticorpi diretti contro la proteina stessa. Il primo passaggio consiste nel trasferire le proteine separate sul gel, su un foglio di nitrocellulosa. Per fare questo il gel viene posto nel buffer di trasferimento e, dopo 15 minuti di incubazione, si immergono nel medesimo buffer, la membrana di nitrocellulosa e la carta da filtro. Trascorsi 15 minuti, si assembla un sandwich, costituito da spugna, carta da filtro, gel, membrana, carta da filtro e spugna e si pone nell'elettroblotting per 75 minuti a 40 V. Il tampone di trasferimento è costituito da Tris 0,3%, Glicina 1,4% e SDS 0.01%. Successivamente la membrana è posta per un'ora nel Blocking Buffer (TBST, latte 5%), e un'ora nel blocking buffer contenete l'anticorpo primario (1:500) che si lega alla proteina contro cui è diretto. Si procede, quindi, con 3 lavaggi da 15 minuti con il tampone di lavaggio (TBST) per eliminare l'anticorpo che non si è legato. Effettuati i lavaggi, la

membrana di nitrocellulosa si pone, per un'ora, nel blocking buffer in cui viene aggiunto l'anticorpo secondario (1:1000), a questo punto si effettuano 3 lavaggi da 15 minuti con il tampone di lavaggio (TBST) e si procede con lo sviluppo. La soluzione di sviluppo contiene perossido di idrogeno e luminol in un rapporto 1:1. La membrana viene ora visualizzata sotto una lampada UV per visualizzare le bande corrispondenti all'interazione dell'anticorpo con la proteina di interesse.

2.20 IMMUNOISTOCHEMICA SU CELLULE

L'immunoistochimica è una tecnica che permette la rilevazione di determinati antigeni presenti nel tessuto o nelle cellule da esaminare, è in grado infatti di individuare specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra cellulare. La tecnica immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione poi con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio. Esistono metodiche dirette o indirette.

Le cellule precedentemente fissate in PFA 2% vengono lavate con una soluzione PBS-Tween 1X, a questo punto viene aggiunto H₂O₂ 0,03% per dieci minuti, per ridurre a minimo la reazione colorimetrica aspecifica, a seguito dei dieci minuti viene aggiunto blocking buffer per un'ora, il blocking buffer contiene albumina 1%, reagente Seablock 3% solubilizzati in PBS-Tween. Dopo un'ora di incubazione con il Blocking Buffer, viene aggiunto l'anticorpo primario (anti-osteopontina di coniglio policlonale, anti-KIM-1 policlonale estratto da capra) diluito 1:200 in blocking buffer e lasciato agire per un'ora a temperatura ambiente. Dopo un'ora di incubazione con l'anticorpo primario vengono fatti tre lavaggi da dieci minuti ciascuno con PBS-Tween in modo da eliminare completamente l'anticorpo primario che non ha reagito, a seguito dei lavaggi le cellule vengono incubate per un'ora con l'anticorpo secondario (anti-coniglio, anti-capra) diluito 1:400 in blocking buffer, a seguito dell'incubazione con

L'anticorpo secondario le cellule vengono lavate tre volte per dieci minuti in PBS-Tween. A questo punto si passa alla colorazione del complesso antigene-anticorpo tramite 3,3-diaminobenzidina (DAB). La DAB produce una intensa colorazione marrone resistente all'alcol. I vetrini colorati con DAB possono essere disidratati, montati in mezzi di montaggio con i metodi convenzionali e conservati a lungo, perché la reazione produce un precipitato di colore marrone, non solubile in acqua o alcol. La DAB inoltre è elettroindensa e ciò la rende utile anche per studi di immunoperoxidasi ultrastrutturali. La soluzione di sviluppo consiste in 3,3-diaminobenzidina disciolta in solvente organico diluita 1:50 con il buffer contenente perossido di idrogeno 3% (ChemMate DAKO EnVision Detection Kit, Peroxidase/DAB). Una volta sviluppata, la reazione viene bloccata lavando le cellule con acqua, a questo punto viene aggiunta alla cellule per 5 secondi ematossilina, questa colora in blu violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari, elastina. Questi componenti sono detti basofili e si trovano prevalentemente a livello del nucleo, che assume pertanto il colore blu. Una volta rimossa l'ematossilina si procede a una serie di lavaggi in etanolo a concentrazioni crescenti 75%, 90% e 100% (due passaggi) per disidratare le cellule, e alla chiarificazione delle cellule in Xilene per 30 secondi, lo xylene rende le cellule già disidratate diafane ovvero trasparenti. Una volta chiarificati, i vetrini di policarbonato sui quali sono cresciute le cellule vengono montati su vetrini e osservata al microscopio ottico.

2.21 SAGGIO PER LA QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE NECROTICHE

Questo saggio si basa sul principio secondo il quale alcune cellule trattate con il farmaco possono subire processi necrotici e quindi staccarsi dal supporto solito sul quale sono cresciute ed essere successivamente rilevate e quantificate nel mezzo di coltura. Le cellule primarie di rene sono state cresciute su capsule Petri 35x10 mm, dove una Petri rappresenta il

controllo, ovvero non sono stati aggiunti i farmaci ma solo il veicolo, mentre per ogni farmaco sono state aggiunte al mezzo di coltura quattro differenti concentrazioni (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M nel caso del BEA e 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M nel caso del cisplatino e della ciclosporina). Dopo 24 ore di contatto delle cellule con il farmaco, una piastra di controllo viene trattata con tripsina 0,25% a 37°C in un incubatore per circa dieci minuti, in modo da staccare e separare le cellule dal supporto solido della Petri, la reazione della tripsina viene bloccata tramite l'aggiunta di mezzo di coltura e centrifugazione per dieci minuti a 132.0 x g, il pellet così ottenuto viene risospeso in 1 ml di mezzo di coltura. Dalle Petri contenenti le cellule trattate con il farmaco e da una Petri con il controllo vengono prelevati i sovrinatanti, centrifugati 10 minuti a 132.0 x g e risospesi in 1 ml di mezzo di coltura. A questo punto si procede alla conta delle cellule presenti tramite la camera di Burker e osservazione al microscopio. Le cellule tripsinizzate rappresentano il 100% ovvero il numero totale di cellule cresciute sulla piastra, grazie a questo valore è possibile calcolare la percentuale di cellule necrotiche presenti nel mezzo di coltura del controllo e delle cellule trattate con le varie concentrazioni crescenti di farmaco.

2.22 SAGGIO TUNEL PER LA QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE APOPTOTICHE

Questo saggio viene usato per la ricerca e quantificazione a livello cellulare di apoptosi, e si basa sul principio che le terminazioni libere 3'-OH che si vengono a formare in seguito alla frammentazione del DNA possano servire come substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT). Utilizzando come substrato dUTP biotinilato, che viene poi visualizzato usando FITC coniugata ad avidina, è possibile distinguere in una popolazione le cellule apoptotiche.

Le cellule precedentemente fissate in PFA 2% vengono lasciate a contatto per 30 minuti con Triton X-100 in PBS-Tween, a seguito si eseguono due lavaggi in PBS-Tween, le cellule vengono pre-incubate per dieci minuti in 120 μ l di TdT reaction Buffer il quale contiene Tris-HCl 25 mM, Sodio Cacodilato 200 mM, di BSA 0,25 mg/ml e Cobalto 1mM.

Le cellule sono ora incubate per 1-2 ore a 37°C con 120 μ l di TdT mixture, composta da due soluzioni diluite 1:9, la prima soluzione è quella contenete l'enzima transferasi terminale in TdT buffer, la seconda il reagente Label contenente Biotina-16-dUTP diluita nel TdT rection buffer. A seguito delle due ore si aggiunge alle cellule il buffer per bloccare la reazione, costituito da NaCl 300 Mm e Citrato di Sodio 30 mM. Bloccata la reazione le cellule vengono incubate con

FITC-Avidina D, diluita 1:500 in PBS, per 30 minuti a temperatura ambiente, si effettuano ora due lavaggi da due minuti con PBS-Tween, si incubano le cellule con il colorante fluorescente Hoechst in modo da poter evidenziare i nuclei delle cellule e si procede al montaggio dei vetrini.

2.23 VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale è uno degli eventi precoci della cascata apoptotica ed è un evento reversibile. L'analisi citometrica della funzione mitocondriale può essere eseguita con numerosi fluorocromi.

La caduta del potenziale di membrana può essere rilevata, sia al citofluorimetro che in microscopia a fluorescenza e confocale, mediante l'utilizzo di coloranti cationici lipofilici come ad esempio il 3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina ioduro (JC-1).

Nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, JC-1 si localizza a livello della membrana elettronegativa dei mitocondri sotto forma di aggregati che danno fluorescenza rossa (gli aggregati-reversibili si formano in presenza di un elevato numero di molecole

vicine). Al contrario, nelle cellule apoptotiche dove è avvenuta una caduta del potenziale di membrana, il colorante rimane in forma monomeric a livello citoplasmatico non potendosi accumulare nei mitocondri, dando una fluorescenza verde diffusa.

I vantaggi legati all'utilizzo del JC-1 sono i seguenti: non è necessaria fissazione, l'esame è molto rapido, infine rende possibile una variazione di emissione con la stessa eccitazione a 488 nm. Tra gli svantaggi si annovera una elevata fluorescenza verde di fondo che può rendere difficile la valutazione della forma rossa aggregata e vi è necessità di lettura in doppia fluorescenza con conseguente settaggio dello strumento. Dopo 24 ore di trattamento delle cellule con il farmaco il mezzo di coltura viene rimosso e sostituito con del nuovo mezzo di coltura contenente il farmaco e JC-1 in una concentrazione di 5µg/ml, le cellule vengono lasciate per 30 minuti a contatto con il farmaco e JC-1 nell'incubatore a 37°C, dopo di che vengono osservate al microscopio confocale, in modo da valutare l'eventuale aumento della colorazione verde di JC-1 (caduta del potenziale di membrana) a seguito della somministrazione del farmaco.

2.24 ANALISI QUANTITATIVA DELL'ESPRESSIONE DI BIOMARCATORI

Per questo tipo di analisi è stato utilizzato il sistema computerizzato FACS (fluorescent-activated cell sorter). Grazie a questa tecnica le cellule, poste in sospensione in una soluzione isotonica, vengono fatte passare all'interno di un capillare così sottile da permettere il passaggio di una cellula per volta. Il capillare è attraversato da un raggio laser, di lunghezza d'onda adatta a eccitare la fluorescenza, e da un rilevatore che misura la fluorescenza di ciascuna cellula.

Contemporaneamente la sospensione cellulare viene separata in gocce microscopiche, la maggior parte delle quali contiene una sola cellula. Un dispositivo carica di segno negativo le cellule fluorescenti e di segno positivo le altre. Le goccioline sono poi deviate nei tubi di

raccolta, in base alla loro carica elettrica, tramite l'applicazione di un campo elettromagnetico. Gli aggregati cellulari e le gocce che non contengono alcuna cellula (e che quindi sono neutri) non vengono deviati e si raccolgono a parte. Lo strumento FACS è in grado di riconoscere cellule fluorescenti in concentrazione molto bassa (una su mille) e può separare circa 5000 cellule per minuto. Le cellule alle quali sono stati aggiunti i farmaci vengono separate tramite tripsina (0,25%, dieci minuti a 37°C) la sospensione così ottenuta viene centrifugata per 2 minuti a 132.0 g , e il pellet risospeso con 200 µl di blocking buffer (albumina 1%, seablock 3% in PBS-Tween) e lasciato a incubare per 15 minuti in frigorifero, a questo punto si centrifuga per due minuti a 132.0 x g e si risospende il pellet con 200 µl di blocking buffer nel quale è presente l'anticorpo primario diluito 1:200, si lascia agire in frigorifero per trenta minuti e si fanno due lavaggi delle cellule centrifugandole e risospingendole con PBS, a questo punto le cellule vengono incubate per trenta minuti con 200 µl di blocking buffer nel quale è stato diluito 1:400 l'anticorpo secondario fluorescente, si fanno due lavaggi delle cellule centrifugandole e risospingendole con PBS e si procede alle letture della fluorescenza nel sistema FACS, dal quale otterremo un grafico che permetterà la rilevazione quantitativa delle cellule che risultano positive quindi fluorescenti.

Capitolo 3

Risultati

3.1 INIBIZIONE DEL TRASPORTATORE DI CARNITINA OCTN2 DA PARTE DI HgCl₂ E METILMERCURIO NEL MODELLO SPERIMENTALE DEI PROTEOLIPOSOMI: COMPrensIONE DEL MECCANISMO DI TOSSICITÀ.

3.1.1 INIBIZIONE DEL TRASPORTO DI CARNITINA DA PARTE DEI MERCURIALI

In questo lavoro di tesi è stato investigato l'effetto dei composti mercuriali sul trasportatore di carnitina OCTN2 ricostituito in liposomi. L'attività di trasporto è stata misurata come uptake di ³H-carnitina 10 μM in proteoliposomi contenenti carnitina fredda 15 mM, (antiport omologo carnitina/carnitina) in assenza e in presenza di MeHg e HgCl₂ aggiunto all'esterno. Come descritto in precedenza, l'accumulo di ³H-carnitina nei proteoliposomi è dipendente dal tempo: aumenta fino a 1.7 n mol/mg proteina a 90 minuti [38]. L'effetto dei composti mercuriali sul trasportatore di Carnitina OCTN2 è stato valutato in esperimenti di time course. L'aggiunta di HgCl₂ 8 μM o MeHg 8 μM inibisce fortemente il trasporto. Dopo 15 minuti, infatti, entrambi i composti inibiscono il trasporto di più del 50%. Per verificare se l'inibizione del trasporto è causata dalla formazione di legami covalenti dei composti mercuriali con il trasportatore, l'attività di trasporto è stata calcolata dopo l'incubazione dei proteoliposomi con MeHg e HgCl₂, e la successiva rimozione dell'eccesso di reagenti che non hanno reagito con la proteina. Per raggiungere tale obiettivo è stata utilizzata la stessa strategia utilizzata per altri trasportatori [32,68,92], i proteoliposomi sono stati incubati con i due reagenti mercuriali e passati attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 per rimuovere le molecole dei reagenti che non hanno interagito covalentemente con la proteina di membrana. A seguito di questa procedura l'attività di trasporto è stata valutata come descritto in Materiali e Metodi (2.12). L'aggiunta di HgCl₂ 5μM (figura 1A) o MeHg 5μM (figura 1B) inibisce fortemente il trasporto di carnitina da

parte di OCTN2. Dopo 15 minuti è stata infatti registrata un'inibizione del trasporto pari al 67% nel caso di HgCl_2 e 50 % per quanto riguarda MeHg. Dopo 70 minuti il trasporto risulta ulteriormente inibito fino a valori di inibizione pari a 84% e 61% in presenza rispettivamente di HgCl_2 e MeHg. I dati sperimentali riportati in figura 1 sono stati interpolati con un'equazione di velocità del primo ordine.

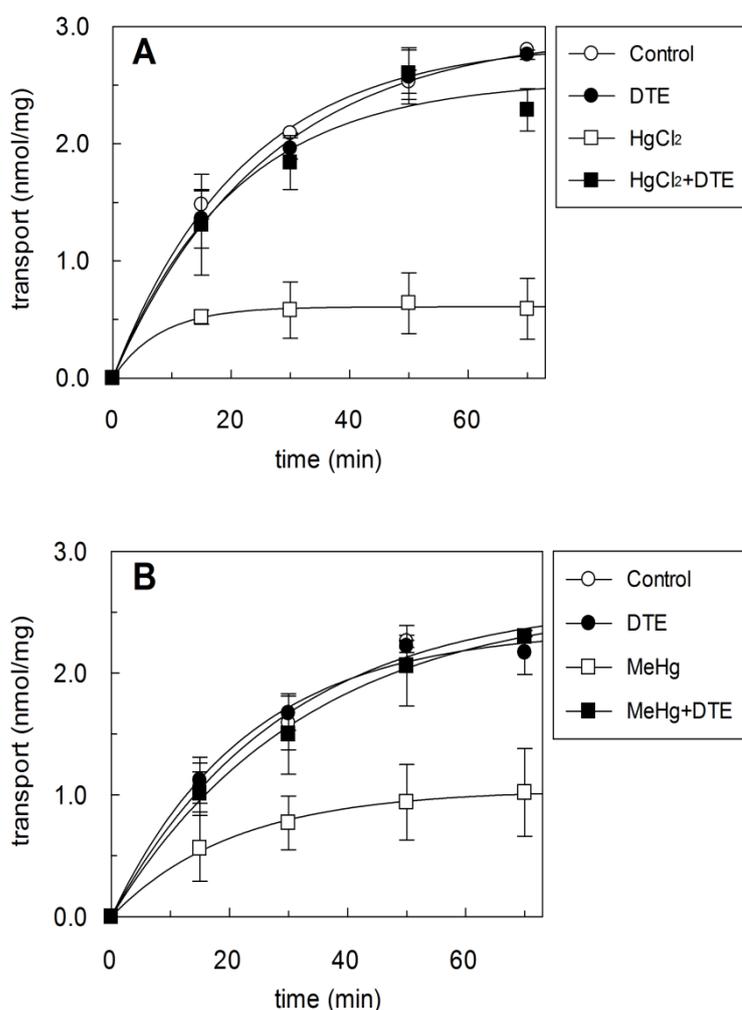


Figura 1: Effetto dei HgCl_2 e MeHg sull'antiporto di carnitina mediato dal trasportatore ricostituito: i proteoliposomi sono stati preincubati o meno con i reagenti mercuriali per due minuti e poi passati attraverso una colonna Sephadex G-75. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ^3H -carnitina 10 μM e NaCl 50 mM a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 15 mM non incubati (\circ, \bullet) o incubati (\square, \blacksquare) con HgCl_2 5 μM (A) o MeHg 5 μM (B). In \bullet e \blacksquare è stato aggiunto DTE 2 mM, 2 minuti dopo l'aggiunta di HgCl_2 (A) e MeHg (B). Il trasporto è stato inibito ai tempi indicati come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

È stato precedentemente dimostrato che uno o più gruppi SH di residui di Cys del trasportatore OCTN2 sono esposti verso il lato esterno dei proteoliposomi (Figura 2), che a sua volta corrisponde al lato sito extracitosolico nella cellula intatta [32,68]. Questi gruppi funzionali potrebbero essere coinvolti nel meccanismo di inibizione da parte di questi reagenti mercuriali.

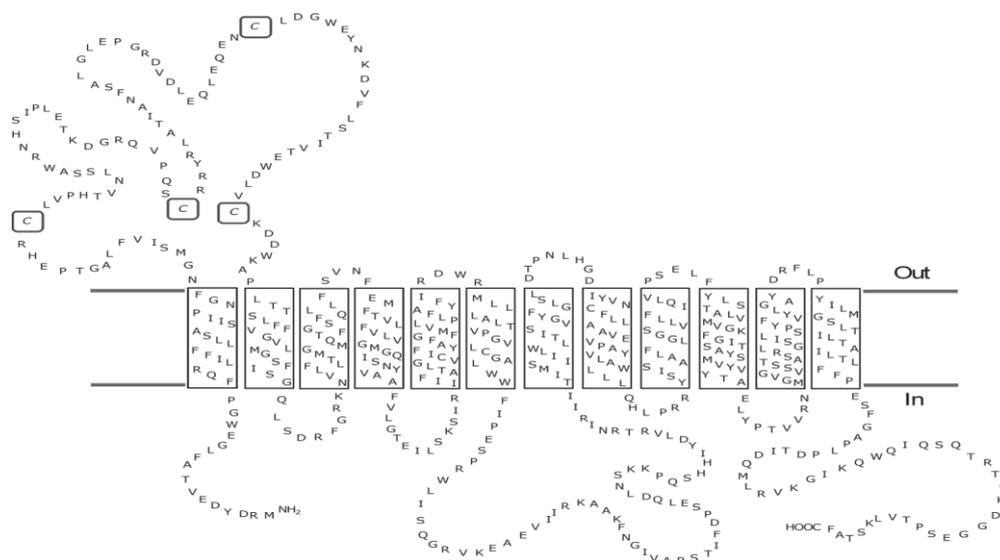


Figura 2: topologia del trasportatore OCTN2 di ratto. L'immagine mostra 12 segmenti transmembrana ad α -elica, e un loop extracellulare contenente 4 dei totali 7 residui di Cys presenti nel trasportatore. Il modello è stato creato tramite il software di previsione TM-PRED e modificato tenendo in considerazione i criteri stabiliti per le proteine di membrana. Sono stati evidenziati i residui di Cys posizionati nella porzione extracellulare della proteina.

Per valutare l'ipotesi che questi residui di Cys posizionati nel loop extracellulare siano coinvolti nel meccanismo di inibizione da parte dei reagenti mercuriali, è stato testato l'effetto del DTE, agente riducente dei ponti disolfuro. L'aggiunta di DTE 2 mM ai proteoliposomi dopo incubazione con i composti mercuriali causa un ripristino totale dell'attività di trasporto (Figura 1A e 1B).

Il DTE quindi è in grado di rompere i legami covalenti che si vanno a creare fra i reagenti mercuriali e il trasportatore OCTN2.

Nelle prove in cui il DTE è stato aggiunto 2 minuti dopo l'aggiunta di HgCl_2 e MeHg, infatti, il trasporto risulta del tutto paragonabile a quello del controllo, inoltre è stato dimostrato come l'aggiunta di DTE al controllo (proteoliposomi non trattati con i reagenti mercuriali) non ha nessun effetto sull'efficienza di trasporto di OCTN2. La capacità del DTE di invertire l'effetto di HgCl_2 e MeHg, quindi, dimostra come i gruppi SH della proteina siano coinvolti nel legame con i reagenti mercuriali.

Successivamente è stata valutata la capacità di agenti antiossidanti non tossici, quali la Cisteina (Cys), N-acetilcisteina (NAC) e S-carbossimetilcisteina (CMC), di invertire l'inibizione da parte dei reagenti mercuriali (figura 3). In questi esperimenti HgCl_2 e MeHg sono stati aggiunti a concentrazioni tali da causare un'inibizione del trasporto di carnitina pari a 80%, rispettivamente 8 μM e 10 μM per HgCl_2 e MeHg. Come mostrato in figura 3 la percentuale di attività residua di trasporto è uguale sia nel controllo (senza aggiunta di altri effettori) sia nel controllo in presenza di Cys, NAC e CMC a dimostrazione del fatto che questi agenti antiossidanti non hanno alcun effetto sull'attività di trasporto di OCTN2.

L'aggiunta di Cys dopo 10 minuti di incubazione dei proteoliposomi con HgCl_2 e MeHg causa un completo ripristino dell'attività di trasporto. L'effetto di NAC risulta invece inferiore, si osserva infatti un ripristino del 66% dell'attività di trasporto nel caso di HgCl_2 , e del 24% nel caso del MeHg.

Al contrario non è stato osservato nessun effetto dopo l'aggiunta di CMC ai proteoliposomi pretrattati con HgCl_2 e MeHg.

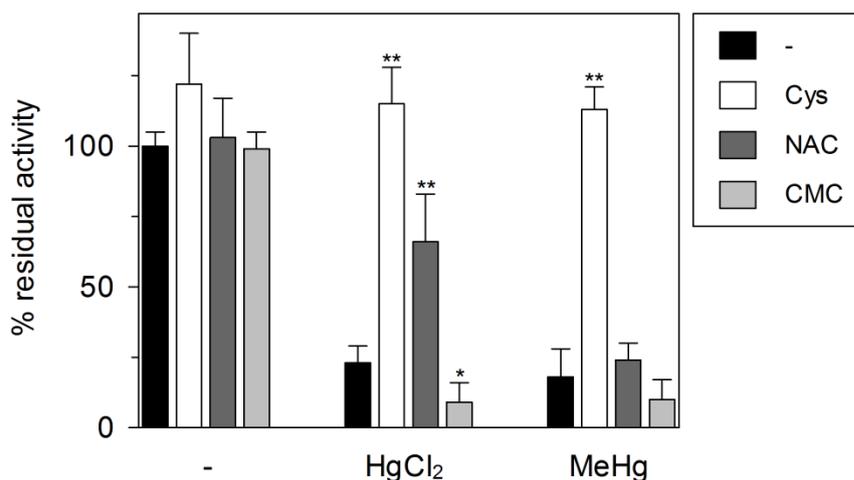


Figura 3: Effetto di Cys, NAC e CMC sull'inibizione dell'antiport di carnitina da parte di HgCl₂ e MeHg. I proteoliposomi sono stati incubati con HgCl₂ 8 μ M e MeHg 10 μ M, dopo due minuti sono stati aggiunti ai proteoliposomi Cys, NAC e CMC 5 mM. Dopo 10 minuti i proteoliposomi sono stati fatti passare attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 e l'attività di trasporto è stata valutata dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. Nel grafico è riportata la percentuale di attività residua rispetto al controllo (1.4 ± 0.31 nmol/15 min/mg proteina). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

3.1.2 CINETICA DI INIZIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 RICOSTITUITO DA PARTE DEI COMPOSTI MERCURIALI

Per comprendere il meccanismo alla base dell'interazione del sistema di trasporto OCTN2 con i reagenti mercuriali sono stati effettuati esperimenti di cinetica. È stata studiata, dunque, la dipendenza dell'inibizione dalla concentrazione extraliposomiale di HgCl₂ e MeHg, misurando la velocità di antiport, come uptake di ³H- carnitina 10 μ M in proteoliposomi contenenti carnitina 15 mM.

La curva dose-risposta è mostrata in Figura 4: la completa inibizione del trasporto è stata osservata alla concentrazione 10 μ M per HgCl₂ e 30 μ M per il MeHg. I valori di IC₅₀ calcolati dalla media di tre esperimenti sono rispettivamente $2,5 \pm 0,24$ μ M per HgCl₂ e $7,4 \pm 0,41$ μ M per MeHg.

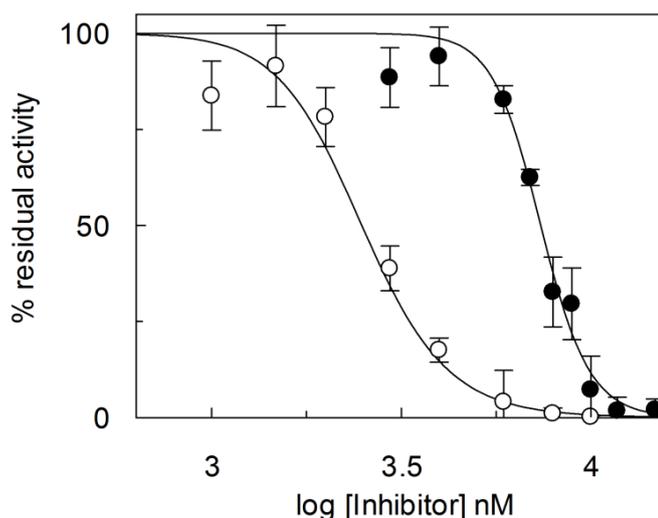


Figura 4: curva dose-risposta dell'inibizione del trasportatore OCTN2 ricostituito da parte di HgCl₂ e MeHg. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi in presenza delle concentrazioni indicate in grafico di HgCl₂ (○) e MeHg (●), aggiunti al tempo zero ai proteoliposomi. Il trasporto è stato stoppato dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. La percentuale di attività residua è stata calcolata rispetto al controllo (1.3 ± 0.38 nmol/15 minu/mg proteina). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Per ottenere ulteriori informazioni sul meccanismo di inibizione del trasporto della carnitina, sono stati condotti, successivamente, esperimenti rivolti alla caratterizzazione cinetica dell'inibizione del trasporto da parte dei reagenti mercuriali, misurando la velocità del trasporto in presenza di due diverse concentrazioni di HgCl₂ e MeHg (Figura 5).

I dati sono stati analizzati secondo l'equazione dei doppi reciproci di Lineweaver- Burk e mostrano un'inibizione di tipo non competitiva nel caso del HgCl₂ (Figura 5A) e un'inibizione di tipo mista nel caso del MeHg (Figura 5B).

La costante di affinità del trasportatore per l'inibitore (K_i) è risultata essere di $4,2 \pm 2,5$ μ M per HgCl₂ e 13 ± 4.8 μ M per MeHg.

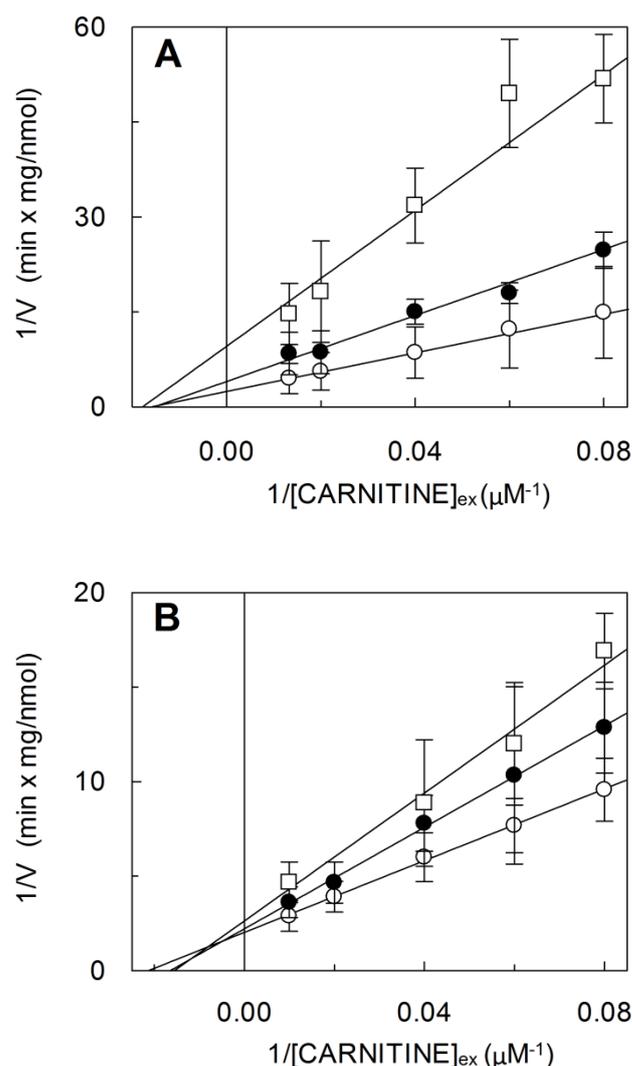


Figura 5: analisi cinetica dell'inibizione del trasportatore ricostituito da parte di HgCl₂ e MeHg. L'attività di trasporto è stata misurata come descritto in Materiali e Metodi tramite l'aggiunta di [³H] carnitina alle concentrazioni indicate nel grafico. I dati sperimentali sono stati interpolati secondo l'equazione dei doppi reciproci di Lineweaver- Burk in assenza (\circ) o in presenza di (A) 3 μM (\bullet) e 6 μM (\square) HgCl₂, e (B) 4 μM (\bullet) e 7 μM (\square) MeHg. Il trasporto è stato bloccato dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Nel caso di inibizione covalente, un tipo di inibizione non competitiva può essere osservata se l'inibitore interagisce con il sito di legame del substrato [90], inoltre anche l'inibizione mista indica una possibile interazione con il sito di legame per il substrato. Infatti se i siti attivi e di inibizione si sovrappongono, l'aggiunta del substrato prima dell'inibitore causa una riduzione del fenomeno inibitorio. Per chiarire questo punto sono stati condotti esperimenti in cui è

stato valutato l'effetto protettivo della presenza di carnitina extraliposomiale durante l'incubazione con gli inibitori. I proteoliposomi sono stati incubati con HgCl_2 2,5 μM e MeHg 7,4 μM , ovvero le concentrazioni che corrispondono al valore di IC_{50} calcolato precedentemente. In assenza di carnitina l'attività residua del trasportatore risulta quindi pari al 50% nelle prove trattate con entrambi gli inibitori (Figura 6). La presenza di carnitina invece causa una riduzione dell'inibizione in una maniera dose-dipendente. Nel caso di HgCl_2 (Figura 6A) l'effetto di inibizione viene evitato a concentrazioni di carnitina comprese fra 1 e 15 mM. Risultati simili sono stati ottenuti nel caso del MeHg (Figura 6B) con la differenza che i primi effetti di protezione della carnitina si evidenziano già alla concentrazione di 0,2 mM e rimangono costanti fino alla concentrazione 15 mM.

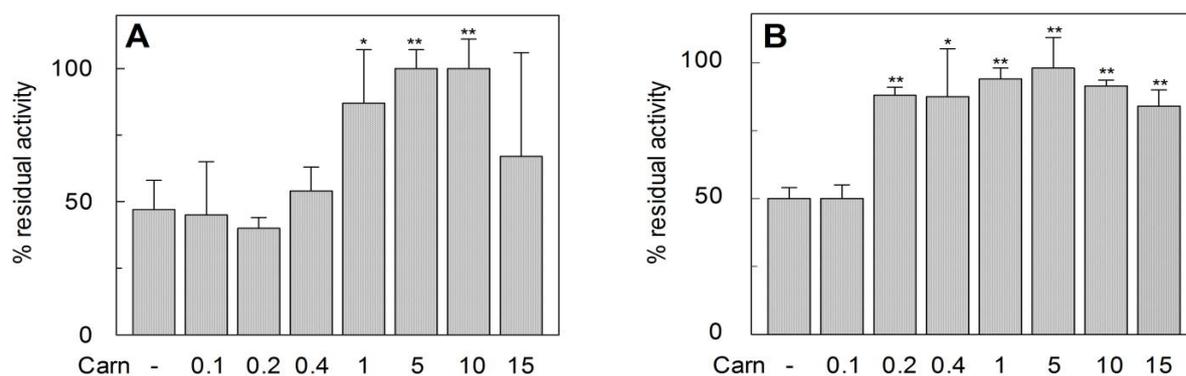


Figura 6: Influenza del substrato sull'inibizione del trasportatore ricostituito da parte di HgCl_2 e MeHg. Dopo l'aggiunta di HgCl_2 2,5 μM (A) e MeHg 7,4 μM (B) e carnitina alle concentrazioni (mM) indicate in grafico, i proteoliposomi sono stati fatti passare attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 e il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi. Nel grafico è riportata la percentuale di attività residua rispetto al controllo (1.2 ± 0.26 nmol/15 min/mg proteina). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

3.1.3 VALUTAZIONE DEL TRASPORTO DI MERCURIALI DA PARTE DI OCTN2

Alcuni trasportatori di amminoacidi e anioni organici sono in grado di trasportare MeHg coniugato a una molecola di L-Cys [84,86,87]. Per chiarire se il sistema di trasporto OCTN2 ricostituito è in grado di trasportare i reagenti mercuriali sotto forma di coniugati con la L-Cys è stata valutata la capacità di questi composti di stimolare l'antiport di carnitina in un esperimento di efflusso (Figura 7). Questa strategia è stata messa a punto, già in precedenza, per valutare il trasporto di altri composti, in scambio con la carnitina, da parte di OCTN2 [38]. In questi esperimenti i proteoliposomi sono stati incubati con [³H]-carnitina in modo da garantire l'uptake della stessa all'interno delle vescicole fino al raggiungimento dell'equilibrio (75 minuti). La misurazione dell'attività di trasporto, in efflusso, è stata effettuata aggiungendo all'esterno carnitina fredda, HgCl₂ o MeHg 0.5 mM e NaCl 50 mM. Per poter paragonare gli effetti, la concentrazione di carnitina usata nei controlli è la stessa usata nel caso dei composti mercuriali, ed è inferiore a 1 mM in modo da non avere effetti aspecifici sulle membrane dei liposomi.

L'efflusso in assenza del substrato extraliposomiale (uniport di carnitina) risulta essere fortemente stimolato dalla presenza di MeHg, HgCl₂ e carnitina 0.5 mM; nessun effetto è stato invece osservato alle basse concentrazioni di mercuriali (10μM). A seguito dell'aggiunta dei composti coniugati del mercurio (MeHg-L-Cys, HgCl₂) 0.5 mM o MeHg e DTE 2 mM non si osserva invece un incremento dell'efflusso di carnitina radioattiva dai proteoliposomi (Figura 7A). Per verificare che la stimolazione dell'efflusso di carnitina fosse specificatamente correlata al trasportatore e non ad altri fenomeni, come alterazioni della membrana dei proteoliposomi a seguito dell'aggiunta dei reagenti mercuriali, è stato misurato l'efflusso in assenza o in presenza di HgCl₂ e MeHg esterno in liposomi in cui non è stata incorporata la proteina, e preincubati con [³H]-carnitina. Come mostrato nella figura 7A, in questi liposomi non è stato rilevato alcun fenomeno di efflusso in assenza o in presenza di composti

mercuriali, il che indica che HgCl_2 e MeHg non causano alterazioni della membrana e quindi fenomeni di efflusso di carnitina aspecifici e non correlati al trasportatore.

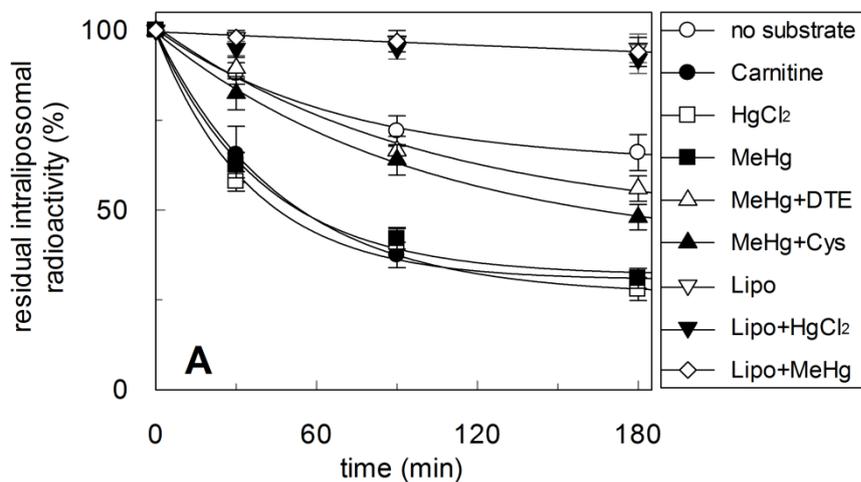


Figura 7A: efflusso di ^3H -carnitina mediato dal sistema ricostituito in presenza di mercuriali: I proteoliposomi sono stati premarcati come descritto in Materiali e Metodi ($\circ, \blacksquare, \Delta, \square, \blacktriangle, \bullet$). Dopo il secondo passaggio su Sephadex G-75, il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo all'esterno NaCl 50 mM e carnitina 0.5 mM (\bullet), MeHg 0.5 mM (\blacksquare), HgCl_2 0.5 mM (\square), MeHg 0.5 mM e DTE 1 mM (aggiunto due minuti prima di far partire il trasporto) (Δ), coniugato MeHg-Cys (\blacktriangle) o buffer (senza substrato) (\circ). Nei liposomi senza la proteina incorporata, preincubati con [^3H]carnitina 15 mM, è stato aggiunto all'esterno buffer (no substrato) (∇), HgCl_2 0.5 mM (\blacktriangledown), MeHg 0.5 mM (\diamond). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

In un altro esperimento è stato valutato l'uptake di [^3H]carnitina (Figura 7B), mantenendo la concentrazione di carnitina intraliposomiale uguale a quella dei reagenti mercuriali (0.5 mM). L'uptake di [^3H]carnitina dei proteoliposomi contenenti carnitina 0.5 mM risulta più basso rispetto a quello rilevato negli esperimenti mostrati in figura 1 dove la concentrazione di carnitina intraliposomiale era pari a 15 mM. L'accumulo di [^3H]carnitina nei proteoliposomi in presenza di entrambi i composti mercuriali risulta essere inferiore rispetto a quello rilevato in presenza di carnitina, e paragonabile a quello trovato in assenza del substrato intraliposomiale. Questi risultati indicano che il MeHg e i suoi coniugati non stimolano l'uptake di carnitina (Figura 7B).

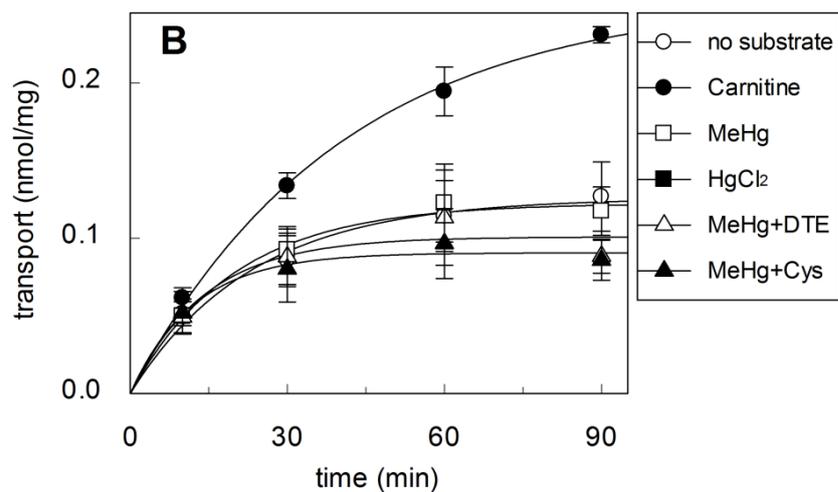


Figura 7B: uptake di ³H-carnitina mediato dal sistema ricostituito in presenza di mercuriali: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi, aggiungendo ³H-carnitina 10 μM e NaCl 50 mM al tempo zero a proteoliposomi contenenti 0.5 mM carnitina (●), MeHg 0.5 mM (□), HgCl₂ 0.5 mM (■), MeHg-Cys 0.5 mM (▲), 0.5 mM MeHg più DTE 2 mM (△), o buffer (no substrato) (○). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

3.2 INIBIZIONE DEL TRASPORTATORE OCTN1 UMANO DA PARTE DI HgCl₂ METILMERCURIO E CADMIO NEL MODELLO SPERIMENTALE DEI PROTEOLIPOSOMI: IDENTIFICAZIONE DEI RESIDUI DI CYS INPLICATI NELL'INTERAZIONE FRA LA PROTEINA E I REAGENTI DEI GRUPPI SULFRIDRILICI.

3.2.1 INIBIZIONE DEL TRASPORTO DI TEA NELLA PROTEINA WT DA PARTE DI MERCURIALI E METALLI PESANTI

In questa seconda parte del mio lavoro di tesi è stato investigato l'effetto dei composti mercuriali sul trasportatore umano di cationi organici OCTN1 ricostituito in liposomi. L'attività di trasporto è stata misurata come uptake di [¹⁴C]TEA in proteoliposomi in presenza di MeHg, HgCl₂ e CdCl₂ aggiunti all'esterno. L'effetto dei composti mercuriali e dei metalli pesanti sul trasportatore OCTN1 è stato valutato in esperimenti di time course. L'aggiunta di HgCl₂ e MeHg 12 μM e CdCl₂ 46 μM inibisce fortemente il trasporto di TEA da parte di OCTN1. Dopo 15 minuti, infatti tutti e tre i composti inibiscono il trasporto di più del 50 %. Per verificare se l'inibizione del trasporto è causata dalla formazione di legami covalenti dei composti mercuriali con il trasportatore, l'attività residua di trasporto è stata calcolata dopo l'incubazione dei proteoliposomi con MeHg, HgCl₂ e CdCl₂, e la successiva rimozione dell'eccesso di reagenti che non hanno reagito con la proteina. Per raggiungere tale obiettivo i proteoliposomi sono stati incubati con i tre reagenti dei gruppi sulfidrilici e passati attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 per rimuovere la porzione di molecole che non ha interagito con la proteina di membrana. A seguito di questa procedura l'attività di trasporto è stata valutata come descritto in Materiali e Metodi (2.12), quello che si è visto è che l'aggiunta di HgCl₂ 12 μM (figura 8A), MeHg 12 μM (figura 8B) e CdCl₂ 46 μM (figura 8C) inibisce fortemente il trasporto di TEA da parte di OCTN1. Dopo 10 minuti è

stata infatti registrata una inibizione del trasporto pari al 44% nel caso di MeHg, 40% per quanto riguarda HgCl₂ e 39% nel caso del CdCl₂. Dopo 90 minuti il trasporto risulta ulteriormente inibito fino a valori pari a 63%, 54% e 50% in presenza rispettivamente di HgCl₂, MeHg e CdCl₂. I dati sperimentali riportati in figura 8 sono stati interpolati con un'equazione di velocità di primo ordine. Per valutare se i residui di Cys sono coinvolti nel meccanismo di inibizione da parte dei reagenti mercuriali e dei metalli pesanti, è stato testato l'effetto del DTE, agente riducente dei ponti disolfuro.

L'aggiunta di DTE 2 mM ai proteoliposomi dopo incubazione con i reagenti dei gruppi sulfidrilici causa un ripristino totale dell'attività di trasporto (Figura 8 A,B,C). Il DTE quindi è in grado di rompere i legami covalenti che si vanno a creare fra tali reagenti e il trasportatore hOCTN1. Infatti, dopo 30 minuti dall'inizio del trasporto, l'aggiunta del DTE alle prove precedentemente incubate con HgCl₂, MeHg e CdCl₂, causa un ripristino totale del trasporto. La capacità del DTE di invertire l'effetto di HgCl₂, MeHg e CdCl₂, quindi, dimostra come i gruppi SH della proteina siano coinvolti nel legame con tali reagenti.

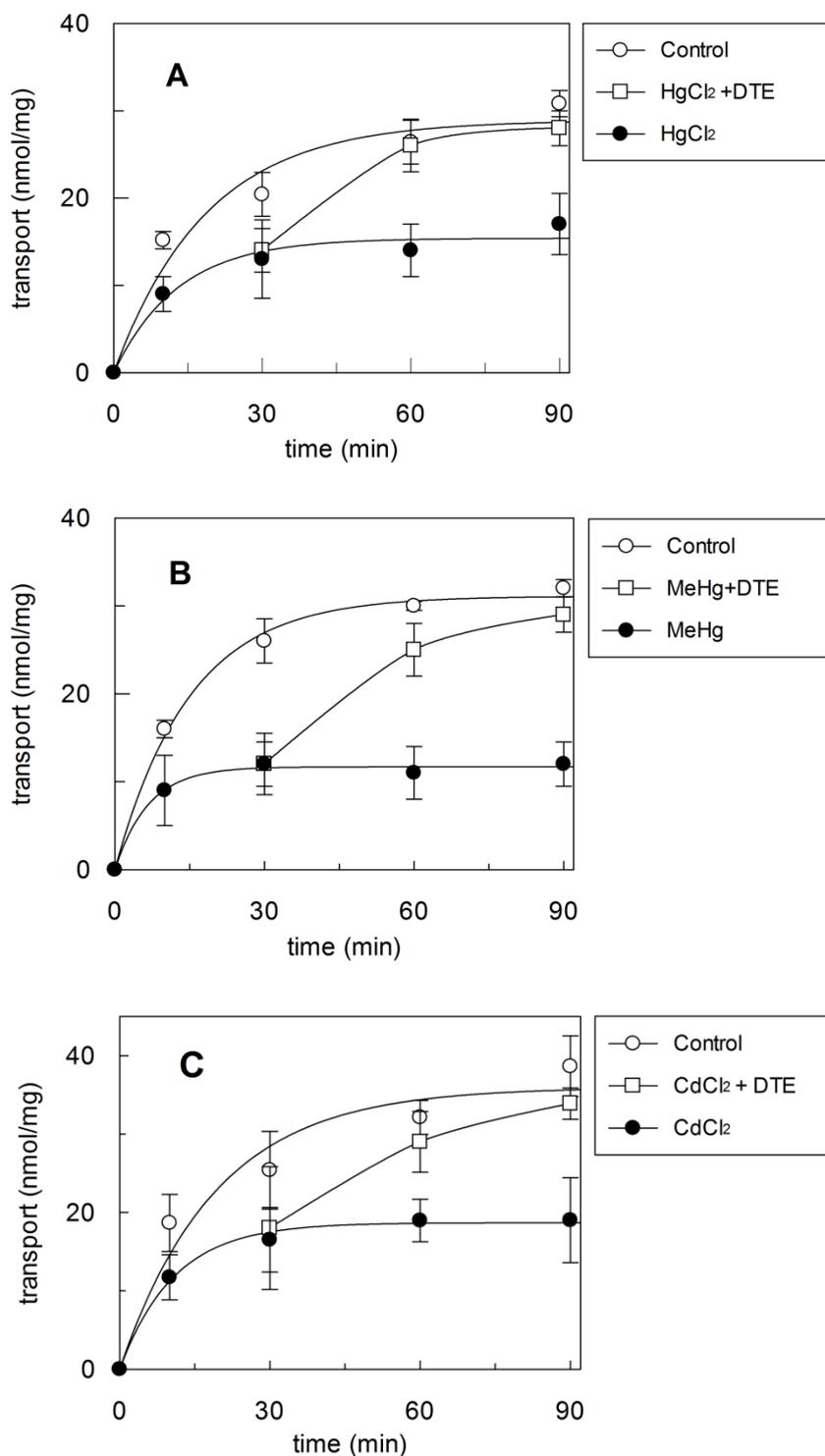


Figura 8: Effetto di HgCl₂, MeHg e CdCl₂ sull'antiport di TEA mediato dal trasportatore hOCTN1 ricostituito: i proteoliposomi sono stati preincubati o meno con i reagenti per due minuti e passati attraverso una colonna Sephadex G-75. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ¹⁴C-TEA 10 μM a tempo zero all'esterno dei proteoliposomi precedentemente incubati in assenza (○) o in presenza di HgCl₂ 18 μM (A), MeHg 18 μM (B) e CdCl₂ 46 μM (●). In □ è stato aggiunto DTE 2 mM, 30 minuti dopo l'inizio del trasporto in proteoliposomi in presenza di HgCl₂ (A), MeHg (B) e CdCl₂ (C). Il trasporto è stato inibito ai tempi indicati come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Oltre ai reagenti mercuriali e a metalli pesanti sono stati studiati gli effetti di reagenti chimici di cui è nota in letteratura la capacità di interagire con i gruppi SH delle proteine di membrana formando ponti disolfuro misti, i composti MTS (methanethiosulfonate).

In particolare sono stati testati MTSEA, MTSES e MTSEA, fra cui il più efficace è risultato essere MTSEA. MTSEA (methyl thiosulfonate ethylammonium) è uno dei composti maggiormente usati per la valutazione dell'accessibilità di diversi reagenti a residui di cisteina e per l'identificazione di porzioni della proteina funzionalmente o strutturalmente importanti, questo composto infatti è in grado di legarsi alla catena laterale neutra di un residuo di cisteina caricandolo positivamente e rendendolo strutturalmente simile a un residuo di lisina.

Gli esperimenti condotti su MTSEA hanno evidenziato un andamento del tutto simile a quello dei metalli pesanti e dei composti tossici.

Infatti l'aggiunta di MTSEA 164 μ M inibisce fortemente il trasporto di [14 C]TEA, dopo 10 minuti è stata infatti registrata una inibizione pari al 30% mentre dopo 90 minuti di trasporto l'inibizione risulta pari al 46%. L'aggiunta di DTE 2 mM ai proteoliposomi dopo incubazione con MTSEA causa un ripristino totale dell'attività di trasporto (Fig. 9). I dati ottenuti con MTSEA hanno permesso quindi di confermare l'interazione di questi composti tossici con i gruppi SH della proteina.

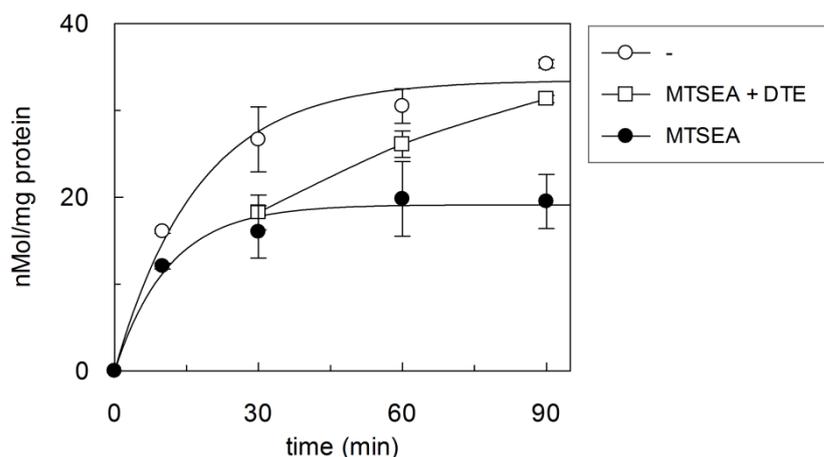


Figura 9: Effetto di MTSEA sull'antiporto di TEA mediato dal trasportatore hOCTN1 ricostituito: i proteoliposomi sono stati preincubati o meno con MTSEA per due minuti e passati attraverso una colonna Sephadex G-75. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ^{14}C -TEA 0,1 mM a tempo zero all'esterno dei proteoliposomi in assenza (○) o in presenza di MTSEA 164 μM (●). In □ è stato aggiunto DTE 2 mM, 30 minuti dopo l'inizio del trasporto in proteoliposomi in presenza di MTSEA. Il trasporto è stato inibito ai tempi indicati come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Successivamente è stata valutata la capacità di agenti antiossidanti non tossici, quali la Cisteina (Cys), N-acetilcisteina (NAC) e S-carbossimetilcisteina (CMC), di invertire l'inibizione da parte dei reagenti mercuriali e dei metalli pesanti (figura 10). In questi esperimenti i reagenti dei gruppi sulfidrilici sono stati aggiunti a concentrazioni tali da causare il 50% di inibizione di trasporto di TEA da parte di OCTN1, rispettivamente 18 μM per HgCl_2 e MeHg e 60 μM per il CdCl_2 . Come mostrato in figura 10 la percentuale di attività residua di trasporto è uguale sia nel controllo (senza aggiunta di altri effettori) sia nel controllo in presenza di Cys, NAC e CMC a dimostrazione del fatto che questi agenti antiossidanti non hanno alcun effetto sull'attività di trasporto di OCTN1.

L'aggiunta di Cys e NAC dopo 20 minuti di incubazione dei proteoliposomi con HgCl_2 causa un completo ripristino dell'attività di trasporto, mentre la CMC sembra non avere alcun effetto. L'aggiunta di Cys, CMC e NAC ai proteoliposomi dopo 20 minuti di incubazione con MeHg causa invece un ripristino dell'attività di trasporto pari rispettivamente al 92%, 83% e 79%. Nel caso del CdCl_2 invece è stato rilevato un leggero ripristino dell'attività di trasporto

dopo l'aggiunta di Cys e NAC (68% e 72%), mentre nessuno effetto è stato osservato dopo l'aggiunta di CMC.

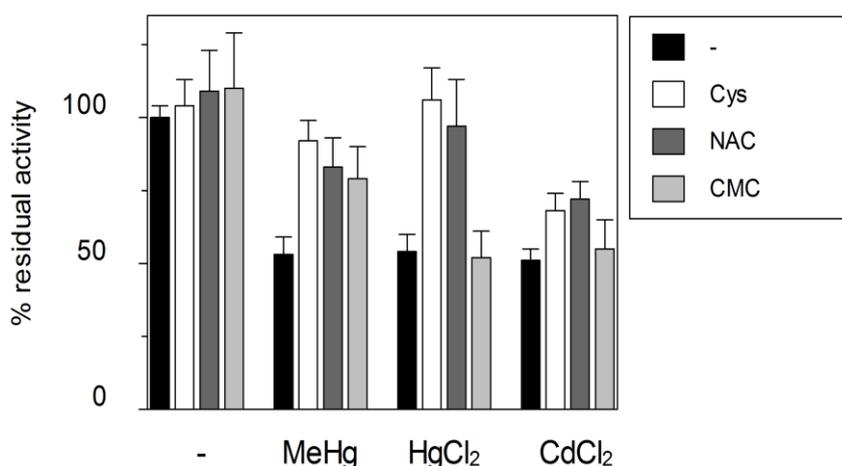


Figura 10: Effetto di Cys, NAC e CMC sull'inibizione dell'antiport di TEA da parte di HgCl₂, MeHg e CdCl₂. I proteoliposomi sono stati incubati con HgCl₂ e MeHg 18 μM e CdCl₂ 60 μM, dopo due minuti sono stati aggiunti ai proteoliposomi Cys, NAC e CMC 5 mM. Dopo 15 minuti i proteoliposomi sono stati fatti passare attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 e l'attività di trasporto è stata valutata dopo 60 minuti come descritto in Materiali e Metodi. Nel grafico è riportata la percentuale di attività residua rispetto al controllo. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

3.2.2 CINETICA DI INIZIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO hOCTN1 DA PARTE DEI COMPOSTI MERCURIALI E CADMIO

Per comprendere meglio il meccanismo alla base dell'interazione del sistema di trasporto hOCTN1 con i reagenti mercuriali e il CdCl₂ sono stati effettuati esperimenti di cinetica. È stata studiata, dunque, la dipendenza dell'uptake di [¹⁴C]TEA dalla concentrazione extraliposomiale di HgCl₂, MeHg, CdCl₂ e MTSEA.

La curva dose-risposta è mostrata in Figura 11: la completa inibizione del trasporto è stata osservata alla concentrazione 300 μM per HgCl₂, 1 mM per il MeHg, 500 μM per il CdCl₂ e 3 mM nel caso di MTSEA. I valori di IC₅₀ calcolati dalla media di tre esperimenti sono rispettivamente 12 μM per HgCl₂ e MeHg, 31 μM per il CdCl₂ e 164 μM per MTSEA.

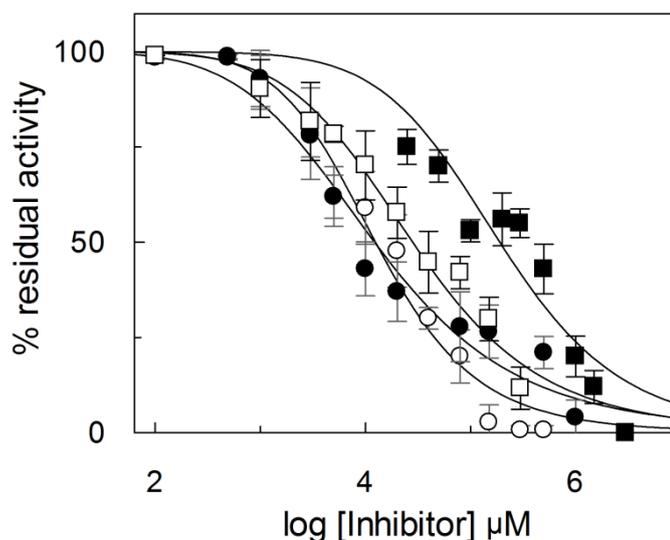


Figura 10: curva dose-risposta dell'inibizione del trasportatore hOCTN1 ricostituito da parte di HgCl₂, MeHg, Cadmio e MTSEA. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi in presenza delle concentrazioni indicate in grafico di HgCl₂ (○), MeHg (●), CdCl₂ (□) e MTSEA (■), aggiunti al tempo zero ai proteoliposomi. Il trasporto è stato stoppato dopo 60 minuti come descritto in Materiali e Metodi. La percentuale di attività residua è stata calcolata rispetto al controllo. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Per verificare se il sito attivo e di inibizione della proteina si sovrappongono, sono stati condotti esperimenti in cui è stato valutato l'effetto protettivo dato dalla presenza di TEA extraliposomiale durante l'incubazione con il MeHg, per verificare se l'aggiunta del substrato prima dell'inibitore causa una riduzione del fenomeno inibitorio. I proteoliposomi sono stati così incubati con MeHg 12 μ M, ovvero con la concentrazione che corrisponde al valore di IC₅₀ calcolato precedentemente. In assenza di TEA l'attività residua del trasportatore risulta essere pari al 48% nelle prove trattate con l'inibitore (Figura 11). Come evidente dal grafico l'aggiunta di TEA 1 mM e 10 mM non causa nessuna reversione del fenomeno inibitorio da parte del MeHg, il che indica che tale composto si lega in un sito diverso rispetto a quello per il substrato. Medesimi esperimenti sono stati condotti per HgCl₂ e CdCl₂ e anche in questo caso non è stato rilevato alcun fenomeno di protezione da parte del TEA.

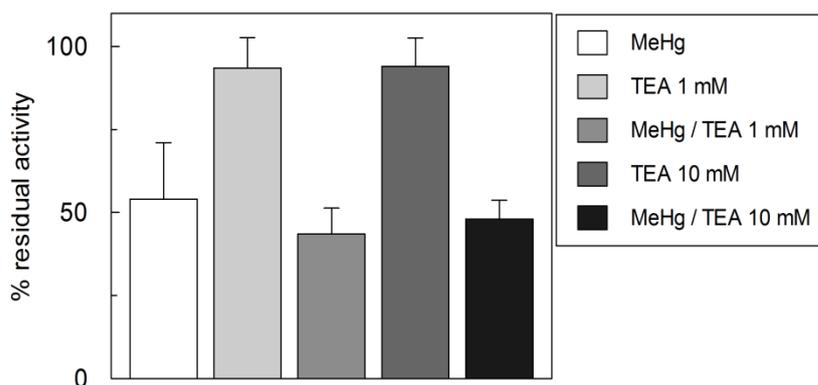


Figura 11: Influenza del substrato sull'inibizione del trasportatore ricostituito da parte di MeHg. Dopo l'aggiunta di MeHg 12 μ M e TEA 1 mM e 10 mM, i proteoliposomi sono stati fatti passare attraverso una colonna cromatografica contenente la resina Sephadex G-75 e il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi. Nel grafico è riportata la percentuale di attività residua rispetto al controllo. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

3.2.3 IDENTIFICAZIONE DEI RESIDUI DI CYS INPLICATI NELL'INTERAZIONE FRA LA PROTEINA E I REAGENTI DEI GRUPPI SULFRIDRILICI.

Il modello bidimensionale della proteina OCTN1 mostra la presenza di 7 residui di Cys, di cui quattro sono posizionati nel loop extracellulare mentre tre sono localizzati nei segmenti transmembrana della proteina. In particolare i 4 residui di Cys presenti nel loop extracellulare potrebbero essere quelli maggiormente coinvolti nell'interazione con questi composti xenobiotici [54].

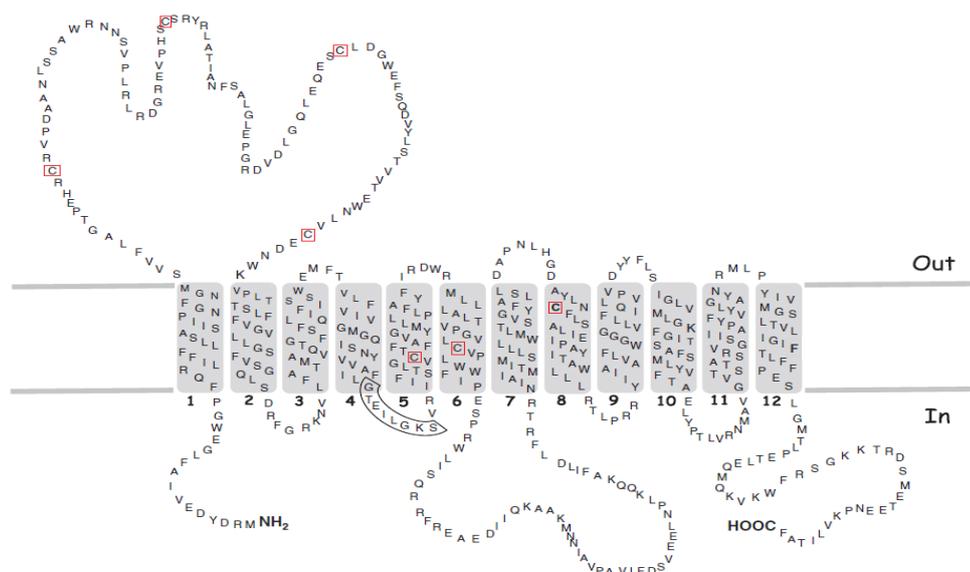


Figura 12: topologia di hOCTN1 con 12 domini transmembrana ad α -elica. Il modello è stato creato utilizzando il software di predizione TM-PRED e adattato tenendo in considerazione alcuni parametri riguardanti le proteine trans membrana. I segmenti transmembrana sono numerati (1-12) e le cisteine evidenziate in rosso.

Al fine di confermare il coinvolgimento dei residui di Cys nell'interazione fra hOCTN1 e i composti precedentemente testati, e per identificare i possibili target di questi reagenti, sono stati creati tramite mutagenesi sito diretta 7 mutanti di OCTN1. Ognuno dei sette residui di Cys presenti nel trasportatore è stato mutato in alanina, inoltre è stato creato un ottavo mutante in cui due residui di Cys sono stati convertiti in alanina (C50A/C136A). L'attività dei mutanti è stata valutata in esperimenti di time course, in modo da verificare se uno o più residui di Cys risultano critici per l'attività trasporto di [14 C]TEA da parte di hOCTN1. Come mostrato nella figura 13, le mutazioni inserite nella struttura della proteina influenzano solo leggermente l'attività di trasporto. I time course dei mutanti C50A, C81A e C236A risultano del tutto coincidenti con quelli della proteina WT. I mutanti C113A e C136A mostrano invece una leggera riduzione dell'attività di trasporto, mentre nel caso dei mutanti C270A e C374A si nota un leggero aumento dell'attività di trasporto rispetto alla proteina WT. Alla luce dei risultati ottenuti è stato dunque possibile concludere che le mutazioni dei residui di Cys non influenzano significativamente il trasporto di [14 C]TEA da parte di hOCTN1.

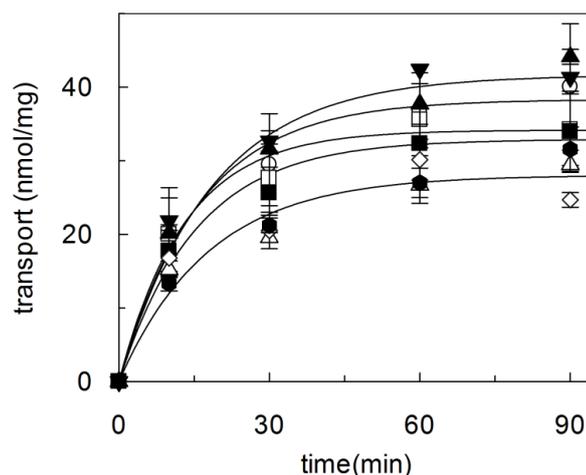


Figura 13: Time course dell'uptake di TEA nei sette mutanti ricostituiti di hOCTN1: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo [14 C]TEA 0.1 mM a tempo zero all'esterno dei proteoliposomi e bloccato nei tempi indicati in grafico come descritto in Materiali e Metodi. In grafico sono mostrati i time course della proteina WT (○) e dei mutanti C50A (▼), C81A (□), C113A (■), C136A (△); C236A (▲), C270A (◇) e C374A (●). I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Al fine di identificare i possibili residui di Cys target dei composti mercuriali sono stati condotti esperimenti in cui è stata valutata la dipendenza del trasporto di [14 C]TEA dalla concentrazione extraliposomiale di ciascun inibitore in ciascun mutante. I dati sono stati messi a paragone con quelli precedentemente rilevati per la proteina WT. Le curve dose-risposta mostrate nella Figura 14 presentano un andamento del tutto simile. Sia HgCl₂ che MeHg inibiscono fortemente la proteina WT e i mutanti C81A, C113A, C236A, C270A e C374A. Mentre è evidente un netto spostamento delle curve verso concentrazioni elevate di composti nel caso dei mutanti C50A e C136A, il che indica un decremento dell'affinità di questi mutanti per i reagenti mercuriali. I valori di IC₅₀ ottenuti per i mutanti C50A e C136A risultano infatti molto più alti rispetto a quelli rilevati per la proteina WT, il che indica un possibile coinvolgimento di questi due residui di Cys nell'interazione della proteina con i reagenti mercuriali. Come precedentemente descritto per la proteina WT le IC₅₀ per HgCl₂ e MeHg risultano essere pari a 12 μM, nel caso del mutante C50A è stata invece rilevata una IC₅₀ pari a 329 μM per HgCl₂ e 192 μM per MeHg, mentre per il mutante C136A le IC₅₀ calcolate

risultano pari a 69 μM e 46 μM rispettivamente per HgCl_2 e MeHg. Per confermare il coinvolgimento di questi due residui di Cys sono stati effettuati i medesimi esperimenti anche sul doppio mutante C50A/C136A. I risultati ottenuti mostrano come in questo mutante ci sia una perdita completa dell'inibizione da parte dei reagenti mercuriali il che conferma come le Cys 50 e 136 siano quelle che permettono l'interazione fra la proteina OCTN1, HgCl_2 e MeHg. Nel caso di MTSEA è stata osservata una notevole riduzione dell'inibizione nei mutanti C50A e C136A rispetto alla proteina WT, con rispettive IC_{50} pari a 720 μM e 1300 μM , a conferma dell'importanza di questi due residui di Cys nell'interazione del trasportatore OCTN1 con i reagenti dei gruppi tiolici. Nel caso di MTSEA inoltre è stata evidenziata una riduzione dell'inibizione anche nel caso del mutante C81A, il che indica che anche questa Cys potrebbe essere coinvolta nell'interazione fra il trasportatore e MTSEA.

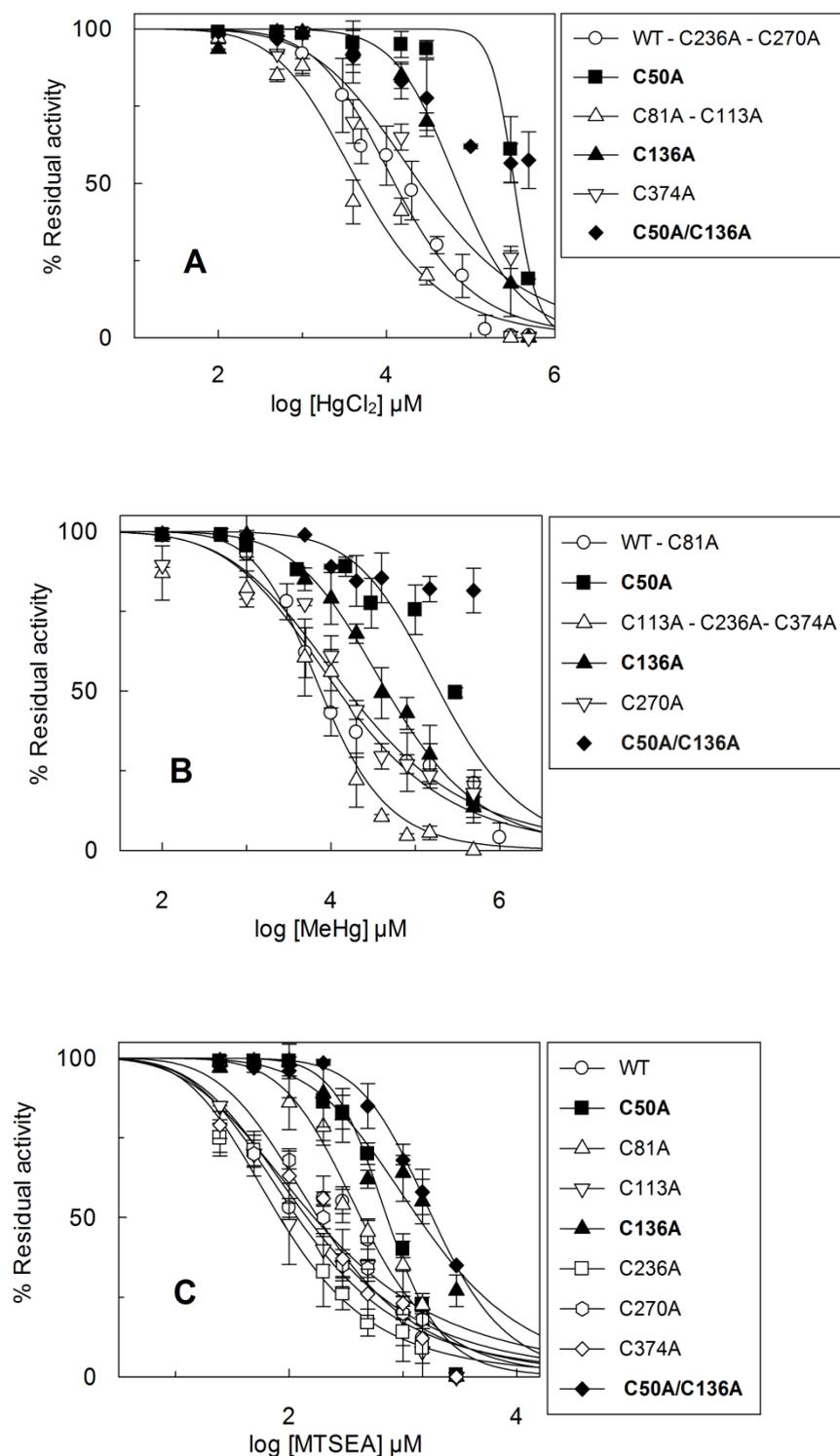


Figura 14: curva dose-risposta dell'inibizione del trasportatore hOCTN1 WT e mutanti da parte di HgCl₂, MeHg e MTSEA. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi in presenza delle concentrazioni indicate in grafico di HgCl₂ (A), MeHg (B) e MTSEA (C), aggiunti al tempo zero ai proteoliposomi. Il trasporto è stato stoppato dopo 60 minuti come descritto in Materiali e Metodi. La percentuale di attività residua è stata calcolata rispetto al controllo. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

I valori di IC₅₀ per ogni inibitore calcolati per la proteina WT e per gli otto mutanti sono stati riportanti in tabella.

Protein	IC ₅₀ (μM)		
	MTSEA	HgCl ₂	MeHg
WT	164 ± 45	12 ± 2	12 ± 3
C50A	720 ± 50	329 ± 35	192 ± 23
C81A	425 ± 49	5 ± 1	12 ± 2
C113A	117 ± 16	6 ± 2	7 ± 2
C136A	1300 ± 218	69 ± 10	46 ± 3
C236A	89 ± 8	13 ± 4	5 ± 2
C270A	170 ± 25	11 ± 4	15 ± 3
C374A	142 ± 26	25 ± 8	10 ± 3
Double mutant	1800 ± 98	714 ± 180	No inhibition

Tabella 1: i valori di IC₅₀ calcolati dalle curve dose risposta per la proteina WT hOCTN1e gli otto mutanti in presenza di MTSEA, HgCl₂ e MeHg. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Come ulteriore conferma dei risultati sperimentali ottenuti è stato utilizzato un approccio bioinformatico al fine di ottenere un modello di omologia del trasportatore umano OCTN1 che permettesse di identificare i residui di Cys esposti verso il lato esterno della membrana plasmatica e che quindi potrebbero essere coinvolti nell'interazione con i reagenti dei gruppi SH. La sequenza di OCTN1 umano è stata quindi allineata con quella del trasportatore eucariotico del fosfato PiPT, *P. indica* Phosphate Transporter, recentemente cristallizzato e utilizzato per la determinazione di modelli di omologia di altri membri della famiglia SLC22 quali OCT1 e OAT3 [117]. L'allineamento fra le due proteine ha evidenziato un'identità di sequenza pari al 20% ed è stato utilizzato per costruire un modello di omologia. Come mostrato in figura 15 i residui di Cys 50 e 136 della proteina OCTN1 risultano essere esposti verso il lato extracellulare della membrana plasmatica, di conseguenza potrebbero essere quelli maggiormente coinvolti nell'interazione con i reagenti dei gruppi SH. Tale ipotesi risulta confermata dai dati sperimentali ottenuti in quanto sia nel caso dei reagenti mercuriali

che nel caso di MTSEA, i mutanti nei quali queste cisteine sono state convertite in alanine presentavano una riduzione dell'inibizione da parte di questi composti, mentre nel doppio mutante in cui entrambe le cisteine sono state convertite in alanine si è osservata una perdita totale del potere inibitorio di questi composti.

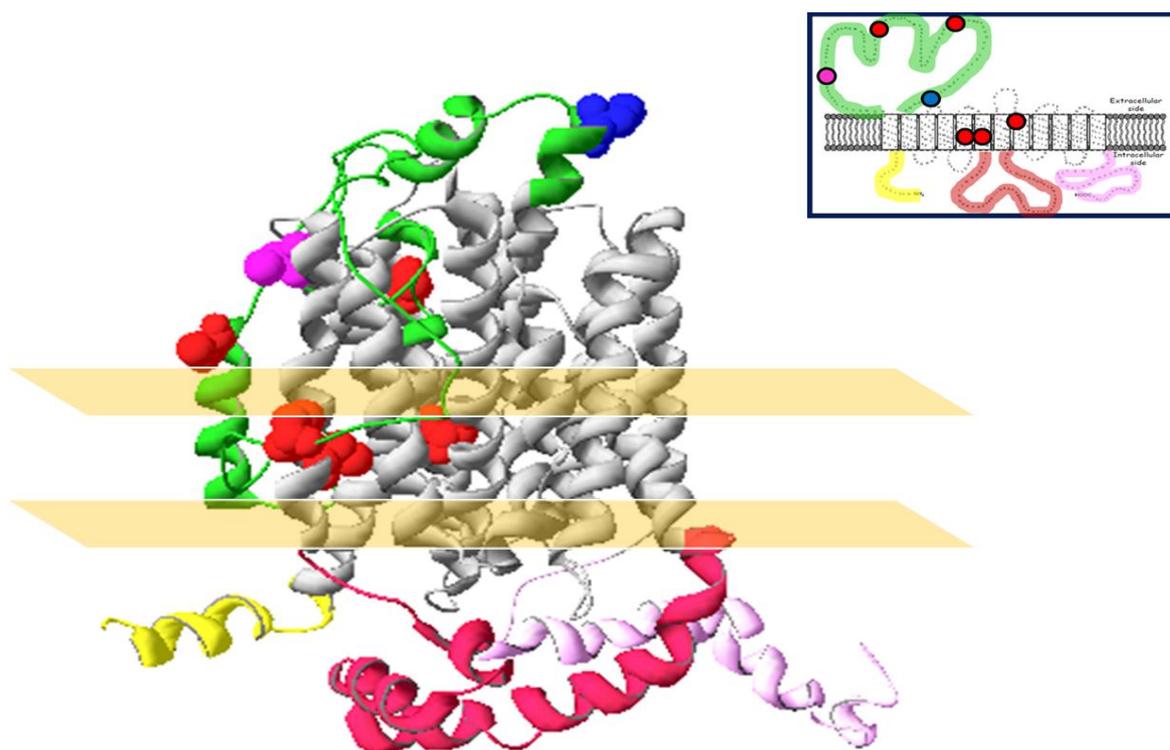


Figura 15: modello di omologia di OCTN1 umano. La membrana è indicata in figura da due linee, mentre i sette residui di Cys sono evidenziati in vari colori. La Cys-50 è indicata con colore rosa mentre la Cys-136 con colore blu, in rosso sono indicate le cisteine meno esposte verso il lato extracellulare della membrana ovvero Cys81 ,Cys236 ,Cys 270, Cys 374, gli stessi colori sono stati utilizzati per evidenziare le cisteine nel modello topologico presente in alto. Le diverse porzioni della proteina sono indicate in vari colori e riportate anche nel modello topologico. Il modello di omologia è stato ottenuto utilizzando il programma I-Tasser.

In questa parte del mio lavoro di tesi è stato studiato l'effetto di alcuni farmaci di cui è nota la nefrotossicità su cellule primarie di rene di topo. I farmaci testati sono stati:

- il cisplatino, tossina del tubolo prossimale e uno dei più comuni agenti chemioterapici e antineoplastici utilizzati per la cura di varie forme di carcinoma
- la ciclosporina A, tossina del tubolo distale e farmaco immunosoppressore utilizzato per modulare la risposta immunitaria dell'organismo
- 2-bromoetilamina, tossina del dotto collettore e molecola spesso utilizzata per simulare l'effetto tossico causato da una somministrazione prolungata di analgesici.

In particolare, a seguito dell'esposizione delle cellule ai farmaci, sono stati valutati: l'espressione di biomarcatori renali, alterazioni degli eventi cellulari come la proliferazione, l'apoptosi e la necrosi e danni a livello di organelli cellulari, quali ad esempio i mitocondri e i lisosomi.

3.3 VALUTAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI BIOMARCATORI A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI

Per valutare l'espressione di biomarcatori a seguito dell'esposizione a diverse concentrazioni di farmaco le cellule sono state fatte crescere per sette giorni, dopo di che sono stati aggiunti i farmaci nel mezzo di coltura REGM per 24 ore e l'espressione dei biomarcatori è stata valutata tramite saggio immunostochimico.

In particolare sono state testate tre diverse concentrazioni per ogni farmaco, nel caso del BEA le concentrazioni usate sono state 3 μM , 10 μM e 30 μM , per il cisplatino e la ciclosporina invece 1 μM , 3 μM e 5 μM . Sono state utilizzate queste concentrazioni in quanto in esperimenti preliminari sono state testate diverse concentrazioni di farmaci nel range compreso fra 0.1 μM e 50 μM , ma le concentrazioni sopra riportate rappresentano le migliori in quanto si evidenzia l'espressione dei biomarcatori ma le cellule sopravvivono, l'utilizzo di

concentrazioni troppo elevate di farmaco, infatti, posso causare il completo distacco del monolayer cellulare dal supporto di policarbonato. In particolare per quanto riguarda il cisplatino e la ciclosporina si è visto che concentrazioni superiori a 5 μ M causano un distacco completo delle cellule con conseguente morte cellulare, mentre per il BEA tali effetti si evidenziano dopo la somministrazione di concentrazioni superiori a 30 μ M.

In figura 16 viene mostrata l'espressione di osteopontina da parte delle cellule. Nel controllo, ovvero nelle cellule non trattate, si vede la normale espressione di osteopontina da parte del rene, questo biomarcatore infatti è espresso nei reni sani di uomo e topo in modo specifico a livello dei rami ascendenti dell'ansa di Henle e del tubulo distale [18].

Nelle cellule trattate con i farmaci si nota invece un incremento dell'espressione del biomarcatore, l'osteopontina. In particolare nel caso delle cellule trattate con BEA si nota un aumento della sua espressione già a seguito dell'aggiunta della concentrazione bassa di farmaco 3 μ M (fig.16B), mentre con l'aggiunta delle concentrazioni media (10 μ M) e alta (30 μ M) (fig.16C, 16D) vi è un significativo incremento della sua espressione. Nel caso delle cellule trattate con cisplatino e ciclosporina l'aumento dell'espressione di osteopontina si evidenzia in particolare a seguito dell'aggiunta delle concentrazioni media (3 μ M) ed alta (5 μ M) di farmaco anche se già dopo l'esposizione alla concentrazione bassa di farmaco si nota un'intensificazione della sua espressione. Quello che risulta evidente è che dopo l'aggiunta di cisplatino, BEA e ciclosporina, in particolare alle alte concentrazioni l'espressione di questo marcatore aumenta notevolmente se paragonata all'espressione di osteopontina nel controllo.

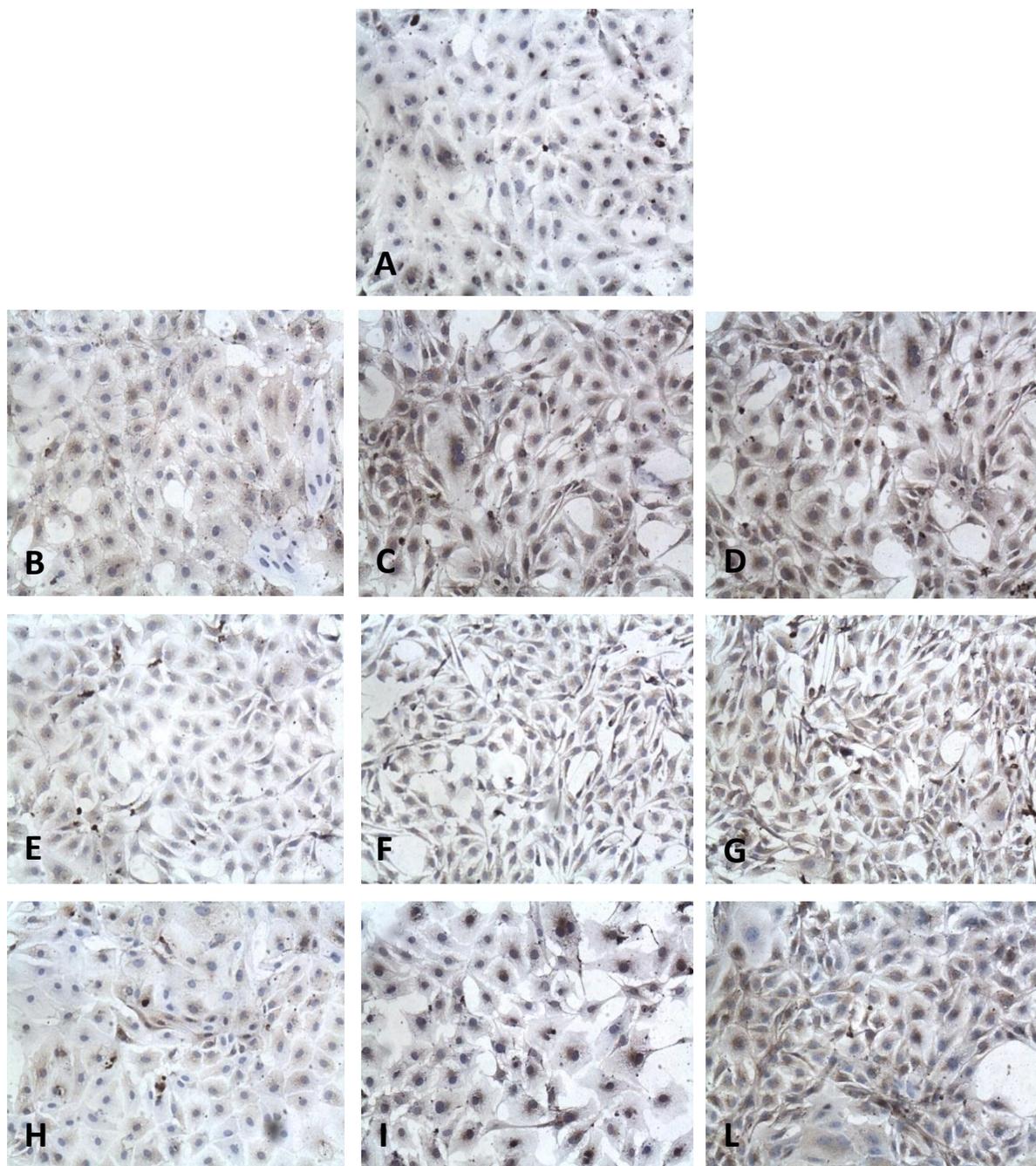


Figura 16 : Immunoistochimica cellule primarie di rene di topo, espressione del biomarcatore osteopontina: le cellule sono state esposte per 24 ore o al mezzo di coltura semplice (A), o al mezzo di coltura contenente diverse concentrazioni di farmaco: BEA 3 μ M (B), BEA 10 μ M (C), BEA 30 μ M (D), ciclosporina 1 μ M (E), ciclosporina 3 μ M (F), ciclosporina 5 μ M (G), cisplatino 1 μ M (H), cisplatino 3 μ M (I), cisplatino 5 μ M (L). La valutazione dell'espressione del biomarcatore è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-osteopontina diluito 1:200 e di un anticorpo secondario anti-coniglio diluito 1:400. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia ottica (x20).

Nella figura 17 sono invece mostrati i risultati ottenuti su cellule primarie di rene di topo, alle quali sono stati aggiunti i farmaci e della quali tramite immunocistochimica è stata valutata l'espressione di un secondo biomarcatore di tossicità renale KIM-1. Le concentrazioni di farmaco utilizzate sono le medesime dell'esperimento precedente, ovvero 3 μM , 10 μM e 30 μM per il BEA, e 1 μM , 3 μM e 5 μM per cisplatino e ciclosporina.

Nel controllo, ovvero nelle cellule non trattate con il farmaco, si può vedere come in condizioni fisiologiche KIM-1 è espresso in minima quantità. Nel caso delle cellule trattate con BEA, ciclosporina e cisplatino si nota un aumento dell'espressione di questo biomarcatore, rispetto al controllo.

Le immagini inoltre suggeriscono un aumento dell'espressione di KIM-1 proporzionale alle concentrazioni di farmaco, ovvero all'aumentare di quest'ultime aumenta notevolmente il rilascio di questo marcatore da parte delle cellule. Studi precedenti, infatti, indicano che l'espressione di KIM-1 aumenta ogni volta che il rene è sottoposto ad un insulto di natura ischemica o tossica a causa delle cellule epiteliali del tubulo prossimale. Poiché nessun altro organo produce KIM-1 in quantità significative, questa molecola risulta altamente specifica per il danno renale [18].

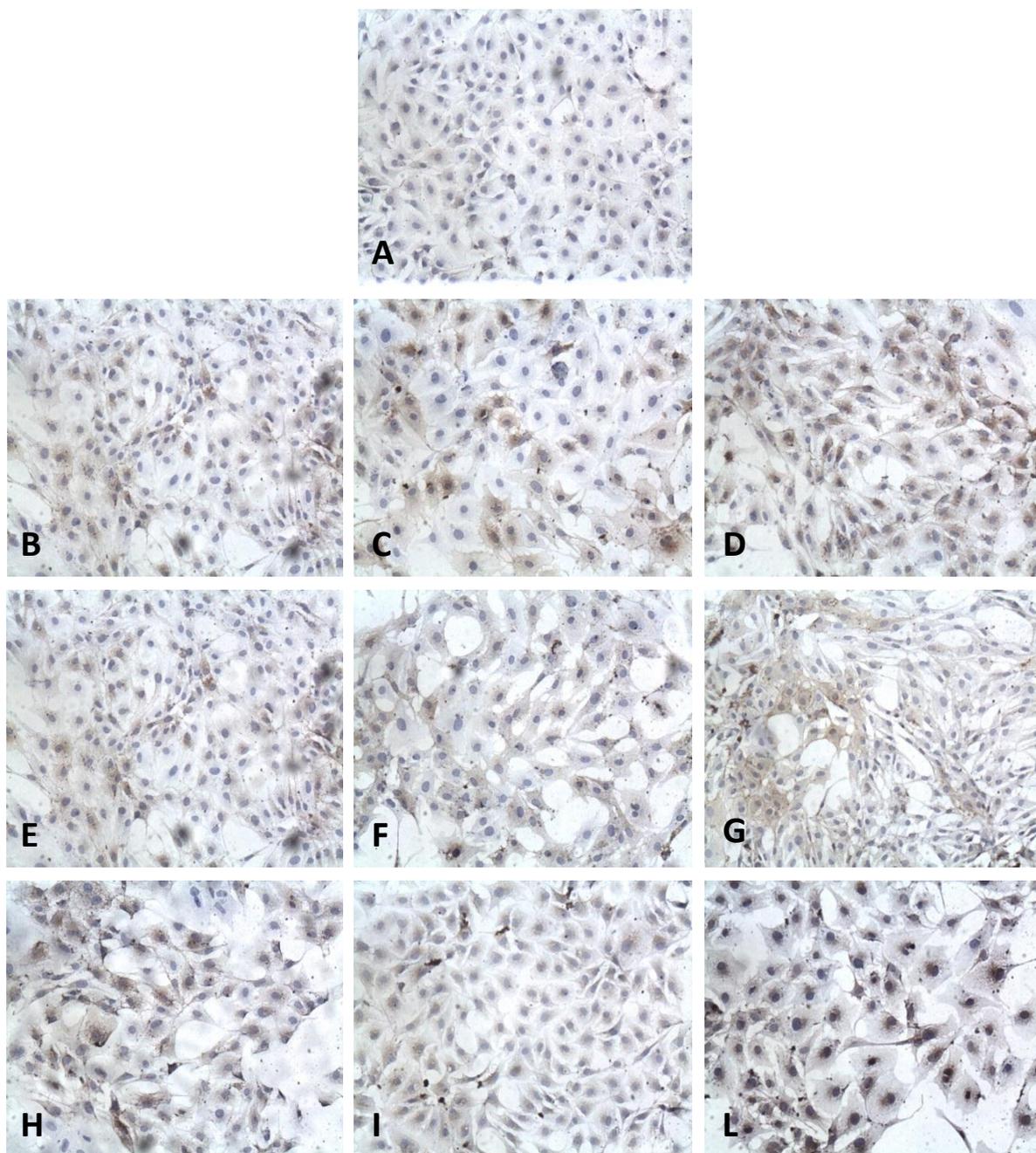


Figura 17 : Immunoistochimica cellule primarie di rene di topo, espressione del biomarcatore KIM-1: le cellule sono state esposte per 24 ore o al mezzo di coltura semplice (A), o a mezzo di coltura contenente diverse concentrazioni di farmaco: BEA 3 μ M (B), BEA 10 μ M (C), BEA 30 μ M (D), ciclosporina 1 μ M (E), ciclosporina 3 μ M (F), ciclosporina 5 μ M (G), cisplatino 1 μ M (H), cisplatino 3 μ M (I), cisplatino 5 μ M (L). La valutazione dell'espressione del biomarcatore è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-KIM1 diluito 1:200 e di un anticorpo secondario anti-capra diluito 1:400. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia ottica (x20).

I dati ottenuti degli esperimenti di immunistochemica sono stati confermati tramite Western blot degli estratti proteici derivanti da lisati cellulari ottenuti, come descritto in Materiali e Metodi, da cellule controllo e cellule trattate con i farmaci. Osservando la figura 18 si nota nel primo Western Blot (A) un significativo incremento della banda corrispondente all'osteopontina nelle cellule trattate con i farmaci (BEA 30 μ M, cisplatino 5 μ M e ciclosporina 5 μ M) rispetto al controllo. L'osteopontina è presente anche nell'estratto proteico derivato dal controllo in quanto si tratta di una proteina espressa anche in condizioni fisiologiche dal rene. Nel caso del secondo Western blot (Figura 18B) si nota l'assenza della banda corrispondente a Kim-1 nell'estratto derivato da cellule controllo, questo perché KIM-1 viene espressa a bassissime concentrazioni in condizioni fisiologiche, nei lisati invece derivanti dalle cellule trattate con i farmaci si vede un incremento dell'espressione del biomarcatore.

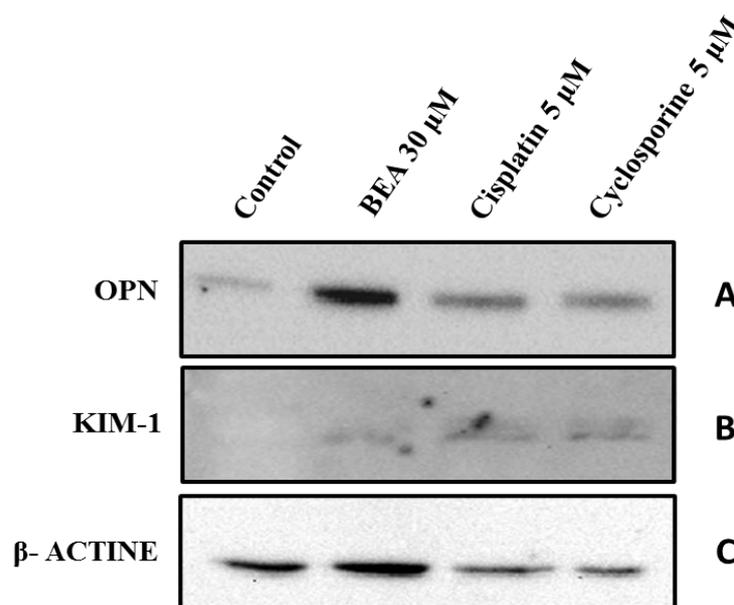


Figura 18 : Western blot su estratti proteici derivati da lisati cellulari di cellule primarie di rene di topo: sono stati caricati gli estratti proteici derivanti da cellule primarie di rene di topo controllo o trattate per 24 ore con BEA 30 μ M, cisplatino e ciclosporina 5 μ M. La figura A mostra l'espressione del biomarcatore osteopontina. La figura B mostra l'espressione del biomarcatore KIM-1, mentre la figura C indica l'espressione della proteina β -actina usata come controllo. La valutazione dell'espressione del biomarcatore osteopontina è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale diluito 1:500 e di un anticorpo secondario anti-coniglio diluito 1:1000, mentre nel caso di KIM-1 è stato utilizzato un anticorpo policlonale diluito 1:500 e un anticorpo secondario anti-coniglio diluito 1:1000.

Per la quantificazione dell'espressione dei biomarcatori è stato utilizzato il sistema computerizzato FACS (fluorescent-activated cell sorter). Grazie a questa tecnica le cellule, poste in sospensione in una soluzione isotonica, vengono fatte passare all'interno di un capillare così sottile da permettere il passaggio di una cellula per volta, il capillare è attraversato da un raggio laser, di lunghezza d'onda adatta a eccitare la fluorescenza, e da un rilevatore che misura la fluorescenza di ciascuna cellula. Questa tecnica ha permesso di quantificare la percentuale delle cellule che risultano positive al saggio di immunofluorescenza diretto verso l'osteopontina e KIM-1. Come si nota dalla figura 19 le cellule trattate con BEA 10 μ M, cisplatino e ciclosporina 3 μ M presentano un aumento dell'espressione del biomarcatore osteopontina rispetto al controllo, ovvero le cellule non trattate con i farmaci.

Nello specifico nel controllo l'11% delle cellule esprime il biomarcatore osteopontina, mentre nelle cellule trattate con BEA, cisplatino e ciclosporina tale percentuale sale rispettivamente al 28%, 19% e 25%. Anche nel caso del biomarcatore KIM-1 (figura 20) il sistema FACS ne ha evidenziato un incremento da parte delle cellule trattate con i farmaci, nel controllo si ha un'espressione del 0,5% di KIM-1 mentre nelle cellule trattate con BEA, cisplatino e ciclosporina tale percentuale sale rispettivamente al 2,5%, 3% e 2.8%.

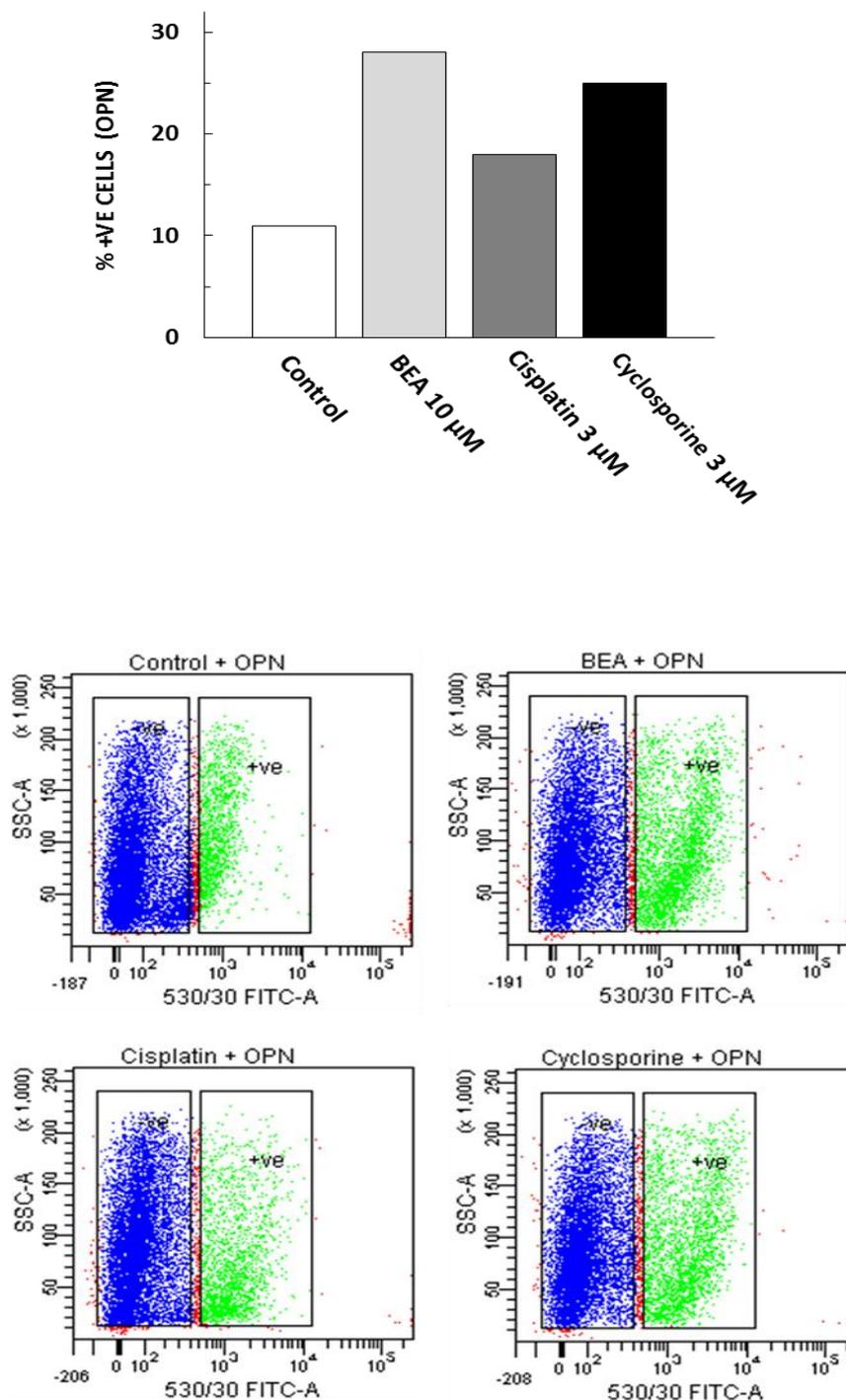


Figura 19: Quantificazione tramite FACS dell'espressione del biomarcatore osteopontina in cellule primarie di rene di topo: le cellule sono state esposte per 24 ore a mezzo di coltura semplice e a mezzo di coltura contenente BEA 10 μM, cisplatino 3μM o ciclosporina 3μM. La valutazione dell'espressione del biomarcatore osteopontina è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-osteopontina (1:200) e di un anticorpo secondario anti-coniglio fluorescente (1:400). I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite sistema computerizzato FACS, la figura B mostra le cellule positive al saggio paragonate alle cellule risultanti negative. L'istogramma (A) indica la percentuale di cellule positive ottenute al seguito del saggio di immunofluorescenza diretto verso il biomarcatore OPN. N=1.

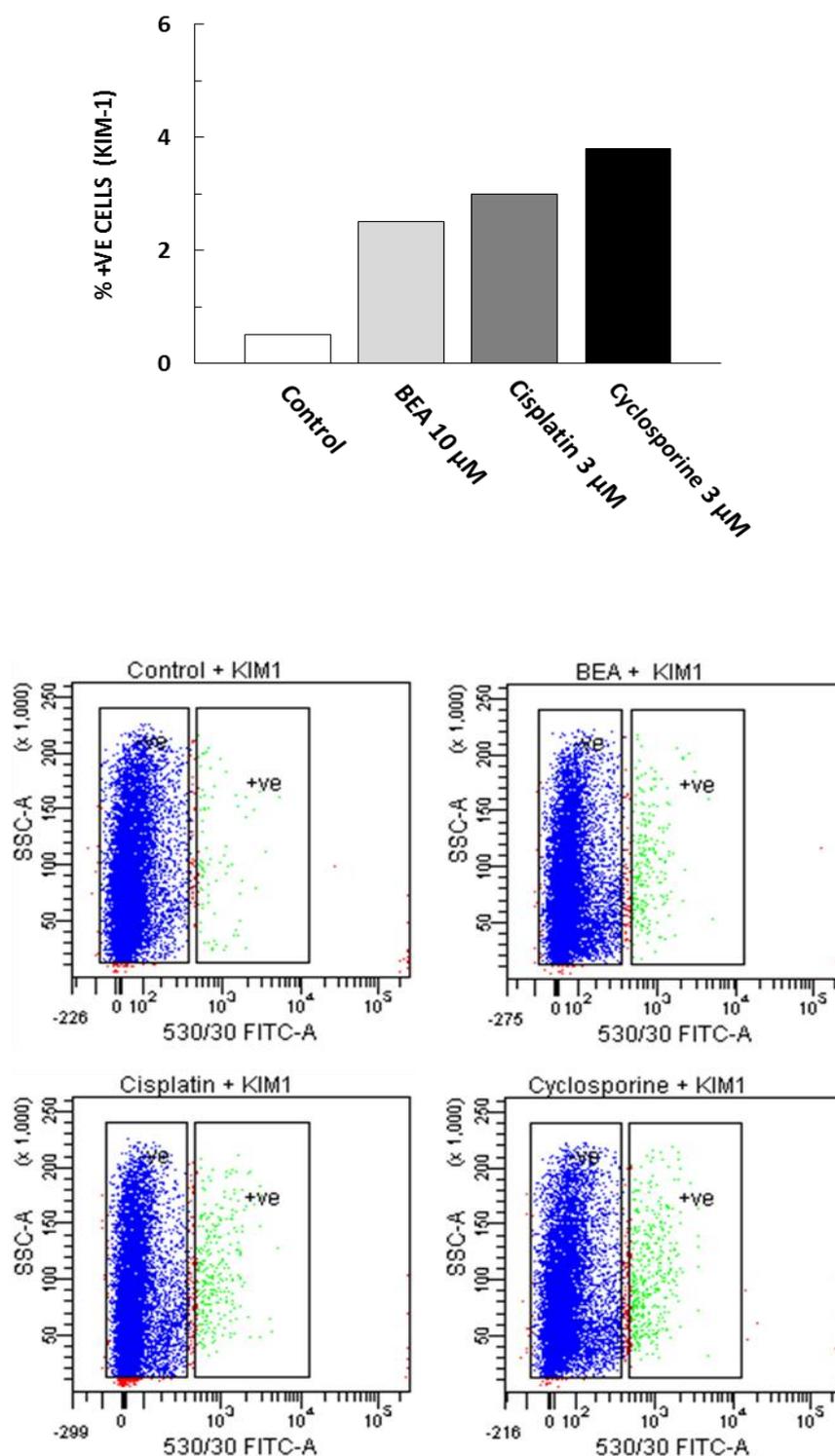


Figura 20 : Quantificazione tramite FACS dell'espressione del biomarcatore KIM-1 in cellule primarie di rene di topo: le cellule sono state esposte per 24 ore a mezzo di coltura semplice e a mezzo di coltura contenente BEA 10 μM, cisplatino 3μM o ciclosporina 3μM. La valutazione dell'espressione del biomarcatore KIM-1 è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-KIM1 (1:200) e di un anticorpo secondario anticapra fluorescente (1:400). I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite sistema computerizzato FACS, la figura B mostra le cellule positive al saggio paragonate alle cellule risultanti negative. L'istogramma (A) indica la percentuale di cellule positive ottenute al seguito del saggio di immunofluorescenza diretto verso il biomarcatore KIM-1. N = 1

In un seguente esperimento è stata valutata la capacità delle cellule renali di rigenerarsi a seguito dell'interruzione del trattamento con il farmaco (Figura 21).

Due distinte popolazioni di cellule vengono trattate entrambe con cisplatino 3 μ M per 24 ore a seguito delle quali una popolazione di cellule viene fissata in paraformaldeide, mentre alla seconda viene rimosso il mezzo di coltura contenente il farmaco e viene lasciata crescere per altri due giorni in mezzo di coltura fresco. A questo punto le due popolazioni vengono sottoposte a un saggio immunostochimico per valutare l'espressione di clusterina.

Da diversi studi è stato dimostrato che la clusterina è un ottimo marcatore di rigenerazione cellulare, infatti, la forma secreta (sCLU) della clusterina, la cui espressione aumenta in risposta a qualsiasi stress molecolare, è antiapoptotica e promuove quindi la sopravvivenza e la rigenerazione cellulare [19].

Nel controllo, ovvero nelle cellule non trattate, si vede che in condizioni fisiologiche la clusterina non è espressa dalle cellule distali e prossimali del rene, anche a seguito della somministrazione del cisplatino per 24 ore non si nota nessun aumento della sua espressione. Ciò indica che a differenza della osteopontina e di KIM-1, la clusterina non rappresenta un marcatore precoce di danno renale indotto da questo farmaco, ma se si osserva la cultura cellulare in cui il cisplatino è stato rimosso e le cellule lasciate crescere per altri due giorni si può notare un considerevole aumento dell'espressione di clusterina. Questo sta ad indicare che a seguito della sospensione del trattamento con il farmaco e alla sua rimozione, le cellule hanno iniziato a proliferare e a rigenerarsi in modo da ripristinare i danni conseguenti all'esposizione all'agente tossico.

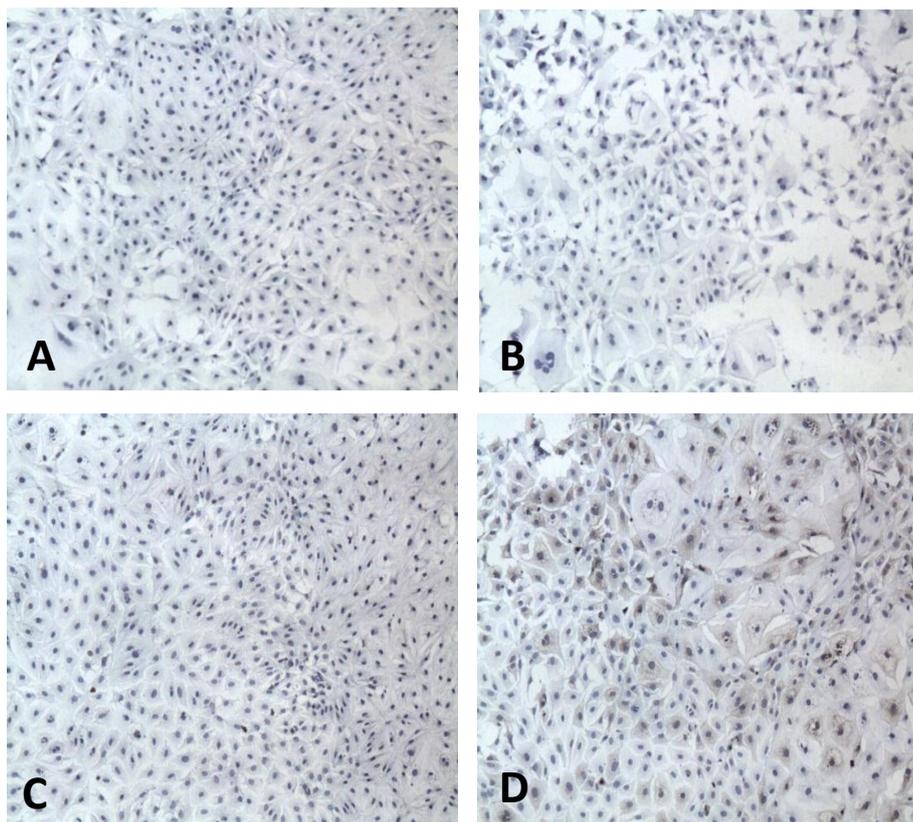


Figura 21 : Immunoistochimica cellule primarie di rene di topo, espressione del biomarcatore clusterina: le cellule sono state esposte per 24 ore o al mezzo di coltura (A e C), o a mezzo di coltura contenente cisplatino 3 μ M (B e D), a seguito delle 24 ore alcune cellule sono state fissate in PFA 2% (A e B) e ad altre è stato rimosso il mezzo di coltura contenente il cisplatino e sono state lasciate crescere per altre 48 ore in mezzo di coltura REGM fresco (C e D). La valutazione dell'espressione del biomarcatore è stata effettuata tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-clusterina (1:200) e di un anticorpo secondario anti-coniglio (1:400). Le immagini sono state ottenute tramite microscopio ottico (x20).

3.4 VALUTAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLA MORTE CELLULARE PER NECROSI E APOPTOSI A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI

Dopo l'identificazione dei biomarcatori che maggiormente vengono espressi è stata focalizzata l'attenzione su due processi cellulari correlati alla tossicità dei farmaci: l'apoptosi e la necrosi. Questo perché a seguito di differenti fattori endogeni ed esogeni la cellula può rispondere o tramite morte programmata, ovvero apoptosi, oppure morte diretta della cellula per necrosi.

Per la valutazione e la quantificazione della necrosi le cellule sono state trattate con quattro differenti concentrazioni di farmaco per 24 ore; nel caso del BEA le concentrazioni utilizzate

sono state 1 μM , 3 μM , 10 μM e 30 μM , mentre nel caso del cisplatino e della ciclosporina 1 μM , 3 μM , 5 μM e 10 μM . Dopo un giorno di esposizione al farmaco, una popolazione controllo di cellule è stata digerita in tripsina in modo da ottenere il numero totale di cellule presenti sulla piastra, mentre dalle popolazioni cellulari trattate con i farmaci è stato prelevato il mezzo di coltura nel quale vi sono le cellule necrotiche in sospensione.

Nella figura 22 si vede come dopo l'aggiunta del BEA non si ha un significativo incremento delle cellule necrotiche. Le immagini ottenute tramite microscopia ottica mostrano infatti che nonostante l'aggiunta di BEA le cellule continuano a mantenere la propria morfologia e le colonie sono integre anche alla concentrazione più elevata di farmaco. L'istogramma mostra la quantificazione delle cellule necrotiche presenti nelle colture cellulari trattate con il farmaco rispetto al controllo, come mostrato dal grafico la percentuale di cellule necrotiche presenti nel controllo è pari al 13%, mentre risulta essere pari 21% nelle cellule trattate con BEA 1 μM , 25% nelle cellule trattate con BEA 3 μM , 23% nelle cellule trattate con BEA 10 μM e infine 27% nelle cellule a cui è stato aggiunto BEA 30 μM .

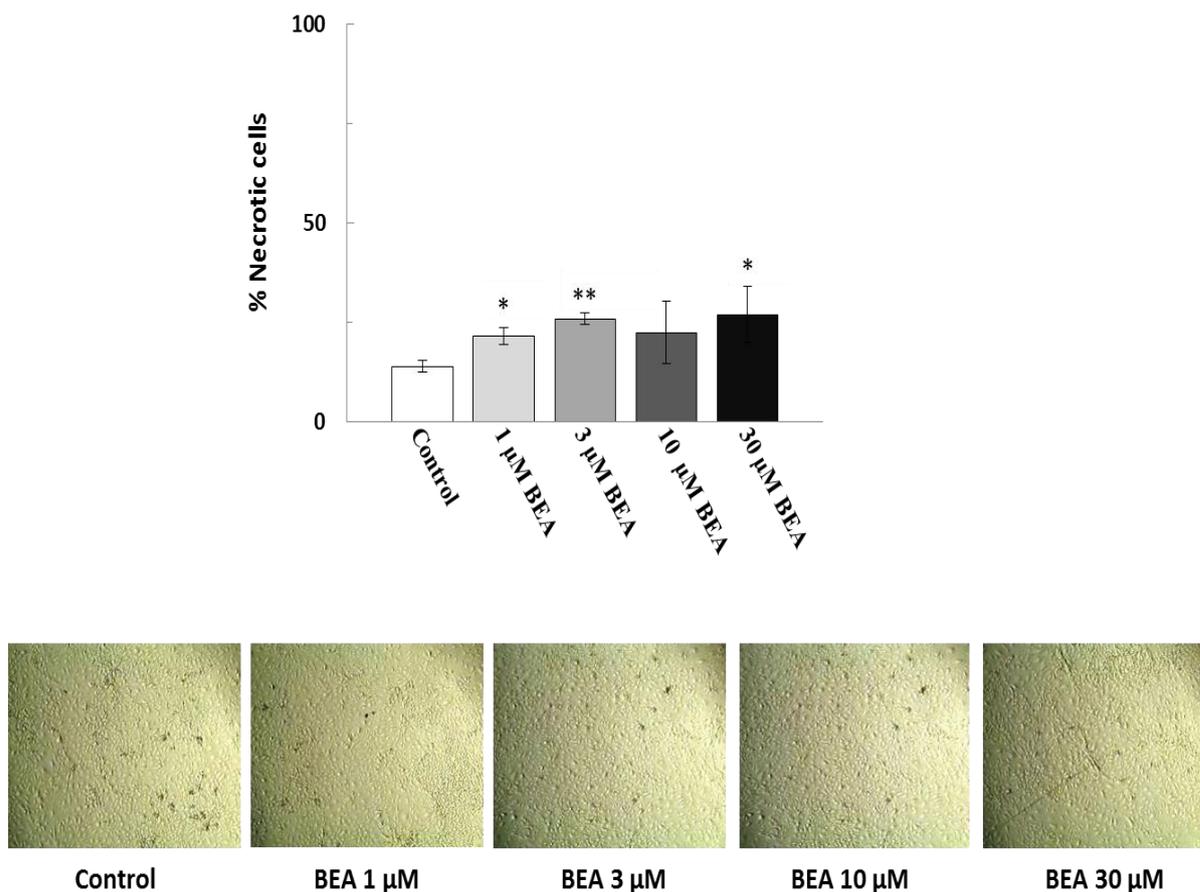


Figura 22: Valutazione e quantificazione delle cellule necrotiche in colture primarie di rene di topo: l'istogramma mostra la percentuale di cellule necrotiche presenti nel mezzo di coltura, rispetto al numero totale di cellule, a seguito della loro esposizione per 24 ore a quattro differenti concentrazioni di BEA (1μM, 3μM, 10μM, 30μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 in mezzo di coltura REGM semplice. Le immagini sono state ottenute tramite microscopio ottico (magnificazione 4X) e mostrano l'effetto delle varie concentrazioni di BEA sulle colture cellulari. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

Nel secondo esperimento (figura 23) invece a quattro colture cellulari differenti sono state aggiunte quattro diverse concentrazioni di cisplatino (1μM, 3μM, 5μM, 10 μM). Le immagini ottenute tramite microscopia ottica mostrano come all'aumentare della concentrazione di farmaco si ha un notevole incremento della mortalità delle cellule e conseguente riduzione delle colonie sopravvissute sulla piastra. L'istogramma mostra un aumento delle cellule necrotiche nel mezzo di coltura proporzionale alla concentrazione di farmaco somministrata, in particolare già dopo l'aggiunta di cisplatino 1 μM la percentuale di cellule necrotiche

risulta pari al 27%, rispetto al 12% rilevato nel controllo, mentre dopo la somministrazione di cisplatino 3 μM e 5 μM tale percentuale sale rispettivamente al 33% e 46%. Aumentando ulteriormente la concentrazione di farmaco (10 μM) si ottiene una percentuale di cellule necrotiche pari al 68% delle cellule totali.

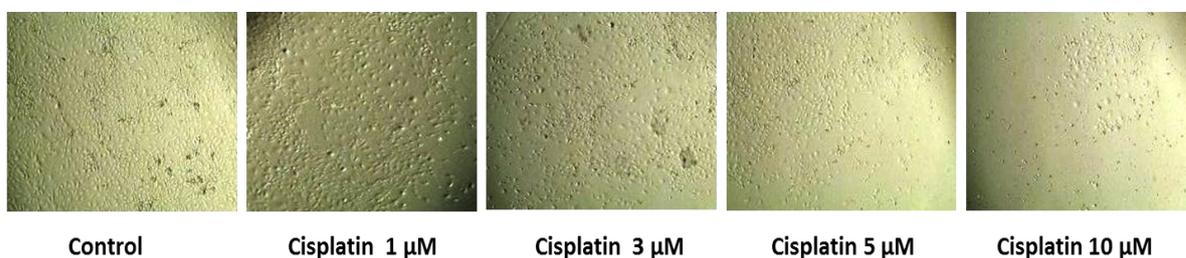
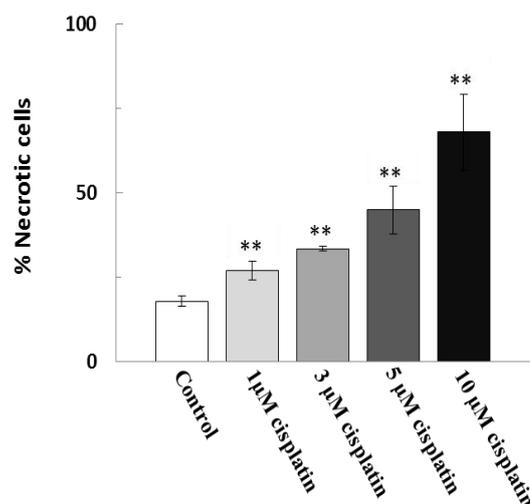


Figura 23 : Valutazione e quantificazione delle cellule necrotiche in colture primarie di rene di topo: l'istogramma mostra la percentuale di cellule necrotiche presenti nel mezzo di coltura, rispetto al numero totale di cellule, a seguito della loro esposizione per 24 ore a quattro differenti concentrazioni di cisplatino (1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 in mezzo di coltura REGM semplice. Le immagini sono state ottenute tramite microscopioottico (magnificazione 4X) e mostrano l'effetto delle varie concentrazioni di Cisplatino sulle colture cellulari. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

Nell'ultimo esperimento (figura 24) a quattro colture cellulari differenti sono state aggiunte quattro diverse concentrazioni di ciclosporina (1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM). Le immagini ottenute tramite microscopia ottica mostrano come nel caso della ciclosporina all'aumentare

della concentrazione di farmaco si ha un significativo incremento della mortalità delle cellule, il numero di colone sopravvissute infatti tende a diminuire specialmente dopo la somministrazione di alte dosi di ciclosporina. L'istogramma mostra come dopo l'esposizione delle cellule a ciclosporina 1 μM il numero di cellule necrotiche è pari al 22% rispetto al 12% rilevato nel controllo, mentre dopo l'aggiunta delle concentrazioni 3 μM e 5 μM la percentuale di sale rispettivamente al 28% e 37%. Infine nelle cellule trattate con ciclosporina 10 μM la percentuale di cellule necrotiche arriva al 61% .

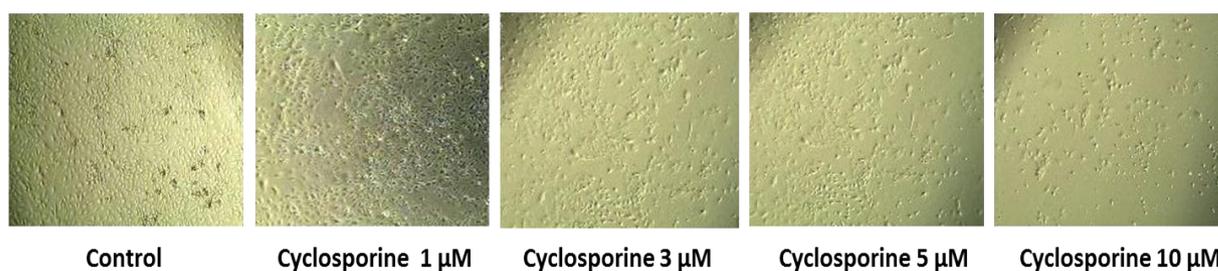
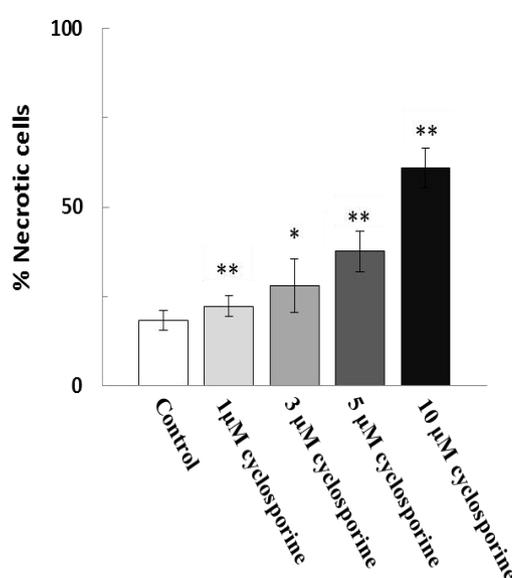


Figura 24 : Valutazione e quantificazione delle cellule necrotiche in colture primarie di rene di topo : l'istogramma mostra la percentuale di cellule necrotiche presenti nel mezzo di coltura, rispetto al numero totale di cellule, a seguito della loro esposizione per 24 ore a quattro differenti concentrazioni di Ciclosporina (1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 in mezzo di coltura REGM semplice. Le immagini sono state ottenute tramite microscopio ottico (magnificazione 4X) e mostrano l'effetto delle varie concentrazioni di ciclosporina sulle colture cellulari. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

Successivamente è stata valutata la percentuale di cellule apoptotiche a seguito dell'esposizione a varie concentrazioni di farmaco. Questo saggio si basa sul principio che le terminazioni libere 3'-OH che si vengono a formare in seguito alla frammentazione del DNA possano servire come substrato per la terminal deossinucleotidil transferasi (TdT). Utilizzando come substrato dUTP biotinilato è così possibile distinguere in una popolazione le cellule apoptotiche. Nel primo esperimento (figura 25) le cellule primarie di rene di topo sono state trattate con tre differenti concentrazioni di BEA (3 μ M, 10 μ M e 30 μ M).

La percentuale di cellule presenti nel controllo, ovvero nelle cellule non trattate con il farmaco, è pari al 1%, questo perché in condizioni fisiologiche vi è comunque una percentuale di cellule apoptotiche anche se pur minima. Nelle cellule trattate con le concentrazioni bassa e media di BEA (3 μ M, 10 μ M) la percentuale di cellule positive al saggio risulta del tutto simile al controllo (1,5%), cioè indica che queste concentrazioni di farmaco non innescano processi apoptotici a livello cellulare. A seguito invece dell'aggiunta della concentrazione alta di BEA (30 μ M) si nota un aumento delle cellule apoptotiche pari al 3,4% .

Le immagini ottenute tramite microscopia a fluorescenza evidenziano i nuclei apoptotici che presentano una colorazione più chiara (azzurra) e cromatina condensata, rispetto ai nuclei non apoptotici che invece hanno una colorazione blu.

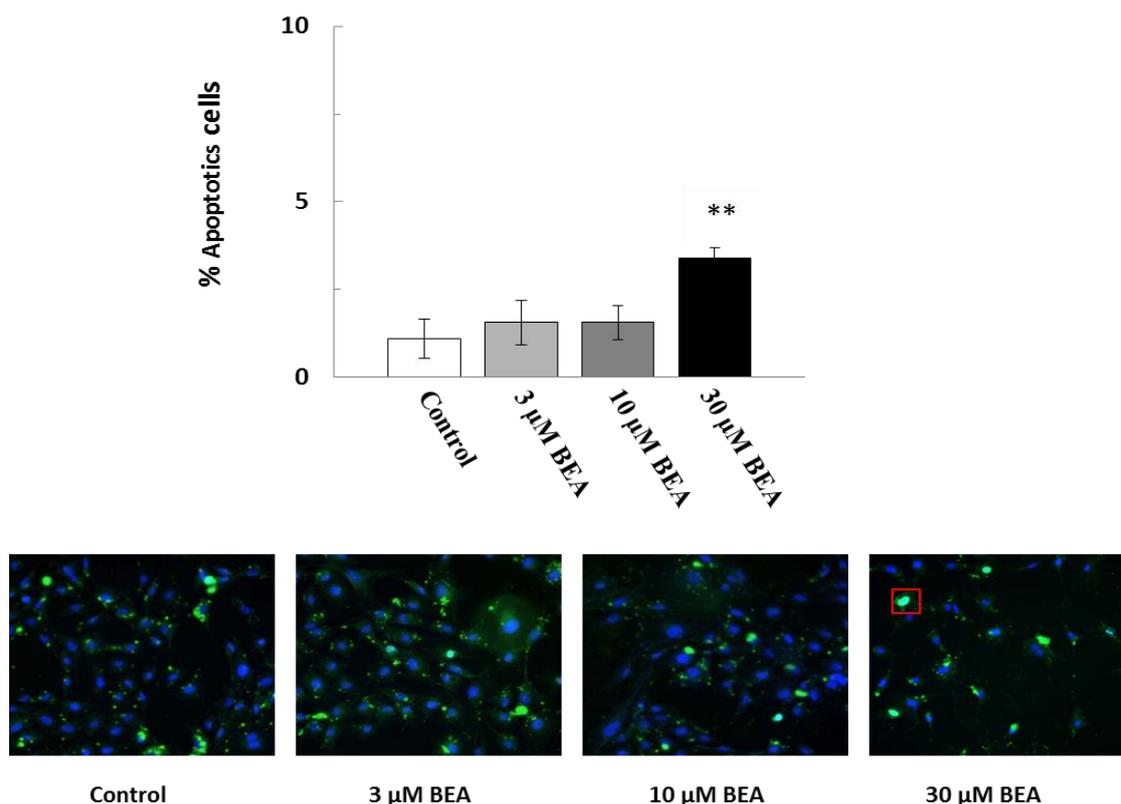


Figura 25 : Valutazione e quantificazione delle cellule apoptotiche in colture primarie di rene di topo trattate con BEA: l'istogramma mostra la percentuale di cellule apoptotiche presenti in una popolazione a seguito dell'esposizione per 24 ore a 3 differenti concentrazioni di BEA (3μM, 10μM, 30μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 nel mezzo di coltura REGM. A tali cellule è stato effettuato il saggio tunel per la valutazione dei nuclei apoptotici come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia a fluorescenza (magnificazione 40X) e mostrano i nuclei delle cellule, in blu sono indicati i nuclei non apoptotici, mentre i nuclei in cui è avvenuta la frammentazione del DNA a seguito del processo di apoptosi presentano una colorazione più chiara. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

Nel secondo esperimento (figura 26) le cellule primarie di rene di topo sono state trattate con tre differenti concentrazioni di cisplatino (1μM, 3 μM e 5μM). Dopo l'aggiunta della concentrazione bassa di cisplatino la percentuale di cellule apoptotiche è pari a 1,75%, valore dunque molto simile alle cellule positive presenti nel controllo (1,1%), mentre dopo l'aggiunta delle concentrazioni media e alta di cisplatino, si nota un significativo incremento delle cellule in fase di apoptosi, rispettivamente pari al 4% e 7,5%. Inoltre osservando i nuclei a seguito dell'aggiunta della concentrazione alta di cisplatino si nota un cambiamento

della loro morfologia che è dovuto alla loro frammentazione e alla condensazione della cromatina entrambi eventi tipici dell'apoptosi.

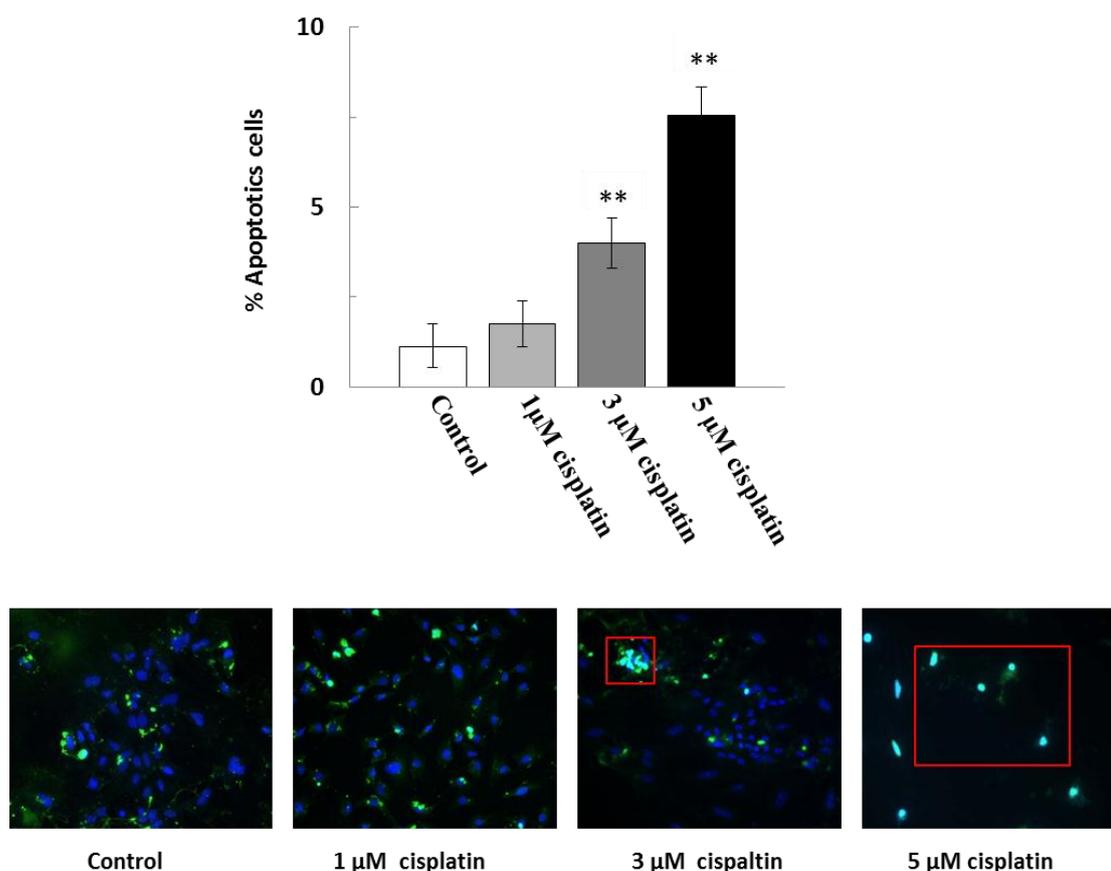


Figura 26 : Valutazione e quantificazione delle cellule apoptotiche in colture primarie di rene di topo trattate con cisplatino : l'istogramma mostra la percentuale di cellule apoptotiche presenti in una popolazione a seguito dell'esposizione per 24 ore a 3 differenti concentrazioni di cisplatino (1 μM, 3 μM, 5 μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 ore nel mezzo di coltura REGM. A tali cellule è stato effettuato il saggio TUNEL per la valutazione dei nuclei apoptotici come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia a fluorescenza (magnificazione 40X) e mostrano i nuclei delle cellule, in blu sono indicati i nuclei non apoptotici, mentre i nuclei in cui è avvenuta la frammentazione del DNA a seguito del processo di apoptosi presentano una colorazione più chiara. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

Infine le cellule primarie di rene di topo (figura 27) sono state trattate con tre differenti concentrazioni di ciclosporina (1 μM, 3 μM e 5 μM). Dopo l'aggiunta della concentrazione bassa di ciclosporina la percentuale di cellule apoptotiche è pari a 2,6%, quindi già alle basse concentrazioni di farmaco si nota un incremento dei fenomeni di apoptosi rispetto al controllo (1,1%), dopo l'aggiunta delle concentrazioni media (3 μM) e alta (5 μM) di ciclosporina si

nota un significativo incremento del numero di cellule apoptotiche, la percentuale infatti sale rispettivamente al 4,2% e 7,4%.

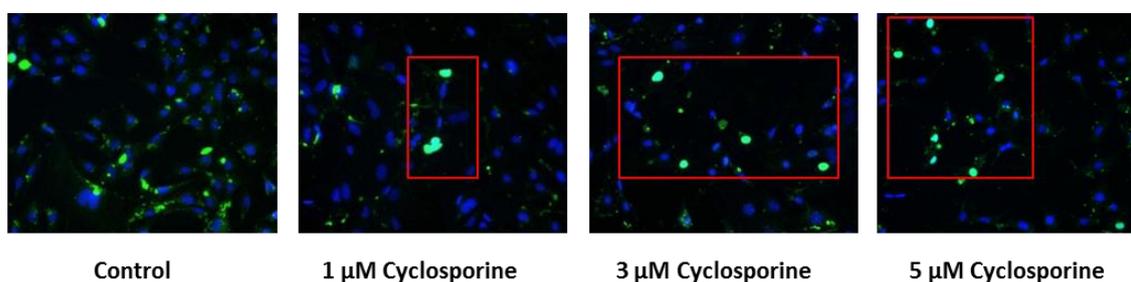
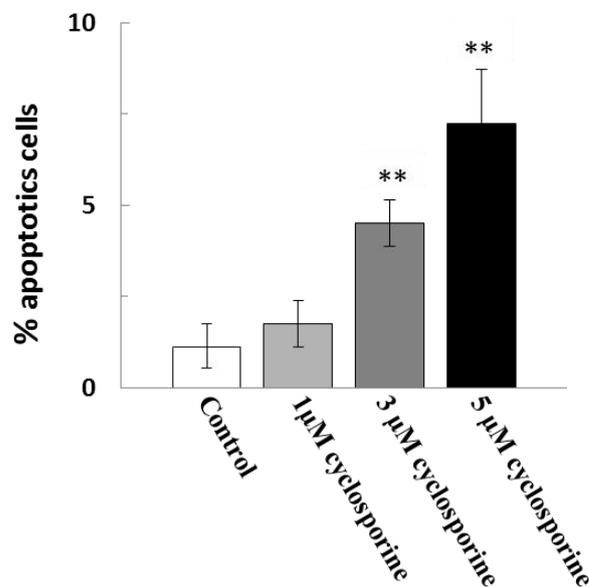


Figura 27: Valutazione e quantificazione delle cellule apoptotiche in colture primarie di rene di topo trattate con ciclosporina: l'istogramma mostra la percentuale di cellule apoptotiche presenti in una popolazione a seguito dell'esposizione per 24 ore a 3 differenti concentrazioni di ciclosporina (1μM, 3μM, 5μM). Nel controllo le cellule sono state incubate per 24 nel mezzo di coltura REGM. A tali cellule è stato effettuato il saggio Tunel per la valutazione dei nuclei apoptotici come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia a fluorescenza (magnificazione 40X) e mostrano i nuclei delle cellule, in blu sono indicati i nuclei non apoptotici, mentre i nuclei in cui è avvenuta la frammentazione del DNA a seguito del processo di apoptosi presentano una colorazione più chiara. I risultati ottenuti derivano dalla media di tre differenti isolamenti (N=3). I dati significativamente differenti dal controllo sono stati determinati tramite t-test, e sono indicati con (*) per $p < 0.05$ o con (**) per $p < 0.01$.

3.5 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DEGLI ORGANELLI

CITOPLASMATICI A SEGUITO DELLA SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI.

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale è uno degli eventi precoci della cascata apoptotica ed è un evento reversibile (REFS). Alla luce dei risultati ottenuti nei saggi apoptotici è stata valutata la funzionalità dei mitocondri a seguito dell'esposizione per 24 ore con i farmaci. La caduta del potenziale di membrana è stata rilevata mediante l'utilizzo di un colorante cationico lipofili il 3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina ioduro (JC-1).

Le cellule sono state trattate come descritto in Materiali e Metodi, il pannello di immagini della figura 28 è stato ottenuto tramite microscopia confocale, le figure A e B sono relative al controllo, ovvero alle cellule non trattate con il farmaco ma lasciate crescere in normale mezzo di coltura.

Come si può notare il controllo presenta una prevalenza di fluorescenza rossa questo sta ad indicare come il potenziale mitocondriale risulti iperpolarizzato, questo perché JC-1, nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, si localizza a livello della membrana elettronegativa dei mitocondri sotto forma di aggregati che danno fluorescenza rossa (gli aggregati reversibili si formano in presenza di un elevato numero di molecole vicine). Osservando invece le immagini C e D ovvero le cellule trattate con ciclosporina 3 μM si nota una perdita della fluorescenza rossa da parte dei mitocondri e un aumento della fluorescenza verde che indica un decadimento del potenziale di membrana, nelle cellule apoptotiche infatti dove è avvenuto il decadimento del potenziale di membrana il colorante rimane in forma monomeric a livello citoplasmatico non potendosi accumulare nei mitocondri, dando una fluorescenza verde diffusa. Nel caso delle immagini D e F le cellule sono state trattate per 24 ore con cisplatino 3 μM , come nel caso della ciclosporina si nota un aumento della fluorescenza verde rispetto al controllo, questo indica anche nel caso del cisplatino un decadimento del potenziale di membrana a seguito del trattamento con il farmaco. Infine le

immagini G e H mostrano le cellule trattate per 24 ore con BEA 10 μM , in questo caso si nota come la fluorescenza ottenuta sia molto simile a quelle dei mitocondri delle cellule controllo, infatti si vede una prevalenza di fluorescenza rossa rispetto alla verde, il che indica che l'esposizione al farmaco BEA non ha innescato un decadimento del potenziale di membrana mitocondriale.

I risultati mostrati per la funzionalità mitocondriale concordano con quelli precedentemente ottenuti nei saggi di apoptosi, infatti il decadimento del potenziale di membrana è un evento tipico dell'apoptosi, sia nel caso della ciclosporina che del cisplatino è stato evidenziato un incremento delle cellule apoptotiche e un incremento del decadimento mitocondriale.

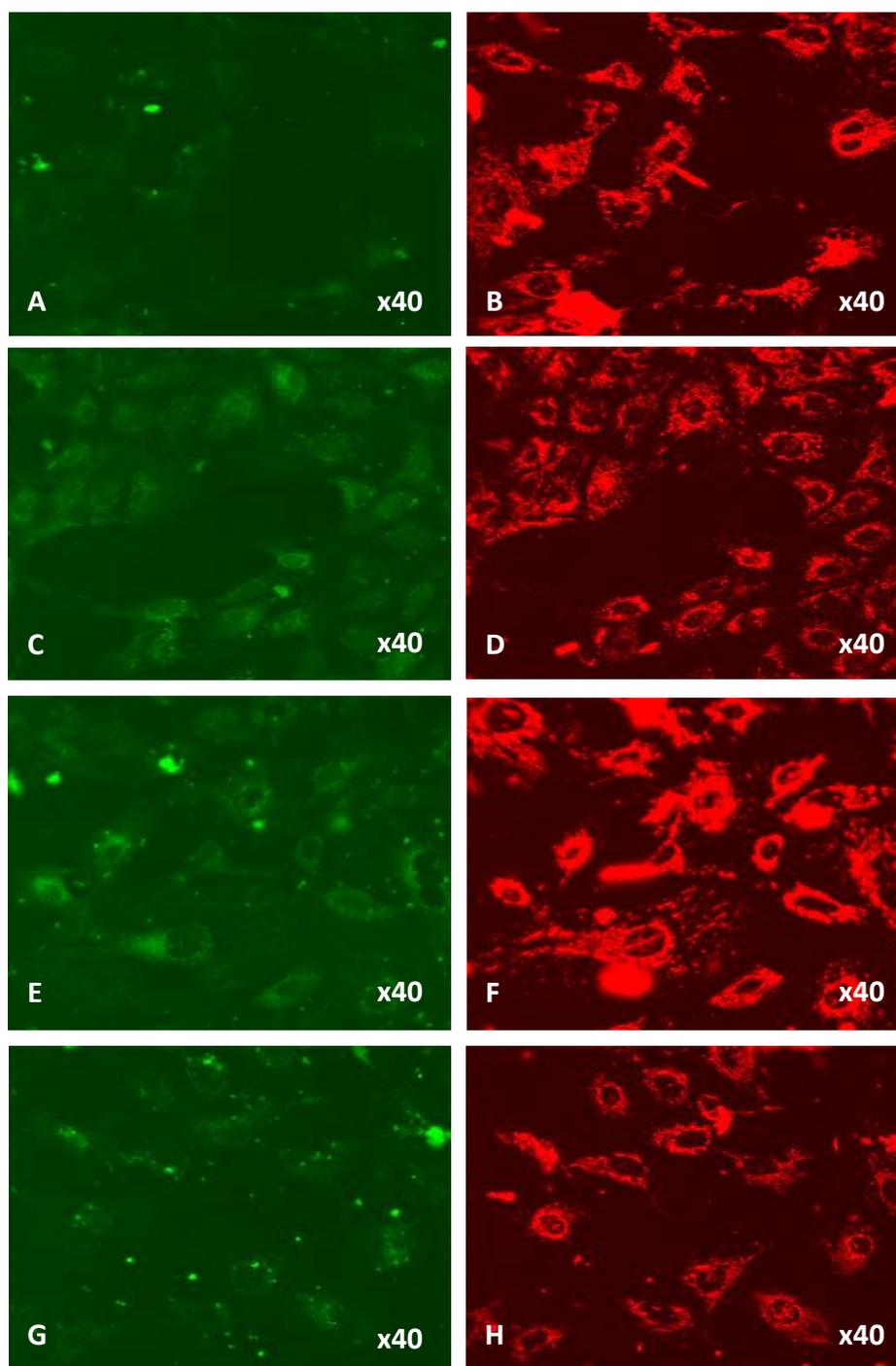


Figura 28 : Decadimento del potenziale di membrana mitocondriale in cellule primarie di rene di topo trattate con BEA, cisplattino e ciclosporina : La caduta del potenziale di membrana è stata rilevata mediante l'utilizzo di un colorante cationico lipofili il 3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina ioduro (JC-1). Le immagini sono state ottenute al microscopio confocale (magnificazione 40X). Le cellule sono state incubate per 24 ore nel mezzo di coltura REGM (A e B), in mezzo di coltura contenente ciclosporina 5 μ M (C e D), in mezzo di coltura contenente cisplattino 5 μ M (E e F) e in mezzo di coltura contenente BEA 30 μ M (G e H). Il Saggio è stato effettuato come descritto in Materiali e Metodi. Sono Stati effettuati tre diversi isolamenti (N=3).

Capitolo 4

Conclusioni

4.1 INATTIVAZIONE DEI TRASPORTATORI OCTN2 DI RATTO E OCTN1 UMANO DA PARTE DI REAGENTI MERCURIALI E METALLI PESANTI

Nel presente lavoro di tesi sono state studiate a livello molecolare le interazioni tra i trasportatori OCTN2, estratto da vescicole di brush-border di reni di ratto, hOCTN1, overespresso in *E.Coli* e purificato, e composti xenobiotici quali reagenti mercuriali e metalli pesanti. Per effettuare tali studi è stato utilizzato il modello sperimentale dei proteoliposomi nel quale la proteina si colloca nei liposomi con lo stesso orientamento che presenta nella membrana plasmatica, ciò fa sì che i fenomeni osservabili tramite l'utilizzo dei proteoliposomi siano del tutto paragonabili a quello che accade nella cellula *in vivo*. Inoltre nel caso della proteina OCTN2 di ratto i dati ottenuti risultano comunque applicabili anche all'uomo in quanto rOCTN2 presenta un'omologia di sequenza pari all'85% rispetto alla isoforma umana. In accordo con il modello di topologia, entrambe le proteine prese in analisi in questo lavoro di tesi presentano 4 residui amminoacidici di Cys nella porzione extraliposomiale (Figura 2, Figura 12) [38,68,50,54] che quindi potrebbero essere in grado di interagire con i composti xenobiotici, mentre gli altri residui di Cys sono posizionati nei segmenti transmembrana. La topologia di questi trasportatori e la presenza di gruppi SH esposti verso il lato esterno della membrana plasmatica ha quindi suggerito che questi trasportatori potrebbero essere il target perfetto per l'interazione con composti xenobiotici endogeni ed esogeni. L'interazione fra un trasportatore di membrana e un composto xenobiotico risulta essere rilevante se alcune costanti come ad esempio IC_{50} e K_i risultano essere uguali o inferiori alle concentrazioni rilevate nel plasma a seguito di assorbimento o somministrazione in caso di farmaci. In teoria la soglia massima di IC_{50} fissata per considerare di interesse l'interazione fra un composto xenobiotico e una proteina di membrana risulta essere pari a 30 μ M. Quando infatti il valore di IC_{50} è significativamente basso si possono verificare alterazioni delle funzioni fisiologiche del trasportatore [119].

Infatti come dimostrato nei vari esperimenti, l'aggiunta di HgCl_2 e MeHg extraliposomiali inibisce fortemente il trasporto di carnitina da parte di OCTN2 e di TEA da parte di hOCTN1. Inoltre nel caso di OCTN1 sono stati testati anche vari metalli pesanti, presenti nell'ambiente sotto forma di inquinanti, e si è visto come il cloruro di Cadmio (CdCl_2) inibisce il trasportatore. Il fatto che l'inibizione del trasportatore non sia evitata nemmeno a seguito della cromatografia per esclusione, è una forte evidenza del fatto che tali composti si legano in maniera covalente alla proteina.

Come ulteriore conferma dell'interazione di questi composti con i gruppi SH dei residui di Cys è stata testata la capacità dell' agente riducente DTE di invertire l'effetto di inibizione da parte dei reagenti mercuriali e dei metalli pesanti, il risultato positivo ottenuto conferma l'interazione di tali xenobiotici con i gruppi tiolici delle proteine. Sono stati testati inoltre diversi antiossidanti non tossici esogeni ed endogeni quali ad esempio la Cys, la CMC e NAC ottenendo risultati leggermente diversi per i due trasportatori presi in esame. Nel caso di OCTN2 si osserva un ripristino totale dell'attività da parte della Cys mentre l'effetto di NAC risulta inferiore, probabilmente a causa della sua elevata idrofobicità e alla sua ridotta capacità di interagire con la porzione extracellulare idrofilica della proteina, dove i residui di Cys reattivi sono localizzati; al contrario non è stato osservato nessun effetto dopo l'aggiunta di CMC ai proteoliposomi pretrattati con HgCl_2 e MeHg (Figura 3). Nel caso di OCTN1 (Figura 10) la Cys e la NAC invertono completamente l'effetto di inibizione da parte di HgCl_2 e MeHg mentre non sembrano avere alcun effetto a seguito dell'incubazione con CdCl_2 ; la CMC non ha alcun effetto se non nel caso del MeHg.

Al fine di capire se l'inibizione da parte di questi composti è dovuta a una interazione con il sito di legame del substrato sono stati condotti esperimenti di protezione nei quali viene testato l'effetto che ha la presenza del substrato sull'inibizione, se infatti il substrato previene l'inibizione da parte dei composti xenobiotici ciò indica che i residui di Cys responsabili di

tale interazione sono posizionati nel sito attivo della proteina, al contrario la non protezione da substrato dall'inibizione indica che il sito di legame dei composti xenobiotici non è localizzato nel sito attivo della proteina. Gli esperimenti condotti sui due trasportatori hanno mostrato risultati differenti. Nel caso di OCTN2 si è visto come la presenza di carnitina extraliposomiale previene l'inibizione da parte dei composti mercuriali, il che sta ad indicare che il sito di legame di tali composti è sovrapponibile al sito di legame per il substrato; nel caso di OCTN1 invece gli esperimenti di protezione evidenziano come non ci sia nessun effetto da parte del substrato sull'inibizione, il che indica che tali composti si legano in un sito diverso rispetto a quello per il TEA.

Nel caso del trasportatore OCTN2 sono stati effettuati esperimenti di cinetica di inibizione ed è stata trovata un'inibizione di tipo non competitivo da parte di HgCl_2 , e un'inibizione mista da parte del MeHg. L'affinità di legame di OCTN2 è più alta per HgCl_2 rispetto al MeHg potrebbe essere spiegata con un crosslink fra residui di cisteina vicini fra loro e Hg^{2+} . Come descritto in precedenza il trasportatore catalizza sia il trasporto per uniport che quello per antiport, anche se il trasporto per uniport risulta molto più lento rispetto a quello per antiport. Questa modalità di trasporto può essere monitorata come efflusso in proteoliposomi precaricati con carnitina radioattiva [38,68]. In queste condizioni la presenza di mercurio all'esterno dei proteoliposomi non inibisce il trasportatore ma, al contrario, stimola l'efflusso di carnitina (Figura 7A). Questo fenomeno opposto, rispetto all'inibizione del trasporto di carnitina osservata negli esperimenti di uptake, può essere dovuto sia a un trasporto diretto dei composti mercuriali da parte di OCTN2 dall'esterno all'interno dei proteoliposomi in antiport con la carnitina, sia ad una modificazione strutturale del trasportatore che a sua volta causa la formazione di un poro nella struttura della proteina. Questo cambiamento strutturale può così indurre l'efflusso della carnitina radioattiva dal compartimento interno dei proteoliposomi. Effetti simili sono stati infatti precedentemente osservati ad esempio in diversi trasportatori

mitocondriali [92, 120, 121, 122]. Per capire quale sia il meccanismo coinvolto è stato valutato direttamente il trasporto dei composti mercuriali. La trans-stimolazione non è stata osservata in presenza di coniugati del mercurio, i quali presentano dimensioni maggiori rispetto ai composti mercuriali liberi, e potrebbero quindi non essere trasportati a causa di un ingombro sterico. Inoltre la formazione del poro sembra essere prevenuta dai coniugati del mercurio.

Gli effetti descritti non sono stati osservati negli esperimenti in cui è stato valutato l'uptake di carnitina in presenza di mercuriali nel lato interno dei proteoliposomi (Figura 7B). In questo caso non è stata osservata trans-stimolazione a seguito dell'aggiunta di alte concentrazioni di reagenti mercuriali. La lato specificità osservata risulta quindi in accordo con l'asimmetria strutturale (Figura 2) e con le informazioni presenti in letteratura sul trasportatore, che riferiscono che i siti di legame del substrato interno ed esterno sono differenti, come indicato dai valori diversi di Km sul lato interno ed esterno dei proteoliposomi [38].

4.2 IDENTIFICAZIONE DEI RESIDUI DI CYS COINVOLTI NELL'INTERAZIONE FRA hOCTN1 E I REAGENTI DEI GRUPPI SH

In questo lavoro di tesi per l'identificazione dei residui aminoacidi responsabili dell'interazione del trasportatore hOCTN1 con composti xenobiotici sono stati creati tramite mutagenesi sito diretta sette differenti mutanti. Ogni mutante presentava un residuo di Cys convertito in alanina.

I risultati sperimentali ottenuti hanno dimostrato come due residui di Cys siano maggiormente coinvolti nell'interazione della proteina OCTN1 con i reagenti mercuriali. Gli esperimenti di dipendenza dell'inibizione dalla concentrazione extraliposomiale di ciascun inibitore (Figura 14, tabella 1) hanno infatti mostrato come il trasporto di [¹⁴C]TEA nei mutanti C50A e C136A è inibito solo a seguito dell'esposizione ad alte concentrazioni di mercuriali, il che indica un

decremento dell' affinità di questi mutanti per tali reagenti. I valori di IC₅₀ ottenuti per i mutanti C50A e C136A risultano infatti molto più alti rispetto a quelli rilevati per la proteina WT. A conferma dei dati sperimentali ottenuti è stato creato un ottavo mutante in cui entrambe le cisteine (Cys 50, Cys 136) sono state convertite in alanina (C50A/C136A). Gli esperimenti condotti sul doppio mutante evidenziano una perdita totale del potere inibitorio dei composti mercuriali. Il coinvolgimento di questi residui di Cys è stato inoltre verificato anche dopo l'esposizione del trasportatore a MTSEA un composto chimico altamente utilizzato in quanto in grado di interagire con i gruppi SH delle proteine di membrana formando ponti disolfuro misti. I risultati ottenuti dopo l'esposizione a MTSEA sono del tutto paragonabili a quelli rilevati nel caso dei reagenti mercuriali. L'approccio bioinformatico utilizzato in questo lavoro di tesi inoltre ha permesso di ottenere un modello di omologia della proteina OCTN1 umana e di verificare quali residui di Cys del trasportatore fossero esposti verso il lato extracellulare. Infatti un importante requisito alla base dell'interazione di questi composti con i trasportatori di membrana è che uno o più residui di Cys devono essere localizzati in una porzione della struttura della proteina che sia accessibile ai composti xenobiotici presenti nel compartimento extracellulare [119]. Il modello di omologia (Figura 15) conferma i dati sperimentali ottenuti in quando le Cys 50 e 136 risultano essere quelle maggiormente esposte verso l'esterno della membrana e quindi sono quelle in grado di interagire con i reagenti dei gruppi SH.

4.3 IMPLICAZIONI TOSSICOLOGICHE

Come dimostrato dagli esperimenti svolti in questo lavoro di tesi i composti mercuriali inducono l'efflusso di carnitina nel caso del trasportatore OCTN2; questo non è rilevante da un punto di vista tossicologico, in quanto questi effetti si verificano a concentrazioni di mercuriali che sono molto più alte rispetto alle concentrazioni massime a cui gli organismi

possono essere esposti anche a seguito di condizioni estreme di inquinamento ambientale. Al contrario, l'inibizione osservata sul lato extraliposomiale (extracellulare) da parte dei composti mercuriali sia nel caso di OCTN2 che nel caso di OCTN1, risulta molto interessante da un punto di vista tossicologico, in quanto questi sistemi di trasporto giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi della carnitina e dei cationi organici in diversi tessuti. E' risaputo che il mercurio è normalmente presente nei tessuti umani a una concentrazione di circa 0.15 μM e può aumentare fino a concentrazioni pari a 5 μM , a causa di esposizione a inquinanti [80,83,92].

Le IC_{50} calcolate per i reagenti mercuriali e i metalli pesanti risultano infatti nel range di concentrazioni nocive di tali composti. Gli effetti descritti, possono quindi essere coinvolti nel meccanismo di tossicità da parte del mercurio e dei metalli pesanti nell'uomo, e posso indirizzare verso l'utilizzo di antiossidanti per prevenirne l'effetto. In quest'ottica è stato dimostrato che la Cys risulta più efficace rispetto alla NAC nell'invertire l'effetto di inibizione da parte dei composti mercuriali in entrambi i trasportatori oggetto di studio. Nel caso di OCTN2 oltre alla Cys e NAC, anche la carnitina stessa può essere usata come scavenger, come osservato negli esperimenti di protezione (Figura 6). La somministrazione di carnitina ad alte concentrazioni, che nel sangue è di solito pari a 50 μM , può dunque risultare utile come antagonista dell'effetto tossico dei composti mercuriali sul trasportatore OCTN2.

In conclusione, il modello sperimentale dei proteoliposomi si è rivelato uno strumento utile per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della tossicità indotta da mercurio. Effetti simili sono stati precedentemente descritti per ASCT2 e B⁰AT1 nel medesimo modello sperimentale [90,91]. I dati ottenuti in questo lavoro di tesi, insieme a quelli ottenuti nei sistemi cellulari [88] ci permettono di concludere che l'interazione del mercurio con i sistemi di trasporto coinvolti nell'omeostasi cellulare è alla base dell'effetto di tossicità di tali composti.

4.4 NEFROTOSSICITÀ INDOTTA DA FARMACI SU CELLULE PRIMARIE DI RENE

Lo scopo di questa parte del mio lavoro di tesi è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare le colture primarie di rene come nuovo modello sperimentale per la valutazione e la quantificazione della nefrotossicità indotta da farmaci. I reni svolgono differenti funzioni: secrezione, trasporto, metabolismo e mantenimento dell'omeostasi; si tratta di un organo molto complesso, comprendente tipi cellulari differenti e una sofisticata organizzazione tridimensionale. A causa della sua complessità risulta quindi difficile l'impiego del rene intatto per un adeguato studio dei processi biochimici, farmacologici, fisiologici e tossicologici. Le colture cellulari possono quindi fornire utili sistemi modello per lo studio delle funzioni delle cellule renali. I tubuli distale e prossimale sono spesso bersaglio di composti nefrotossici, a causa delle loro capacità di trasportare e accumulare xenobiotici e loro metaboliti [123].

I vantaggi nell'utilizzo di questo modello sperimentale sono molteplici: riduzione notevole della sperimentazione animale, standardizzazione facile del protocollo, elevata riproducibilità, larga disponibilità di tipi cellulari, controllo delle variabili ambientali quali ad esempio pH e temperatura, semplicità d'uso e costi limitati, possibilità di valutare in breve tempo gli effetti di un numero considerevole di molecole, monitoraggio della tossicità in una cellula molto vicina allo stato in vivo, possibilità di testare i composti in cellule umane e paragonare la tossicità tra specie diverse in modo da trasferire i risultati ottenuti su ratto e topo sull'uomo [115]. In particolare in questo lavoro è stata valutata la nefrotossicità su cellule primarie di rene di topo di tre differenti farmaci di cui è ben noto il meccanismo d'azione e tossicità: il cisplatino, la ciclosporina e il BEA. Il cisplatino è il primo antitumorale al platino introdotto in clinica, è una dei più potenti farmaci chemioterapeutici in grado di interagire con siti nucleofili delle proteine cellulari, della membrana fosfolipidica, con i microfilamenti del

cistoscheletro, con molecole contenenti gruppi tiolici, con l'RNA e il DNA cellulare e mitocondriale, ed è molto attivo in un ampio spettro di neoplasie, tra cui i tumori polmonari, dell'esofago e dello stomaco, del cervello e del tratto genitourinario [97].

La ciclosporina è un peptide ciclico che rappresenta una classe completamente nuova ed importante di farmaci immunosoppressori, molti dei suoi effetti selettivi sulle cellule T sembrano essere correlati all'inibizione dell'attivazione mediata dal TCR (T-cell receptor).

La ciclosporina inibisce la produzione di citochine da parte delle cellule TH in vitro e inibisce lo sviluppo dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ maturi nel timo, e infine il 2-bromoetilamina, una molecola spesso utilizzata per simulare l'effetto tossico causato da una somministrazione prolungata di analgesici.

Le cellule primarie di rene di topo sono quindi state trattate con questi tre farmaci allo scopo di andare a valutare e quantificare sia l'espressione di biomarcatori precoci di nefrotossicità sia il tipo di danno indotto da questi farmaci a livello cellulare. Gli effetti che agenti tossici possono avere a livello renale sono molteplici, dal momento che esistono una moltitudine di composti in grado di danneggiare i reni a seguito di vari meccanismi, alcuni dei quali ancora oggi sconosciuti. Per tale motivo negli ultimi anni è diventato sempre più necessario identificare precocemente l'insufficienza renale, grazie a biomarcatori predittivi che possano riflettere il danno ad uno stadio ancora reversibile, che consentono di identificare la sede specifica del danno renale e di prevederne la durata e la gravità e che siano applicabile sia su uomo che animali.

Nello specifico in questo lavoro si è rivolta l'attenzione su due marcatori in particolare: l'osteopontina (OPN) e kidney injury molecule 1 (KIM-1). La prima è una fosfoproteina di 44-kDa sintetizzata nell'osso e nel tessuto epiteliale, la forma epiteliale di OPN si trova ad alti livelli nelle urine umane e si pensa che agisca come inibitore della formazione di ossalato di calcio, contribuendo a prevenire precipitazione minerale, OPN sembra però essere anche

associata a una serie di altre funzioni, quali ad esempio regolazione della funzione osteoclastica durante la formazione dell'osso, genesi tumorale e accumulo di macrofagi. OPN è espressa nei reni sani di uomo e topo in modo specifico a livello dei rami ascendenti dell'ansa di Henle e del tubolo distale, ma può essere espressa a livello di tutti i segmenti glomerulari e tubulari a seguito di danno renale [111].

KIM-1 è una glicoproteina di membrana caratterizzata da un dominio IgG-like e da uno mucin-like, entrambi posti nel versante extracellulare, ed è conosciuta anche come recettore cellulare del virus dell'epatite A (HAVCR). In condizioni fisiologiche, KIM-1 è espressa dall'epitelio del tubulo prossimale in minima quantità e non risulta rilevabile nelle urine. In studi preclinici e clinici è stato dimostrato che KIM-1 urinario è una molecola sensibile e specifica per danno renale acuto. Studi su animali indicano che l'espressione di KIM-1 aumenta ogni volta che il rene è sottoposto ad un insulto di natura ischemica o tossica che causi una dedifferenziazione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale [113].

I dati sperimentali e di analisi quantitativa ottenuti nella prima parte di questo lavoro mostrano come in cellule primarie di rene di topo, a seguito dell'esposizione per 24 ore a tre differenti concentrazioni di BEA, cisplatino e ciclosporina, ci sia un significativo incremento dell'espressione dei biomarcatori OPN e KIM-1, tale incremento risulta proporzionale alla concentrazione di farmaco, infatti le cellule trattate con le concentrazioni alte di farmaco presentano un incremento notevole dell'espressione dei biomarcatori in questione rispetto alle cellule trattate con le basse concentrazioni di farmaco. L'espressione di questi due biomarcatori sembra quindi riflettere il danno renale indotto dai farmaci. A tale proposito l'aumento d'espressione di KIM-1 risulta particolarmente significativo, trattandosi di una molecola espressa dalle cellule renali solo a seguito di un danno conclamato, mentre nel caso dell'osteopontina in diversi studi è stato dimostrato come abbia un'azione renoprotettiva, promuovendo ad esempio la sopravvivenza delle cellule, diminuendo l'apoptosi e

partecipando alla rigenerazione delle cellule, diversi studi infatti suggeriscono che OPN può contribuire alla rigenerazione delle cellule epiteliali tubulari durante la fase acuta di danno tubulare corticale [124]. La nefrotossicità di queste molecole è stata inoltre dimostrata in una seconda serie di esperimenti in cui si è visto che a seguito della rimozione dei farmaci le cellule tendevano a rigenerarsi in modo da ripristinare i danni indotti dall'esposizione alle nefrotossine, l'aumento della rigenerazione cellulare è stato provato tramite un incremento dell'espressione della proteina clusterina dopo 48 ore dalla rimozione del farmaco, come dimostrato in diversi studi. La clusterina infatti è un biomarcatore di rigenerazione cellulare, durante la fase rigenerativa acuta (prime 24 ore) l'espressione di clusterina aumenta notevolmente, riducendosi poi a livelli non rintracciabili dopo cinque giorni di rigenerazione, mRNA di clusterina è stato precedentemente localizzato nei tubuli atrofici o collassati o sulle pareti dei vasi sanguigni a seguito di un danno renale [125].

Nella seconda parte del lavoro quindi si è focalizzata l'attenzione sul tipo di danno cellulare che questi farmaci sono in grado di recare in particolare è stato analizzato il grado di sopravvivenza delle cellule a seguito della somministrazione dei 3 farmaci, l'apoptosi, e il danno mitocondriale, questo perché per proporre le cellule primarie di rene come modello sperimentale non basta dimostrare la loro capacità di esprimere biomarcatori di tossicità ma bisogna anche essere in grado di poter studiare a che livello cellulare il danno è maggiormente espresso, in modo da poter avere una serie di informazioni complessive sulla tossicità e sul meccanismo di azione delle nefrotossine, per poter permettere in seguito di apportare modifiche a farmaci che presentano danni collaterali, o per progettare nuovi che riducano notevolmente le complicanze sia a livello d'organo sia a livello cellulare. In particolare è stato visto che a seguito della somministrazione di cisplatino e ciclosporina si ha un notevole aumento sia della necrosi che dell'apoptosi, in una maniera dose-dipendente, oltre che a una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale. Quello che si ipotizza è quindi che

questi tre fenomeni siano strettamente correlati fra di loro e che insieme contribuiscano alla nefrotossicità di questi farmaci.

La capacità del cisplatino di favorire necrosi e apoptosi è stata documentata in diversi studi, in particolare in questo lavoro è stato dimostrato che a seguito della somministrazione di cisplatino 10 μ M ben il 68% delle cellule subivano un processo necrotico mentre il 7% delle cellule totali andavano incontro a fenomeni apoptotici. Il meccanismo di nefrotossicità del cisplatino risulta tutt'oggi molto complesso ma si è visto che coinvolge in maniera particolare lo stress ossidativo. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono infatti in grado di interagire con le varie componenti cellulari compresi i lipidi, il DNA e le proteine distruggendo completamente la loro struttura. I ROS vengono normalmente prodotti dal sistema xantina-xantina ossidasi, dai mitocondri e grazie a NADPH ossidasi nelle cellule. In presenza di cisplatino, i ROS vengono prodotti attraverso tutte queste vie giocando così un ruolo cruciale nella patogenesi del danno renale acuto. Il cisplatino aumenta inoltre l'attività del glucosio-6-fosfato deidrogenasi che a sua volta incrementa la produzione di radicali liberi e diminuisce la produzione di antiossidanti [126]. Nel fenomeno apoptotico giocano un ruolo fondamentale i mitocondri, come dimostrato dai dati sperimentali ottenuti.

I farmaci antitumorali come il cisplatino infatti causano danni al DNA mitocondriale che a sua volta causa una transizione della permeabilità mitocondriale (MPT) con conseguente depolarizzazione, tale transizione della permeabilità fa sì che vengano rilasciati fattori che facilitano la rottura dei mitocondri, come ad esempio i ROS, BAX e Ca^{2+} , la conseguente rottura dei mitocondri porta al rilascio del citocromo C e della procaspasi-9, i quali si vanno a legare a Apaf-1 e ATP con la formazione dell'apoptosoma e al rilascio della forma attiva della Caspasi -9, la quale porta all'attivazione delle altre caspasi (3,6,7) dando via alla cascata apoptotica con conseguente smantellamento della cellula e formazione di corpi apoptotici [126,127,128]. Per quanto riguarda la necrosi in diversi studi è stato visto che la capacità del

cisplatino di condurre a un processo necrotico è dovuto all'attivazione, a causa della rottura del DNA, della poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP). PARP inibisce la funzione del coenzima glicolitico NAD^+ , il quale porta a una riduzione della glicolisi e della produzione di ATP con conseguente morte della cellula per necrosi [127]. Questo meccanismo di azione descritto sembra essere del tutto confermato dai risultati sperimentali ottenuti in questo lavoro su cellule primarie di rene di topo, infatti si nota una diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale e conseguente innesco del fenomeno di apoptosi e necrosi. Anche i dati sperimentali ottenuti in questa tesi per la ciclosporina indicano un incremento dei fenomeni apoptotici e necrotici a seguito della somministrazione del farmaco in cellule primarie di rene di topo e un decadimento del potenziale di membrana mitocondriale.

Molti studi hanno dimostrato un significativo ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel fenomeno di tossicità indotto dalla ciclosporina. In diversi studi è stato dimostrato che i glomeruli dei ratti trattati con la ciclosporina incrementavano la produzione di ROS e il processo di perossidazione dei lipidi. In particolare la Ciclosporina causa sia un aumento della produzione dei ROS da parte dei mitocondri, nello specifico un aumento dell'anione superossido (O_2^-), sia una riduzione dei sistemi antiossidanti, come ad esempio NADPH, si pensa infatti che la diminuzione di NADPH sia dovuta all'ossidazione degli enzimi implicati nella sua sintesi [129]. L'aumento della produzione di ROS causa la formazione di un poro a livello della membrana interna dei mitocondri, la Ciclosporina infatti interagendo direttamente con i gruppi tiolici, causa l'ossidazione della cardiolipina, il fosfolipide maggiormente presente sulla membrana mitocondriale e ne causa un'alterazione della stabilità e della fluidità. La formazione del poro a livello della membrana mitocondriale oltre ad essere causato da una perdita di fluidità, a causa dell'ossidazione della cardiolipina, è dovuto anche alla traslocazione della proteina BAX a livello della membrana mitocondriale, in condizioni fisiologiche infatti BAX è localizzata a livello del citoplasma in una forma monomeric, la

ciclosporina però è in grado di modulare la traslocazione di BAX sulla membrana mitocondriale, dove forma degli aggregati che portano alla formazione del poro e al decadimento del potenziale mitocondriale [130,131]. Entrambi i fenomeni mitocondriali sono così strettamente correlati con l' aumento dell'apoptosi nelle cellule tubolari ed endoteliali, la formazione del poro, infatti, permette il rilascio nel citoplasma di tutti quei fattori apoptotici quali caspasi e citocromo C [102,130].

Infine recentemente è stato dimostrato che la CsA, modulando la forma inducibile dell'enzima NO sintetasi (iNOS), induce apoptosi delle cellule renali attraverso la neo-trascrizione della proteina tumor suppressor p53 [102].

In conclusione i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi dimostrano come le cellule primarie di rene rappresentano un ottimo modello sperimentale per lo studio della nefrotossicità indotta da farmaco. Nella prima parte del lavoro è stata infatti dimostrata e quantificata l'espressione di biomarcatori predittivi del danno renale, l'utilizzo di biomarcatori permette quindi non solo di predire l'eventuale tossicità di nefrotossine ma anche di valutare a che livello si esplica il danno, e la sua gravità, consentendo quindi lo screening di un numero sempre maggiore di composti, riducendo così la sperimentazione animale. Inoltre i risultati ottenuti nella seconda parte del lavoro sono concomitanti con i risultati presenti in letteratura ottenuti in vivo, il che conferma come tale metodo sperimentale risulti efficace anche per lo studio dei meccanismi molecolari che portano al danno renale indotto da nefrotossine. Gli obiettivi futuri sono quindi quelli di sviluppare tale modello non solo per la valutazione degli effetti tossici di queste molecole, ma anche per permettere la valutazione dei meccanismi d'azione che sono alla base della funzionalità di un farmaco, in modo da predirne la tossicità e modificarne la composizione.

Bibliografia

1. W.M. Becker, L.J. Kleinsmith , J. Hardin, G.P. Bertoni - Il mondo della cellula - Pearson.
2. B. Lewin, L.C. Cassimeris, V.R. Lingappa, G. Plopper - Cellule- Zanichelli.
3. Saier MH Jr., Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv Microb Physiol.* 1998;40:81-136.
4. Milton H. Saier, Jr, Can V. Tran and Ravi D. Barabote TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D181-6.
5. <http://www.tcdb.org/browse.php> transporter database classification.
6. Hsin-Hui Shen, Trevor Lithgow , L. Martin Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes. *J. Mol. Sci.* 2013, 14, 1589-1607.
7. Di Virgilio Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca²⁺ with fura-2. *Methods Cell Biol* 1989; 31:453-462.
8. Krämer R, Heberger C Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column *Biochim Biophys Acta* 1986; 863: 289- 296.
9. Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Iacobazzi V. Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol* 1995; 260:349– 369.
10. Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F. Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 28;249(3):589-94.
11. Da-Neng Wang, Markus Safferling, M. Joanna Lemieux, Heather Griffith, Yong Chen, Xiao-Dan Li Pratical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochimica et Biophysica* 2003; 23– 36.

12. Primrose S.B., Twyman R.M., Old R.W. Principles of gene manipulation , 6 ed., Blackwell Science 2002.
13. Hans Peter Sørensen, Kim Kusk Mortensen Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli Microbial Cell Factories 2005; 1186/1475-2859-4-1.
14. Hans Peter Sørensen, Kim Kusk Mortensen Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli, Journal of Biotechnology (2005) 113–128.
15. Villaverde A, Carrio MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies Biotechnol Lett. 2003; 25:1385–1395.
16. Quick Employing Escherichia coli to functionally express, purify, and characterize a human transporter. PNAS 2003; 99:8597–01.
17. Galluccio M , Pochini L ,Amelio L, Accardi R., Tommasino M, Indiveri c. Over-expression in E. coli and purification of the human OCTN1 transport protein Protein Expression and Purification 2009; 215–220.
18. Scalise M., Galluccio M, Pochini L, Indiveri C Over-expression in Escherichia coli, purification and reconstitution in liposomes of the third member of the OCTN sub-family: The mouse carnitine transporter OCTN3 Biochemical and Biophysical Research Communications 2012; 59–63.
19. Galluccio M, Amelio L, Scalise M, Pochini L, Boles E, Indiveri C Over-Expression in E. coli and Purification of the Human OCTN2 Transport Protein Mol Biotechnol 2012; 50:1–7
20. Galluccio M, Pingitore P, Scalise M, Indiveri C Cloning, Large Scale Over-Expression in E. coli and Purification of the Components of the Human LAT 1 (SLC7A5) Amino Acid Transporter. Protein J. 2013; 32(6):442-8.

21. Longo N, Amat C, Pasquali M Disorders of Carnitine Transport and the Carnitine Cycle *American Journal of Medical Genetics Part C* 2006; 142C:77–85.
22. Nelson D, Cox M I principi di biochimica di Lehninger, 3 ed., Zanichelli 2002.
23. Ramsay Carnitine and its role in acyl group metabolism. *Essays Biochem* 1994 ; 28: 47-61.
24. “La dimostrazione dell'essenzialità dei sistemi di trasporto per la vita della cellula, e quindi di un intero organismo”. Pochini Lorena.
25. Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F Characterization of the unidirectional transport of carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1069: 110-6.
26. Indiveri C, Tonazzi A, Prezioso G, Palmieri F. Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1065: 231-8
27. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546(1):21-43.
28. Tamai I, Ohashi R, Nezu JI, Sai Y, Kobayashi D , Oku A, Shimane M, Tsuji A Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem* 2000; 40064-40072.
29. Indiveri C, Iacobazzi V, Tonazzi A, Giangregorio N, Infantino V, Convertini P, Console L, Palmieri F The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: Function, structure and physiopathology *Mol Aspects Med.* 2011; 32(4-6):223-33.
30. Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(3):589-94.

31. Oppedisano F, Fanello D, Calvani M, Indiveri C Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein J Biochem Mol Toxicol. 2008; 22(1):8-14.
32. Pochini L, Galluccio M, Scumaci D, Giangregorio N, Tonazzi A, Palmieri F, Indiveri C. Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. 2008;173(3):187-94.
33. Ramsay RR, Arduini A The carnitine acyltransferases and their role in modulating acyl-CoA pools Arch. Biochem. Biophys. 1993; 307–314.
34. R.R. Ramsay RR, Arduini A The carnitine acyltransferases and their role in modulating acyl-CoA pools Arch. Biochem. Biophys. 1993; 307–314.
35. Ramsay RR, Arduini A The carnitine acyltransferases and their role in modulating acyl-CoA pools Arch. Biochem. Biophys. 1993; 307–314.
36. Tonazzi A, Galluccio M, Oppedisano F, Indiveri C Functional reconstitution into liposomes and characterization of the carnitine transporter from rat liver microsomes. Biochim Biophys Acta. 2006;1758(1):124-31.
37. Gooding JM, Shayeghi M, Saggerson ED Membrane transport of fatty acylcarnitine and free l-carnitine by rat liver microsomes Eur J. Biochem. 2004; 954–961.
38. Pochini L, Oppedisano F, Indiveri C Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane Biochim. Biophys. Acta 2004; 78–86.
39. Bieber L Carnitine Annu. Rev. Biochem. 1988; 261–283.
40. Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V Organic cation transporters. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2003; 150:36-90.
41. Wright SH Role of organic cation transporters in the renal handling of therapeutic agents and xenobiotics. Toxicology and Applied Pharmacology 2005; 204:309_319.

42. Ciarimboli E, Schlatter A Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2005; 449:423-441.
43. Ciarimboli E, Schlatter A Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2005; 449:423-441.
44. Koepsell H, Endou H The SLC22 drug transporter family *Eur J Physiol* 2004; 447:666–676.
45. Kacper A, Wojtal, Jyrki J. Eloranta, Petr Hruz, Heike Gutmann, Juergen Drewe, Alex Staumann, Christoph Beglinger, Michael Fried, Gerd A. Kullak-Ublick, and Stephan R. Vavricka Changes in mRNA Expression Levels of Solute Carrier Transporters in Inflammatory Bowel Disease Patients. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics DMD* 2009; 37:1871–1877.
46. Satish A. Eraly, Monte JC, Sanjay K Novel slc22 transporter homologs in fly, worm, and human clarify the phylogeny of organic anion and cation transporters. *Physiol. Genomics* 2004;18:12-24.
47. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* 1997;419(1):107-11.
48. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998; 273: 20378–20382.
49. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, et al. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice *J Biol Chem* 2000; 275: 40064–40072
50. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. OCTN Cation Transporters in Health and Disease: Role as Drug Targets and Assay Development. *J Biomol Screen.* 2013;18(8):851-67.

51. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Amelio L, Indiveri C Reconstitution in liposomes of the functionally active human OCTN1 (SLC22A4) transporter overexpressed in *Escherichia coli* *Biochem. J.* 2011; 439, 227–233.
52. Galluccio M, Amelio L, Scalise M, Pochini L, Boles E, Indiveri C. Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein. *Mol Biotechnol.* 2012 ;50(1):1-7.
53. Nakamura T, Yoshida K, Yabuuchi H, Maeda T, Tamai Functional characterization of ergothioneine transport by rat organic cation/carnitine transporter octn1 (slc22a4). *Biol. pharm. bull.* 2008; 31:1580—1584.
54. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovitch KA, Indiveri C. The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 559–565.
55. Okabe M, Szakacs G, Reimers MA Profiling SLCO and SLC22 Genes in the NCI-60 Cancer Cell Lines to Identify Drug Uptake Transporters. *Mol. Cancer. Ther.* 2008 ; 3081–3091.
56. Grundemann D, Harlfinger S, Golz S Discovery of the Ergothioneine Transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102, 5256–5261.
57. Nikodemus D, Lazic D, Bach M Paramount Levels of Ergothioneine Transporter SLC22A4 mRNA in Boar Seminal Vesicles and Cross-Species Analysis of Ergothioneine and Glutathione in Seminal Plasma. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011;62, 411–419.
58. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C Regulation by Physiological Cations of Acetylcholine Transport Mediated by Human OCTN1 (SLC22A4): Implications in the Non-neuronal Cholinergic System. *Life Sci.* 2012; 91, 1013–1016.

59. Kummer W, Lips KS, Pfeil U The Epithelial Cholinergic System of the Airways. *Histochem. Cell. Biol.* 2008; 130, 219–234.
60. Wessler I, Kirkpatrick CJ Acetylcholine beyond Neurons: The Non-neuronal Cholinergic System in Humans. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154, 1558–1571.
61. Tokuhira S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2003; 35:341–348 .
62. Maekawa S, Mori D, Nishiya T, Takikawa O, Horinouchi T, Nishimoto A, Kajita E, Miwa S. OCTN2VT, a splice variant of OCTN2, does not transport carnitine because of the retention in the endoplasmic reticulum caused by insertion of 24 amino acids in the first extracellular loop of OCTN2. *Biochim Biophys Acta*; 1773: 1000-6.
63. Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:589–595.
64. Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu JI, Oku A, Sai Y, Shimane M, Tsuji A. Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): Its pharmacological 1999.
65. Wagner CA, Lükewille U, Kaltenbach S, Moschen I, Bröer A, Risler T, Bröer S, Lang F. Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine .
66. Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schömig E, Gründemann D The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *DMD Fast Forward* 2008; doi:10.1124/dmd.108.023929.

67. Indiveri C, Pochini L, Oppedisano F, Tonazzi A The Carnitine Transporter Network: Interactions with Drugs. *Current Chemical Biology* 2010; 108-123.
68. Pochini L, Scalise M, Indiveri C. Inactivation by omeprazole of the carnitine transporter (OCTN2) reconstituted in liposomes. *Chem Biol Interact.* 2009; 15;179(2-3):394-401
69. Kato Y, Sai Y, Yoshida K, Watanabe C, Hirata T, Tsuji A PDZK1 directly regulates the function of organic cation/ carnitine transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol.* 2005; 67:734–743.
70. Maeda T, Wakasawa T, Funabashi M Regulation of Octn2 Transporter (SLC22A5) by Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31, 1230–1236.
71. Karim L, Grant M, Qureshi I Carnitine Transport by Organic Cation Transporters and Systemic Carnitine Deficiency *Molecular Genetics and Metabolism* 2001; 73, 287–297.
72. Magoulas PL, El-Hattab A, Systemic Primary Carnitine Deficiency: An Overview of Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2012, 7, 68.
73. Gazouli M, Gerassimos M, Archimandritis A, Nasioulas G, Anagnou NP Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease *World J Gastroenterol* 2005;11(47):7525-7530.
74. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA Functional Variants of OCTN Cation Transporter Genes Are Associated with Crohn Disease. *Nat. Genet.* 2004; 36, 471–475.
75. Scalise M, Galluccio M, Accardi R, Indiveri C Human OCTN2 (SLC22A5) is Down-Regulated in Virus- and Nonvirus-Mediated Cancer. *Cell. Biochem. Funct.* 2012; 30, 419–425.

76. Martini M, Ferrara AM, Giachelia M Association of the OCTN1/1672T Variant with Increased Risk for Colorectal Cancer in Young Individuals and Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 2012; 18, 439–448.
77. Minchinton AI, Tannock IF Drug Penetration in Solid Tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 2006; 583–592.
78. James PK, Rooney The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury *Toxicology* 2007; 145–156.
79. Clarkson TW, Jayesh B, Ballatori N Mechanisms of Mercury Disposition in the Body *american journal of industrial medicine* 2007 50:757–764.
80. ATSDR 1999, toxicological profile for mercury. U.S. department of health and humans Services, Atlanta GA.
81. Faro LRF, do Nascimento JLM, Alfonso M, DuraHn R In Vivo Effects of Inorganic Mercury (HgCl₂) on Striatal Dopaminergic System. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2001; 263-267.
82. Jordan IK, Kondrashov FA, Adzhubei IA, Wolf YI, Koonin EV, Kondrashov AS, Sunyaev S, A universal trend of amino acid gain and loss in protein evolution, *Nature* 2005;433:633-8.
83. McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons PJ, A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults, *Environ Health Perspect* 2007;115:1435-41.
84. Bridges C, Zalups RK Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 274– 308.
85. Zalups RK Molecular Interactions with Mercury in the Kidney *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):113-43.

86. Yin Z, Jiang H, Syversen T, Rocha J, Farina M, Ashner M The methyl mercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter, *Journal of Neurochemistry* 2008; 1083-1090.
87. Bridges CC, Zalups RK System b_{0,+} and the transport of thiol-s-conjugates of methylmercury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(2):948-56.
88. Pelis RM, Dangprapai Y, Wunz TM, Wright SH. Inorganic mercury interacts with cysteine residues (C451 and C474) of hOCT2 to reduce its transportactivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1583-91.
89. Pochini L, Peta V, Indiveri C Inhibition of the OCTN2 Carnitine Transporter by HgCl₂ and Methylmercury in the Proteoliposome Experimental Model: Insights in the Mechanism of Toxicity. *Toxicol. Mech. Methods.* 2012; 23, 68–76.
90. Oppedisano F, Galluccio M, Indiveri C. Inactivation by Hg²⁺ and methylmercury of the glutamine/amino acid transporter (ASCT2)reconstituted in liposomes: Prediction of the involvement of a CXXC motif by homology modelling. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1266–1273.
91. Oppedisano F, Pochini L, Broer S, Indiveri C The B⁰AT1 aminoacid transporter from rat kidney reconstituted in liposomes: Kinetics and inactivation by methylmercury. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 2551–2558.
92. Tonazzi A, Indiveri C Effects of heavy metal cations on the mitochondrial ornithine/citrulline transporter reconstituted in liposomes *Biometals.* 2011; 24(6):1205-15.
93. Inui KI, Masuda S, Saito H Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney *Kidney Int* 2000; 58:944-58 .
94. Savoidi S Il danno renale da antibiotici e chemioterapici *G Ital Nefrol* 2012; 56:42-48.

95. Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury *Toxicology* 2008; 245(3):182-93.
96. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV Biomarkers of acute kidney injury *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:463-93.
97. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Seipp CA, Einhorn JH, White DE, Steinberg SM Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b *J Clin Oncol* 1999; 17(3):968-75.
98. Goodsell DS the molecular perspective: Cisplatin *Stem Cells* 2006; 24(3):514-5.
99. Andrews PA, Howell SB Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance *Cancer Cells* 2000; 2(2):35-43.
100. Perez P Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance *J Cancer* 1998; 34(10):1535-42 1998.
101. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB “Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity” *Toxins* 2010; 2(11):2490-518.
102. De Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T Cyclosporine A induced apoptosis in renal tubular cells is related to oxidative damage and mitochondrial fission *Toxicol Lett* 2013; 27;218(1):30-8.
103. Warren-Stomberg M, Brattwall M, Jakobsson JG Non-opioid analgesics for pain management following ambulatory surgery, a review *Minerva Anestesiol* 2013.
104. Leppert W, Krajnik M, Wordliczek J. *Curr Pharm Des* Delivery systems of opioid analgesics for pain relief: a review *Curr Pharm Des* 2013.
105. Schetz M, Dasta J, Goldstein S, Golper T Drug-induced acute kidney injury *Curr Opin Crit Care* 2005; 11(6):555-65.

106. Adiyanti SS, Loho T Acute Kidney Injury (AKI) biomarker *Acta Med Indones* 2012; 44(3):246-55.
107. Bruce A Molitoris, Vyacheslav Y Melnikov, Mark D Okusa, Jonathan Himmelfarb Technology Insight: biomarker development in acute kidney injury—what can we anticipate? *Nature Clinical Practice Nephrology* 2008; 4:154-165.
108. Frank R, Hargreaves R Clinical biomarkers in drug discovery and development *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(7):566-80.
109. Bagshaw SM, Gibney RT Conventional markers of kidney function *Crit Care Med* 2008; 36(4 Suppl):S152-8.
110. Parikh CR, Devarajan P New biomarkers of acute kidney injury *Crit Care Med* 2008; 36(4 Suppl):S159-65.
111. Soni SS, Cruz D, Bobek I, Chionh CY, Nalesso F, Lentini P, de Cal M, Corradi V, Virzi G, Ronco C Biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions *Int Urol Nephrol* 2010; 42(1):141-50.
112. Vishal S Vaidya, Michael A Ferguson, Joseph V Bonventre Biomarkers of acute kidney injury *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2007; 48: 463-493.
113. Van Timmeren MM, Van den Heuvel MC, Bailly V Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease *J Pathol* 2007; 212:209-217.
114. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney *Kidney Int* 2001; 60(5):1645-57.
115. DesRochers TM, Suter L, Roth A, Kaplan DL Bioengineered 3D human kidney tissue, a platform for the determination of nephrotoxicity *PLoS One* 2013; 8(3):e59219.
116. Brown CD, Sayer R, Windass AS, Haslam IS, De Broe ME, D'Haese PC, Verhulst A Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(3):428-38.

117. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Risenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, Schlessinger A, Bonomi M, Harries W, Sali A, Johri AK, Stroud RM Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter *Nature* 2013; 496(7446):533-6.
118. Van Iwaarden PR, Driessen AJ, Konings WN What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1113:161–170.
119. Scalise M, Pochini L, Giangregorio N, Tonazzi A, Indiveri C. Proteoliposomes as tool for assaying membrane transporter functions and interactions with xenobiotics. *Pharmaceutics* 2013, 472-497;
120. Dierks T, Salentin A, Krämer R Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: Evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1028:281–288.
121. García N, Martínez-Abundis E, Pavón N, Correa F, Chávez E. Copper induces permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. *Cell Biol Int* 2007; 31:893–899.
122. Indiveri C, Tonazzi A, Dierks T, Krämer R, Palmieri F .The mitochondrial carnitine carrier: Characterization of SH-groups relevant for its transport function. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1140:53–58.
123. Sivakumar JT, Kenneth E, McMartin Development of a Primary Culture System of Rat Kidney Proximal Tubule Cells for Transport Studies *Journal of Epithelial Biology & Pharmacology* 2010; 3:15-19.
124. Iguchi S, Nishi S, Ikegame M, Hoshi K, Yoshizawa T, Kawashima H, Arakawa M, Ozawa H, Gejyo F Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury *Nephron Exp Nephrol* 2004; 97(3):e96-105.

125. Gobé GC, Buttyan R, Wyburn K, Etheridge MR, Smith PJ Clusterin expression and apoptosis in tissue remodeling associated with renal regeneration *Kidney International* 1995; 47: 411–420.
126. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K Cisplatin nephrotoxicity: a review *Am J Med Sci* 2007; 334(2):115-24.
127. Nowak G Protein Kinase C- α and ERK1/2 Mediate Mitochondrial Dysfunction, Decreases in Active Na⁺ Transport, and Cisplatin-induced Apoptosis in Renal Cells *J Biol Chem.*2002; 277(45): 43377–43388.
128. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways *Curr Med Chem.* 2003; 10(3):257-66.
129. Pérez de Hornedo J, de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T Cyclosporin A causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in renal tubular cells *Nefrologia.* 2007; 27(5):565-73.
130. de Arriba G, Calvino M, Benito S, Parra T Cyclosporine A-induced apoptosis in renal tubular cells is related to oxidative damage and mitochondrial fission *Toxicol Lett.* 2013; 218(1):30-8.
131. Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A “intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis” *J Am Soc Nephrol.*2003;14(12):3072-80.

"La presente tesi è cofinanziata con il sostegno della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria. L'autore è il solo responsabile di questa tesi e la Commissione Europea e la Regione Calabria declinano ogni responsabilità sull'uso che potrà essere fatto delle informazioni in essa contenute".