

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA CELLULARE ED
ATTIVITÀ DEI FARMACI IN ONCOLOGIA (XXIII CICLO) BIO/10**

*Il trasportatore di carnitina OCTN2: espressione
ed implicazioni fisiopatologiche.*

TUTOR

Prof. Cesare Indiveri

DOTTORANDA

Dr.ssa Mariafrancesca Scalise

Coordinatore del dottorato:

Prof. Diego Sisci

Anno Accademico 2009-2010

- INDICE -

- ABSTRACT pag. 6

- ABBREVIAZIONI pag. 8

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

- 1.1 PREMessa pag. 11

- 1.2 SISTEMI DI TRASPORTO pag. 12

- 1.3 TERMODINAMICA DEL TRASPORTO pag. 14

- 1.4 CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI DI TRASPORTO (TC) pag. 15

- 1.5 LO STUDIO DEI SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA pag. 19

- 1.6 APPROCCIO BIOINFORMATICO NELLO STUDIO DEI SISTEMI
DI TRASPORTO pag. 21

- 1.7 ESPRESSIONE ETEROLOGA DI SISTEMI DI TRASPORTO
DI MEMBRANA pag. 22

- 1.8 RELAZIONE FRA SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA
E PATOLOGIE UMANE pag. 24

- 1.9 IL SISTEMA DELLA CARNITINA E SUA OMEOSTASI pag. 26

- 1.10 IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEI MITOCONDRI pag. 29

- 1.11 IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEL RETICOLO
ENDOPLASMICO pag. 31

- 1.12 IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEI PEROSSISOMI pag. 32

- 1.13 LA FAMIGLIA OCTN (SLC22A): TRASPORTATORI DELLA
CARNITINA DI MEMBRANA PLASMATICA pag. 33

- 1.14 IL SISTEMA DI TRASPORTO DI MEMBRANA PLASMATICA OCTN2 pag. 35

- 1.15 OCTN2 ED INTERAZIONE CON FARMACI pag. 38

- 1.16 IMPLICAZIONI DI OCTN2 NELLA CANCEROGENESI pag. 39
- 1.17 MODELLO SPERIMENTALE HPV PER LO STUDIO DELLA REGOLAZIONE
DEL PROMOTORE DI OCTN2 pag. 42

CAPITOLO 2. MATERIALI E METODI pag. 47

- 2.1 PREPARAZIONE DI VESCICOLE DI MEMBRANA DI BRUSH-BORDER DI
RENI DI RATTO pag. 48
- 2.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE NEI
BRUSH-BORDER pag. 51
- 2.3 SOLUBILIZZAZIONE DEL TRASPORTATORE OCTN2 pag. 51
- 2.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE
NEI CAMPIONI pag. 52
- 2.5 PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI pag. 54
- 2.6 INCORPORAZIONE DELLA PROTEINA NEI LIPOSOMI: RICOSTITUZIONE pag. 55
- 2.7 PREPARAZIONE DELLE COLONNE XAD-4 pag. 56
- 2.8 PREPARAZIONE DELLE COLONNE SEPHADEX G-75 pag. 57
- 2.9 MISURA DI TRASPORTO DELL' UPTAKE DI SUBSTRATO RADIOATTIVO
NEI PROTEOLIPOSOMI pag. 61
- 2.10 MISURA DELLA RADIOATTIVITÀ ENTRATA NEI PROTEOLIPOSOMI E
CALCOLO DELL' ATTIVITÀ DI TRASPORTO pag. 64
- 2.11 ELABORAZIONE DEI DATI SPERIMENTALI pag. 66
- 2.12 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO pag. 68
- 2.13 PURIFICAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA DA GEL D' AGAROSIO pag. 68
- 2.14 PURIFICAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA
DOPO DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE pag. 69

– 2.15 DETERMINAZIONE ED ANALISI DI SEQUENZE NUCLEOTIDICHE SECONDO IL METODO DI SANGER MODIFICATO	pag. 69
– 2.16 CLONAGGIO DEL GENE hOCTN2	pag. 71
– 2.17 DIGESTIONE DEL cDNA DI hOCTN2	pag. 72
– 2.18 DIGESTIONE DEL PET-41a(+)	pag. 73
– 2.19 DIGESTIONE DEL VETTORE PET- 21a(+)	pag. 73
– 2.20 TRATTAMENTO DEL VETTORE CON FOSFATASI ALCALINA	pag. 74
– 2.21 LIGATION	pag. 75
– 2.22 CELLULE COMPETENTI	pag. 75
– 2.23 TRASFORMAZIONE	pag. 76
– 2.24 ESTRAZIONE DEL DNA MEDIANTE IL KIT QIAPREP SPIN MINIPREP	pag. 76
– 2.25 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE GST-hOCTN2	pag. 77
– 2.26 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2(R2K)	pag. 78
– 2.27 ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS	pag. 78
– 2.28 WESTERN BLOTTING ED IMMUNODECORAZIONE	pag. 79
– 2.29 PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2-GST	pag. 80
– 2.30 PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2(R2K)	pag. 81
– 2.31 PRODUZIONE DI VETTORI RETROVIRALI E RETROTRASDUZIONE DI CHERATINOCITI PRIMARI	pag. 81
– 2.32 COLTURA DI LINEE CELLULARI TUMORALI UMANE E TRATTAMENTO DEMETILANTE DEL DNA	pag. 83
– 2.33 ANALISI DEI DATI MEDIANTE REAL TIME PCR QUANTITATIVA	pag. 85
<u>CAPITOLO 3. RISULTATI</u>	pag. 86
– 3.1- INATTIVAZIONE DA PARTE DELL'OMEPRAZOLO DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 DI RATTO RICOSTITUITO IN LIPOSOMI	pag. 87

- 3.1.1 INIBIZIONE DEL TRASPORTATORE DI CARNITINA	pag. 87
- 3.1.2 CINETICA DI INIZIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 DA PARTE DELL' OMEPRAZOLO	pag. 92
- 3.1.3 VALUTAZIONE DEL TRASPORTO DI OMEPRAZOLO	pag. 96
- 3.2 OVER-ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE IN <i>E.coli</i> DEL COSTRUTTO GST-hOCTN2	pag. 98
- 3.2.1 OVERESPRESSIONE DEL COSTRUTTO GST-hOCTN2	pag. 98
- 3.2.2 PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA OVER-ESPRESSA GST-hOCTN2	pag. 99
- 3.2.3 TRATTAMENTO CON LA TROMBINA E SEPARAZIONE DI hOCTN2 DA GST	pag. 101
- 3.2.4 OVERESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DEL COSTRUTTO hOCTN2 (R2K)	pag. 102
- 3.3 ESPRESSIONE DI hOCTN2 IN CHERATINOCITI RETROTRASDOTTI CON HPV16 E6 E7	pag. 104
- 3.4 ESPRESSIONE DI hOCTN2 LINEE CELLULARI TUMORALI	pag. 109
<u>CAPITOLO 4. CONCLUSIONI</u>	pag. 113
- 4.1 INATTIVAZIONE DI OCTN2 DA PARTE DELL' OMEPRAZOLO	pag. 114
- 4.2 OVER- ESPRESSIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 UMANO	pag. 117
- 4.3 STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 IN LINEE TUMORALI UMANE	pag. 119
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 121
<u>PUBBLICAZIONI</u>	pag. 135

- ABSTRACT -

In the present work we studied the plasma membrane transporter of carnitine OCTN2. We firstly investigated the interaction of this transporter with a commonly used drug, the omeprazole. The carnitine transporter was solubilized from rat renal apical plasma membrane (brush-border membrane) with C₁₂E₈ and reconstituted into liposomes removing the detergent from mixed micelles by hydrophobic chromatography on Amberlite XAD-4. The reconstituted carnitine transporter catalysed a first-order antiport reaction of carnitine with itself or other substrates stimulated by external, not internal, Na⁺, with a positive cooperativity. Na⁺ was co-transported with carnitine. The transporter is asymmetrical and it is unidirectionally inserted into the proteoliposomal membrane with an orientation corresponding to that of the native membrane. Omeprazole externally added to the proteoliposomes, inhibited the carnitine/carnitine antiport catalysed by the reconstituted transporter. The inhibition was reversed by the treatment of the proteoliposomes by DTE indicating that the inhibition was caused by the formation of omeprazole-transporter mixed disulphide. However, omeprazole caused inhibition of the transport also in the presence of DTE, indicating a second inhibition mechanism of non-covalent nature. The presence of the substrate during the incubation of the omeprazole with the proteoliposomes increased the formation of the mixed-disulphide. Omeprazole did not inhibited when present in the internal proteoliposomal compartment, indicating that the inhibition was specifically due to interaction with the external residues or sites of the protein. Omeprazole was not found to be transported by OCTN2: the structure of the activated form of omeprazole, indeed, possess a charged pyridine group and a methoxyl oxygen at a reciprocal distance of three carbon atoms which fulfil the requirement for interaction with the active site and inhibition but not for transport. The implication of the two mechanism of inhibition of the carnitine transporter in physiopathology may be relevant in the light of the omeprazole concentration reached in the blood after administration: the inhibition by omeprazole, indeed, may lead to a carnitine deficiency-like syndrome more or less evident, depending on the dose and on the individual capacity of metabolizing the drug.

In the present work we studied, also, the human isoform of OCTN2: (i) we obtained the heterologous over-expression and the purification of hOCTN2 in a bacterial host, *E. coli* and (ii) we evaluated the expression profile of hOCTN2 in different cancer cell lines and in keratinocytes retrotransduced with HPV16 E6E7. The cDNA coding for hOCTN2 was cloned in two bacterial expression vector and, following two different strategies, we over-expressed the hOCTN2 protein as fusion protein with GST and as hOCTN2 without any tag but with codon bias. In both cases the protein was present in the insoluble fraction of induced lysate and was, then, solubilized with a ionic detergent, Sarkosyl, together with chaotropic agent, Urea. After solubilization the protein was purified on Nichel-chelating chromatography column, obtaining the protein solubilized in Triton X-100.

In the present work we described the expression profile of hOCTN2 in different cancer cell lines and in keratinocytes immortalized by HPV16E6E7: we observed a down-regulation at mRNA levels of hOCTN2 which was reversed by treating cells with 5-aza-cytidine a DNA demetilating agent. Cells over- expressing hOCTN2 were more sensitive to the chemotherapeutic agent cisplatin. This observation is a preliminary result suggesting a potential role of hOCTN2 in carcinogenesis or in cancer development .

ABBREVIAZIONI

Arg: Arginina

ATP: Adenosina Trifosfato

BSA: albumina di siero bovino

cDNA: DNA complementare

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

CIAP: Fosfatasi alcalina di intestino di vitello

D.O.: densità ottica

DAB: Diamminobenzidina

DDM: n-Dodecyl β -D-maltoside

ddNTP: 2', 3' -dideossinucleotide 5' - trifosfato

DNA: Acido deossinucleico

dNTP: Deossinucleotide trifosfato

DTT: ditionitrosolo

E. Coli: Escherichia Coli

EDTA: acido etilendiamminotetracetico

IPTG: isopropil- β -D-tiogalattopiranoside

Lys: Lisina

Lys: Lisogeno

OCTN: Nuovo trasportatore di cationi organici

PCR: reazione di polimerizzazione a catena

rRNA: Acido Ribonucleico Ribosomiale

SDS: dodecilsolfato di sodio

SDS Page: Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

T7RNAP: RNA Polimerasi derivante dal fago λ T7

TAE: Tris, Acido acetico, EDTA

TE: Tris, EDTA

TEMED: Tetrametiletilendiammina

TRIS: triidrossimetilamminometano

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

-1.1- PREMESSA

Nel processo che ha condotto alla formazione delle prime cellule nel brodo primordiale, una delle tappe cruciali è stata, sicuramente, quella della formazione di una membrana plasmatica. Deve essere sicuramente esistita, infatti, una pressione selettiva che ha favorito la compartimentazione per proteggere i sistemi neoformati di macromolecole organiche e molecole inorganiche, dalle mutevoli condizioni ambientali dell'era prebiotica. La formazione di un sistema chiuso ha consentito, inoltre, di aumentare la concentrazione delle sostanze che, casualmente, si sono ritrovate al suo interno, dando così l'avvio ai primi processi metabolici, tipici di tutte le forme di vita attualmente esistenti.

La sopravvivenza delle cellule è, tuttavia, strettamente legata alla possibilità di scambiare sostanze con l'ambiente esterno o con il mezzo extracellulare, laddove si tratti, rispettivamente, di organismi unicellulari o pluricellulari.

Nelle cellule si sono evoluti, pertanto, dei sistemi che consentono di effettuare il trasporto di sostanze (molecole organiche, inorganiche, ioni) dal compartimento citosolico verso l'esterno e viceversa.

-1.2- SISTEMI DI TRASPORTO

I sistemi di trasporto hanno molteplici funzioni: regolano l'uptake, nel citosol, di nutrienti successivamente indirizzati ai diversi organelli cellulari, la concentrazione di metaboliti e dei prodotti di scarto delle differenti vie metaboliche cellulari, l'estrusione di sostanze tossiche e farmaci. Essi mediano, inoltre, l'uptake e l'efflusso di ioni allo scopo di mantenere le loro concentrazioni intracellulari molto differenti da quelle del mezzo extracellulare, per consentire la creazione del potenziale di membrana; i trasportatori sono implicati, infine, nella secrezione di proteine, lipidi e carboidrati in vari processi fisiologici tipici delle diverse specie esistenti.

I trasportatori di membrana plasmatica sono proteine integrali che possono funzionare anche in associazione a recettori e a proteine citosoliche, catalizzando reazioni vettoriali, chimiche e di trasferimento elettronico. Il trasporto di substrati attraverso la membrana plasmatica può avvenire attraverso due tipi di strutture, i canali e le permeasi o carrier.

I canali consentono il passaggio, secondo gradiente di concentrazione, di substrati da un lato all'altro della membrana plasmatica, attraverso un poro costituito da residui amminoacidi idrofobici, idrofilici o anfipatici a seconda delle caratteristiche chimiche della molecola trasportata.

I carrier, a differenza dei canali che sono quasi esclusivamente oligomerici, sono proteine monomeriche, trasportano molecole con una stereospecificità maggiore e con una velocità cinque volte minore rispetto a quella dei canali. Sebbene entrambi vadano incontro a saturazione, questo fenomeno è molto più comune tra i carrier.

Queste caratteristiche generali, insieme ai dati cristallografici, indicano dei confini abbastanza netti tra canali e permeasi. Alcuni carrier, tuttavia, mostrano una cinetica sovrapponibile a quella dei canali, ma solo in seguito a modificazioni conformazionali della proteina, dovute a legami covalenti o ad interazioni non covalenti con il substrato trasportato.

Quando la reazione vettoriale è accoppiata ad una reazione chimica, assorbimento di luce o flusso di elettroni, si parla di trasporto attivo primario; il trasporto attivo è definito secondario, invece, se la fonte di energia, quale ad esempio un gradiente di protoni (PMF) o di ioni sodio (SMF), è generata a spese di una fonte primaria.

Tra i trasportatori primari vanno principalmente annoverati i trasportatori ABC (ATP Binding Cassette) costituiti da due domini, il dominio MSD (Membrane Spanning Domain) costituito da porzioni transmembrana, ed il dominio NBD (Nucleotide Binding Domain) responsabile dell'interazione citosolica con l'ATP. L'NBD si può considerare come un motore in grado di generare movimento sfruttando l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP: l'energia chimica viene, dunque, convertita in energia cinetica. A questi due domini principali è associata, in alcuni casi, una terza subunità regolatoria definita SBR, implicata nei processi di riconoscimento e reclutamento del substrato.

Nella categoria dei trasportatori attivi secondari si possono distinguere tre classi di molecole, definibili in base al meccanismo di traslocazione del substrato:

– *Trasportatori per uniport.*

Sono identificabili come trasportatori responsabili di quella che, inizialmente, era definita “diffusione facilitata”. Essi catalizzano il trasporto di una singola specie molecolare, il cui gradiente di concentrazione a cavallo della membrana, fornisce la driving force per fare avvenire la traslocazione della molecola, rendendo negativo il valore totale di ΔG della reazione vettoriale.

– *Trasportatori per symport.*

Sono definiti anche cotrasportatori, catalizzano il trasporto di due o più specie molecolari nella stessa direzione. L'energia necessaria al trasferimento, in questo caso, è fornita dal gradiente di concentrazione di uno dei due substrati trasportati.

- *Trasportatori per antiport.*

Definiti anche controtrasportatori, catalizzano il trasporto di una o più specie molecolari in scambio con un'altra. I processi di antiport possono interessare molecole simili (antiport soluto: soluto) o molecole del tutto diverse (antiport soluto: cationi) (Saier et al. 2000).

-1.3- TERMODINAMICA DEL TRASPORTO

L'equazione che descrive la termodinamica del trasporto è simile a quella delle reazioni chimiche:

$$\Delta G_t = RT \ln [S]_{\text{trans}} / [S]_{\text{cis}} + \Delta G'$$

Dove R è la costante dei gas (8,315 J/mol·K), T è la temperatura assoluta (298 K) e $[S]_{\text{trans}}$ e $[S]_{\text{cis}}$ sono le concentrazioni del substrato da trasportare da un lato all'altro della membrana plasmatica. Il fattore $\Delta G'$ descrive l'energia libera di una reazione, termodinamicamente favorita, accoppiata al processo di trasporto. Ciò, rende il valore di ΔG_t complessivamente negativo e la reazione di trasporto favorita. Nel caso dei trasportatori attivi primari (trasportatori ABC), $\Delta G'$ corrisponde all'idrolisi di ATP, per i trasportatori attivi secondari, invece, rappresenta il gradiente di concentrazione della sostanza cotrasportata o controtrasportata, a seconda che si considerino, rispettivamente, il symport o l'antiport.

Quando una delle molecole trasportate è uno ione, il suo movimento, senza il contemporaneo spostamento di un altro ione con la stessa carica ed in direzione opposta, determina la formazione di un potenziale elettrico a cavallo della membrana.

L'equazione che descrive l'energia libera, in questo caso, deve tenere conto anche del gradiente elettrico a cavallo della membrana, non solo di quello chimico:

$$\Delta G_t = RT \ln [S]_{\text{trans}} / [S]_{\text{cis}} + Z\mathcal{F} \Delta\Psi$$

Dove Z è la carica dello ione, \mathcal{F} è la costante di Faraday ($96.5 \text{ KJ} \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) e $\Delta\Psi$ è il potenziale di membrana espresso in volt. Quando il potenziale di membrana assume un valore negativo (esterno \rightarrow interno) e lo ione ha una carica positiva, il ΔG_t complessivo è negativo e la reazione di trasferimento di un catione verso l'interno della cellula, è favorita.

Ovviamente per gli anioni vale il contrario. Il mantenimento di questi gradienti di concentrazione è garantito proprio dall'esistenza di una membrana plasmatica selettivamente permeabile (Voet et al. 2000; Randal et al.; Nelson et al. 2006).

-1.4- CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI DI TRASPORTO (TC)

Il sistema di classificazione dei meccanismi di trasporto TC, è stato realizzato tenendo conto delle informazioni sia funzionali che filogenetiche, riguardanti questa classe di proteine di membrana.

I trasportatori sono classificati sulla base di cinque criteri indicati da cinque lettere, V, W, X, Y e Z, che costituiscono il codice d'accesso per identificare, in modo univoco, un membro del sistema TC. La lettera V indica la classe del trasportatore, W la sottoclasse, X la famiglia o la superfamiglia cui appartiene la permeasi in questione, Y rappresenta la sottofamiglia in una

famiglia (o la famiglia in una superfamiglia) in cui è stato inserito il trasportatore ed infine, Z specifica sia il substrato o il range di substrati trasportati, sia la polarità del trasporto (cis o trans).

La modalità di regolazione non è considerata un parametro utilizzabile per la classificazione, poiché pare non essere collegata alla filogenicità. Per questo motivo, due permeasi che trasportano il medesimo substrato con eguale meccanismo, sono identificati con lo stesso numero TC, indipendentemente se si tratti di proteine ortologhe (originatesi cioè in organismi differenti in seguito a speciazione) o paraloghe (originatesi cioè nello stesso organismo in seguito a duplicazione genica).

Le categorie di trasportatori identificati dal sistema TC sono le seguenti:

- 1. A. Canali tipo α .

Si tratta di proteine di membrana ubiquitarie, ritrovate in tutti gli organismi, dai batteri agli eucarioti superiori. Questi trasportatori, normalmente, catalizzano il movimento di molecole senza dispendio energetico; sono costituiti da α - eliche che formano un canale acquoso, attraverso il quale passano i substrati senza evidenza di un meccanismo mediato da carrier. Le porine non appartengono a questa categoria di trasportatori, ma sono state incluse nella classe 1B.

- 1. B. Porine β -barile.

Sono trasportatori che funzionano con un meccanismo che non usa energia metabolica, come quelli della classe 1A. In questo caso, però, la porzione transmembrana è costituita, quasi esclusivamente, da foglietti β che formano un "barile". Sono trasportatori ritrovati nella membrana esterna dei batteri gram-negativi, nei mitocondri, nei plastidi.

- 1. C. Tossine che formano pori.

Sono peptidi sintetizzati da una cellula e secreti all'interno di altre cellule, nelle quali formano pori, a cavallo della membrana plasmatica. Possono suscitare effetti citotossici, legati o alla perdita dell'equilibrio osmotico della cellula o alla deregolazione di processi citosolici.

- 1. D. Canali non sintetizzati sui ribosomi.

Sono molecole costituite spesso da catene di D- e L- amminoacidi o di idrossiacidi (come ad esempio lattato e β -idrossibutirrato) che formano canali ionici oligomerici. L'assemblaggio di questi canali, a partire da subunità preesistenti è indotto, generalmente, dal cambiamento del potenziale di membrana. Sono stati ritrovati in funghi e batteri, che li utilizzano come meccanismi di difesa.

- 2. A. Uniporter, symporter e antiporter.

Rientrano in questa categoria le permeasi che trasportano molecole per uniport (in cui una singola molecola viene trasportata secondo gradiente di concentrazione o elettrochimico se è carica), symport (due o più specie cotrasportate, di cui una controgradiente di concentrazione e l'altra secondo gradiente fornendo l'energia necessaria al trasporto della prima), ed antiport (due o più molecole trasportate contemporaneamente in direzione opposta, l'una contro gradiente di concentrazione, l'altra secondo gradiente in modo da avere l'energia necessaria al trasporto della prima).

- 2. B. Carrier non sintetizzati sui ribosomi.

Come 1D, si tratta di molecole non necessariamente proteiche, che possono trasportare ioni sia in modo elettrogenico (in cui lo ione si muove secondo gradiente elettrochimico) che elettroneutro (quando un substrato carico è scambiato con un altro carico anch'esso).

- 2. C. Trasportatori guidati dal gradiente di ioni.

Si tratta di un meccanismo poco conosciuto, presente in batteri gram-negativi che consente il trasporto passivo di alcune molecole grazie all'accumulo di energia, nello spazio periplasmico, sottoforma di gradiente di H^+ o Na^+ .

- 3. A. Trasportatori guidati dall'idrolisi del pirofosfato.

L'idrolisi del legame pirofosfato dell'ATP o degli altri nucleosidi trifosfato, fornisce l'energia necessaria per il trasporto contro gradiente dei substrati. Il trasportatore, ma non la molecola trasportata, può essere transitoriamente fosforilato in determinati residui amminoacidici. Queste molecole sono state ritrovate universalmente in tutti gli organismi esistenti.

- 3. B. Trasportatori guidati dalla decarbossilazione.

Appartengono a questa classe, alcuni trasportatori batterici che consentono l'uptake o l'efflusso di soluti (quali ad esempio gli ioni sodio) attraverso la decarbossilazione di un substrato citosolico. Si pensa si tratti di sistemi esclusivamente procariotici.

- 3. C. Trasportatori guidati da metiltransferasi.

Attualmente sono stati trovati solo in organismi Archaea, ed è stata ben caratterizzata solo una proteina che trasporta Na^+ , la metiltetraidrometanopterin o coenzima M metiltransferasi.

- 3.D. Trasportatori guidati da ossidoriduzioni.

Sono proteine ubiquitarie (pompe) in cui il trasporto del substrato, ad esempio uno ione, è garantito dal flusso di elettroni da un substrato o proteina ridotta, ad un substrato o proteina ossidata.

- 3. E. Trasportatori guidati dall'assorbimento della luce.

Sono proteine che espletano la loro funzione di trasporto, convertendo la luce assorbita, in energia cinetica. Si trovano nei procarioti, nei cloroplasti degli eucarioti, in alcuni funghi e in organismi Archaea.

- 4 .A. Traslocatori guidati dal trasferimento di un gruppo fosforico.

I sistemi batterici PTS (fosfotransferasi di zuccheri), appartengono a questa classe, mentre non si conoscono esempi in organismi eucariotici e Archaea. Il prodotto della reazione di trasporto è uno zucchero fosforilato citoplasmatico, derivante da uno zucchero extracellulare.

- 8. A. Proteine di trasporto ausiliarie.

Appartengono a questa classe, proteine che facilitano il trasporto attraverso le membrane, senza parteciparvi direttamente, in quanto complessate a trasportatori noti. Si tratta di molecole che stabilizzano i complessi multiproteici, che ne regolano l'assemblaggio ed il corretto funzionamento.

- 9. A. Trasportatori con meccanismo biochimico sconosciuto.

Sono stati inseriti in questa classe, tutti quei trasportatori per i quali non sono noti né il meccanismo di funzionamento, né la fonte energetica che consente il trasporto.

- 9. B. Proteine non ancora caratterizzate come trasportatori.

Appartengono a questa classe, famiglie di proteine per le quali è stata suggerita una funzione legata al trasporto di membrana, ma che sono ancora in attesa di essere caratterizzate come tali o, eventualmente, di essere eliminate dal sistema TC, laddove non si trattasse di trasportatori.

- 9. C. Proteine caratterizzate come trasportatori ma con sequenza sconosciuta.

È l'unica classe in cui le proteine non appartengono ancora ad una famiglia precisa poiché, non essendo stata ancora risolta la sequenza amminoacidica, non sono stati condotti studi filogenetici (Saier et al. 2000).

-1.5- LO STUDIO DEI SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana si è sviluppato successivamente rispetto allo studio delle proteine solubili (buona parte degli enzimi). La ragione di ciò è connessa alla difficoltà di maneggiare un sistema di trasporto che, al contrario degli enzimi, è una proteina integrale di membrana. E' infatti necessario affrontare due tipi di problemi: il primo è correlato alla presenza nella struttura della proteina 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 creare due compartimenti fra cui seguire il trasporto catalizzato dalla proteina. I primi studi sui sistemi di trasporto sono stati eseguiti in sistemi di membrane

native, come le cellule intatte oppure gli organelli subcellulari isolati, come i mitocondri. In questi casi i due compartimenti sono rappresentati dall'ambiente nativo intracellulare, o interno all'organello, e dall'ambiente esterno artificiale. In questo tipo di sperimentazione, il trasporto viene misurato mediante l'utilizzo di molecole marcate con radioisotopi o altri sistemi che permettono di evidenziare, con elevata sensibilità, il passaggio di molecole fra i due lati della membrana, un esempio è dato dalle sonde fluorescenti (Di Virgilio et al. 1989).

Il principale svantaggio di questo tipo di approccio sperimentale è dato dalle interferenze determinate dalla presenza di enzimi nei compartimenti interni, i quali possono modificare le molecole trasportate, nonché dalla presenza, sulle stesse membrane, di altri sistemi di trasporto e dalla possibilità di controllare le condizioni sperimentali soltanto nell'ambiente esterno (cis) ma non in quello interno (trans). Questo tipo di studi si è evoluto più recentemente grazie a tecniche di biologia molecolare che permettono l'espressione selettiva di una proteina di trasporto eterologa all'interno di particolari cellule, come per esempio gli oociti. La proteina espressa, se raggiunge la membrana, darà un segnale di trasporto caratteristico e riconoscibile rispetto alle cellule che non la esprimono. Questa tecnica permette di studiare una specifica proteina di cui è noto il gene, tuttavia, presenta le limitazioni tipiche dei sistemi cellulari intatti.

Una tecnica più recente per lo studio di sistemi di trasporto di membrana è la ricostituzione in membrane artificiali. La ricostituzione consiste nell'inserimento di proteine di trasporto in sistemi di membrana artificiali costituiti da bilayer fosfolipidici. I sistemi di membrana più largamente utilizzati a questo scopo sono i liposomi, vescicole sferiche il cui diametro varia fra 50 e 250 nm a seconda delle tecniche usate per la preparazione.

Le proteine di trasporto vengono inserite nel bilayer fosfolipidico, formando i proteoliposomi, con varie strategie che prevedono, ad esempio, l'eliminazione del detergente utilizzato per la solubilizzazione della proteina dalle membrane cellulari, oppure il Freeze-Thaw-Sonication, congelamento rapido, scongelamento lento e sonicazione (Kramer et al 1986; Palmieri

et al 1995). Fra le tecniche basate sulla rimozione del detergente ricordiamo la diluizione, la dialisi, l'adsorbimento su particolari resine idrofobiche. Il trasporto viene, quindi, seguito nei proteoliposomi, analogamente a quanto detto per i sistemi cellulari, utilizzando molecole marcate con radioisotopi o sonde fluorescenti. Nei proteoliposomi è possibile studiare il trasporto in assenza di interferenze che, nel mitocondrio intatto o nelle cellule, sono causate dalla presenza di altri sistemi di trasporto, da enzimi che metabolizzano, o in generale, modificano i substrati, e da interazioni tra i sistemi di trasporto ed altre proteine. I vantaggi che il sistema ricostituito presenta sono numerosi.

Ad esempio, utilizzando il metodo della ricostituzione, si ha la possibilità di controllare le condizioni sperimentali nel compartimento interno dei proteoliposomi, ciò consente di determinare l'affinità della porzione intra-liposomiale della proteina per il substrato; è possibile inoltre studiare l'effetto di varie molecole su entrambi i lati dei proteoliposomi oltre che studiare il tempo di raggiungimento dell'equilibrio da parte delle molecole radioattive. Il basso rapporto proteina/lipidi (una o poche proteine per liposoma), permette una migliore risoluzione della cinetica del trasporto.

Attraverso l'utilizzo di questa tecnica è anche possibile modificare la composizione lipidica della membrana dei liposomi che in molti casi influenza l'attività di trasporto delle proteine (Sharom 1997). 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 (Indiveri et al. 1998) (quali *E. coli*) o nei lieviti (Kasahara et al 1996).

-1.6- APPROCCIO BIOINFORMATICO NELLO STUDIO DEI SISTEMI DI TRASPORTO

Il numero delle proteine di trasporto presenti nei sistemi cellulari, sia procariotici che eucariotici, è in continuo aggiornamento in seguito al completamento di un numero sempre maggiore di progetti genoma, fra cui quello umano. Il sequenziamento dei genomi ha rivelato che i

sistemi di trasporto in un organismo sono più numerosi di quanto si fosse ipotizzato. Fino a non molto tempo fa, si riteneva che, piccole molecole quali l'acqua o l'urea entrassero o effluissero dalle cellule mediante diffusione passiva. L'identificazione di specifici geni ha rivelato che esistono sistemi, come quello dell'aquaporina, che permettono il passaggio dell'acqua attraverso le membrane ad una velocità sufficiente per soddisfare le esigenze vitali delle cellule. Dall'analisi dei genomi, mediante approcci bioinformatici, si può notare che in *Homo sapiens* vi è un numero di sistemi di trasporto pari a 1022 di cui: 139 ATP dipendenti, 391 canali ionici, 447 trasportatori secondari e 40 sistemi non classificati. In *Arabidopsis thaliana* vi sono 1210 sistemi di trasporto di cui: 240 ATP dipendenti, 149 canali, 769 trasportatori secondari e 54 sistemi non classificati. In *Saccharomyces cerevisiae* vi sono circa 318 proteine responsabili del trasporto di substrati: 70 sistemi ATP dipendenti, 20 canali, 225 trasportatori secondari e 1 sistema non classificato. In un batterio come *Escherichia coli* ci sono circa 383 sistemi di trasporto: 33 fosfotransferasi, 241 trasportatori secondari, 14 canali, 90 sistemi ATP dipendenti e 2 sistemi non classificati (www.membranetransport.org). Questi dati indicano che la comunicazione cellulare è molto più rilevante di quanto si credesse in passato. Ciò ha dato un notevole stimolo ad affrontare lo studio dei sistemi di trasporto di membrana.

-1.7- ESPRESSIONE ETEROLOGA DI SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA

Lo studio dei sistemi di trasporto di membrana è limitato dalla necessità di ottenere membrane native in cui studiare il trasporto o di estrarre le proteine dalle membrane native per ricostituire in sistemi artificiali. Il limite principale di tali tecniche sperimentali è costituito, principalmente, 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, inoltre, nei casi in cui si vogliono intraprendere studi di tipo strutturale; in tali condizioni, è necessario

disporre di grandi quantità di proteina purificata. Questi problemi potrebbero essere risolti ricorrendo all'espressione delle proteine in sistemi cellulari di vario tipo.

L'espressione eterologa in batteri consente di ottenere quantità di proteine molto più grandi rispetto all'espressione in sistemi cellulari eucariotici, quali oociti e lieviti.

Nel caso dei sistemi eucariotici sono stati ottenuti livelli di espressione di proteine di membrana plasmatica appena sufficienti per studiare il trasporto negli stessi sistemi cellulari in grado di trasferire le proteine espresse in membrana plasmatica (Hruz et al 2000; Rogers et al 2003; Hosoyamada et al 2004). In questi casi l'attività di trasporto viene quantificata per sottrazione rispetto a quella misurata nelle cellule di controllo che non esprimono le specifiche proteine.

Ovviamente tali metodi non sono esenti da errori dovuti ad interferenze da parte di altri trasportatori, o ad eventuali modifiche nel pattern proteico dei trasportatori endogeni di membrana, che potrebbe essere alterato dall'induzione dell'espressione eterologa. Inoltre questi sistemi di espressione non consentono di ottenere proteine in quantità sufficienti per studi di tipo strutturale.

Risulta evidente, quindi, l'importanza della messa a punto di protocolli di espressione eterologa di trasportatori eucariotici, in batteri. Sistemi di questo tipo sono stati realizzati per l'espressione di proteine di trasporto mitocondriali. Invece vi sono pochissimi esempi di espressione in batteri di sistemi eucariotici di membrana plasmatica. Un esempio è l'over-espressione del co-trasportatore umano Na⁺/glucosio (hSGLT1) (Quick et al. 2003) e del trasportatore umano OCTN1 (Galluccio et al 2009).

Il sistema cellulare d'elezione è rappresentato da *E. coli*, in cui è possibile ottenere grandi quantità di proteina generalmente a basso costo ed in tempi brevi.

L'espressione di proteine di membrana resta, tuttavia, problematico a causa della loro possibile tossicità per il batterio e dal fatto che si tratta di proteine insolubili e che vengono, quindi, accumulate nei batteri come corpi di inclusione. *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. In letteratura, tuttavia, è mostrato come la glicosilazione sia importante ma non indispensabile per il pieno svolgimento dell'attività di trasporto delle proteine di membrana (Tanaka et al 2004; Diop et al 2005; Straumann et al 2006; Hayashi et al 2005; Asano et al 1991; Nunez et al 1994; Li et al 2004; Cai et al 2005).

Pertanto, l'over- espressione in *E. coli* resta il principale approccio sperimentale in grado di fornire, rispetto ai sistemi cellulari eucariotici, quantità di proteina sensibilmente superiori; consente, inoltre, di condurre studi di mutagenesi sito diretta, valutando l'importanza e la funzione di specifici residui amminoacidici nel processo di trasporto o la loro collocazione nella struttura tridimensionale della proteina.

-1.8- RELAZIONE FRA SISTEMI DI TRASPORTO DI MEMBRANA E PATOLOGIE UMANE

La dimostrazione dell'essenzialità dei sistemi di trasporto per la vita della cellula e, quindi di un intero organismo, è data in maniera inequivocabile dall'identificazione di patologie genetiche o acquisite, spesso gravi o addirittura incompatibili con la vita, causate da deficienze della funzione dei sistemi di trasporto. Ad esempio, a livello intestinale e renale sono presenti dei sistemi di trasporto di amminoacidi, con ampia specificità di substrato. Mutazioni a carico dei geni codificanti per tali trasportatori sono causa di patologie che vanno sotto il nome di amminoacidurie renali ed intestinali. Si conoscono dieci difetti nel trasporto degli amminoacidi: cinque di essi (cistinuria, malattia di Hartnup, imminoglicinuria, dibasicoaminoaciduria, dicarbossilicoamminoaciduria) mostrano difetti legati al trasporto di amminoacidi strutturalmente correlati e implicano l'esistenza di trasportatori specifici per gruppi di substrati; i restanti cinque (ipercistinuria, lisinuria, Istidinuria, malassorbimento di metionina, malassorbimento di triptofano) interessano il trasporto di un singolo amminoacido e implicano l'esistenza di sistemi di trasporto substrato-specifici (Palacin et al 2005). Un altro esempio di patologie gravi, legate ai sistemi di trasporto, è dato da alterazioni del canale del Cl⁻ regolato dall'AMP ciclico, una mutazione del gene che codifica per questa proteina (CFTR)

è responsabile dell'insorgenza della fibrosi cistica. Questi canali per il Cl^- sono presenti nelle membrane plasmatiche apicali delle cellule epiteliali di polmoni, ghiandole sudoripare, pancreas ed altri tessuti. Un aumento della concentrazione di cAMP stimola il trasporto di ioni Cl^- da parte di queste cellule negli individui normali, ma non negli individui affetti da fibrosi cistica che hanno una proteina CFTR difettosa.

Esistono, inoltre, una serie di patologie associate ad alterazioni dei geni codificanti per i trasportatori e gli enzimi del sistema delle carnitine, implicato nell'omeostasi corporea di questa molecola quali, ad esempio, la deficienza sistemica di carnitina. Quest'ultima può essere classificata in primaria e secondaria. Si tratta di due disordini sistemici causati da specifiche mutazioni a carico dei geni codificanti per il trasportatore di membrana plasmatica (OCTN2) (Wang et al 1998; Wang et al 1999) e per la traslocasi mitocondriale (Huizing et al 1997). Nel caso della deficienza di carnitina primaria, numerose sono le mutazioni identificate responsabili di questa patologia (Lahjouji et al 2001). Alcune di queste, comprendono mutazioni di senso che hanno differenti fenotipi: totale perdita di uptake di carnitina oppure semplice riduzione del trasporto. La prima categoria è associata, principalmente, ad encefalopatia e problemi respiratori causati da cardiomiopatia (R169W, G242V, R169Q); la seconda è invece caratterizzata dall'insorgenza del diabete e della lipidemia (S467C), ipoglicemia ipochetotica, coma (A301D).

Altre mutazioni (non senso) portano ad una riduzione dei livelli di mRNA maturo, motivo per cui si hanno trasportatori non funzionali; la sintomatologia che accompagna queste mutazioni è caratterizzata da ipoglicemia, miopatia, debolezza muscolare. In generale, la limitata capacità di ossidare gli acidi grassi, conseguenza di un'alterazione a carico del trasportatore, soprattutto durante un periodo di digiuno, determina effetti negativi sulle funzioni muscolari e cardiache. In genere, nella deficienza primaria, la sintomatologia è parzialmente controllabile previa assunzione di carnitina. Per quanto riguarda la deficienza secondaria, si tratta di una condizione patologica associata ad alterazioni a carico del trasportatore mitocondriale (CACT). In questo caso viene ad

essere alterata o interrotta la β -ossidazione mitocondriale, con conseguente drastica riduzione della produzione di energia metabolica, soprattutto nei muscoli. La deficienza secondaria è quindi generalmente letale, per cui è molto più rara rispetto a quella primaria (Tein 2003; Longo et al 2006).

Alcune forme di deficienza sistemica di carnitina sono di origine iatrogena, causate dall'interazione di farmaci con i trasportatori o con gli enzimi che regolano il metabolismo della carnitina. Tra questi sono clinicamente rilevanti alcuni antibiotici quali l'emetina e l'acido pivalico e un anticonvulsivo, l'acido valproico. L'uso prolungato di tali farmaci, soprattutto nei bambini, può condurre all'insorgenza di un deficit secondario di carnitina.

-1. 9- IL SISTEMA DELLA CARNITINA E SUA OMEOSTASI

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) (Ramsay et al. 2001; Reda et al. 2003; Foster 2004; Longo et al 2006). L'azione della carnitina è sicuramente indispensabile per una serie di processi fisiologici noti:

- Regolazione delle riserve intracellulari di CoA e di acil- CoA e modulazione del rapporto tra queste due molecole in citosol, mitocondri, reticolo endoplasmatico e perossisomi (Ramsay et al. 2001; Biber 1988; Vaz et al 2002; Stephens et al. 2007);
- β -ossidazione in mitocondri (Ramsay et al 2001, Bremer 1983; Indiveri et al 1990; Peluso et al 2000) e perossisomi (Westin et al 2008);

- La riesterificazione del triacilglicerolo nel reticolo endoplasmico prima della secrezione sottoforma di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) (Gooding et al 2004; Tonazzi et al 2006);
- Il trasferimento di acetili o altri gruppi acilici a catena corta dai mitocondri durante il metabolismo glucidico (Bremer 1983; Peluso et al 2000; Indiveri et al 1991 a, b, Eaton et al 2002);
- Il processo di detossificazione da metaboliti di scarto, da residui acilici tossici, da farmaci (è il caso ad esempio dell'acido valproico, eliminato a livello del tubulo prossimale renale sottoforma di valproilcarnitina (Vaz et al 2002; Brass 2002, Pochini et al 2004; Ohnishi et al 2008).

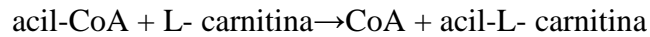
L'espletamento di queste funzioni richiede che la carnitina sia presente nei diversi distretti cellulari mantenendo precise concentrazioni; nei mammiferi l'omeostasi della carnitina risulta dal bilancio tra sintesi endogena, assorbimento intestinale con la dieta, distribuzione ai tessuti, escrezione e riassorbimento renale (Longo et al 2006; Vaz et al 2002; Tamai et al 2000; Rebouche et al 2004). L'omeostasi della carnitina è garantita dalla presenza di una complessa rete di enzimi e di proteine di trasporto che, lavorando sinergicamente, garantiscono l'ingresso della carnitina nel citosol, la sua distribuzione ai diversi distretti cellulari, il suo metabolismo ed efflusso. La dimostrazione che la concentrazione di carnitina è finemente regolata risiede nell'osservazione che la somministrazione esogena non ne induce un significativo aumento, se non contemporaneamente all'insulina. La concentrazione di carnitina nel corpo sembra essere correlata, inoltre, con la prevalenza del metabolismo lipidico o di quello glucidico nelle cellule in diverse condizioni sia fisiologiche che patologiche (ischemia e cancro) (Calvani et al 2000; Simkhovich et al 1988; Dambrova et al 2002). La β -ossidazione nei mitocondri, per esempio, rifornisce l'intero organismo di energia solo in presenza di adeguate concentrazioni di ossigeno, mentre il metabolismo glucidico, seppur con minore efficienza, avviene anche quando la concentrazione di ossigeno è bassa,

convertendo il glucosio in lattato. È interessante notare, infatti, che le cellule tumorali dipendono principalmente dal metabolismo glucidico anaerobio, anche in presenza di un apporto di ossigeno normale (fenomeno noto come “Warburg effect”). Tale fenomeno è legato all’incremento della via metabolica della glutamminolisi che consente l’entrata della glutammina nel ciclo dell’acido citrico come α -chetoglutarato; quest’ultimo viene convertito in malato e poi trasferito nel citosol mediante lo shuttle malato- aspartato. Il malato diventa substrato della malato deidrogenasi producendo piruvato e, quindi, lattato. Attraverso questa forma tronca del ciclo dell’acido citrico viene prodotto, nelle cellule cancerose, ATP in maniera anaerobica e rigenerato NADPH necessario per la biosintesi di acidi grassi e di colesterolo (Ganapathy et al 2009). Un aumento della concentrazione di carnitina facilita la produzione di energia metabolica dall’ossidazione dei gruppi acilici e viceversa una sua diminuzione potrebbe favorire il metabolismo del glucosio (Peluso et al 2000; Calvani et al 2000).

L’importanza fisiologica della carnitina è strettamente correlata al Coenzima A (CoA) e agli acili del CoA, la cui disponibilità, nei diversi organelli intracellulari, è necessaria per lo svolgimento di molte funzioni: gli acil-CoA a catena medio-lunga sono indispensabili nei mitocondri per la β -ossidazione, per fornire energia metabolica nei tessuti muscolari in particolare; acil-CoA a catena corta sono necessari nel nucleo per l’acetilazione degli istoni; acil-CoA a catena molto lunga vengono ossidati nei perossisomi ed, infine, gli acil-CoA nel reticolo endoplasmico servono per la sintesi delle VLDL.

Gli enzimi responsabili della sintesi degli acil-CoA sono delle sintetasi ATP- dipendenti localizzate prevalentemente nel citosol. Il paradosso del CoA cellulare è che non può attraversare fisicamente le membrane cellulari, in quanto la sua concentrazione all’interno di ogni compartimento deve essere mantenuta costante. Tale problema viene risolto spostando temporaneamente i gruppi acilici dal CoA ad una molecola navetta, la carnitina, formando acil-

carnitina, secondo la seguente reazione catalizzata da una classe di specifici isoenzimi, denominati Carnitina- Acil Transferasi (CAT):



Tale composto temporaneo può muoversi ed attraversare le membrane; quindi i gruppi acilici sono nuovamente trasferiti al CoA presente nel compartimento di arrivo. L'omeostasi della carnitina è, tuttavia, un processo molto più complesso del semplice mantenimento della sua concentrazione costante; quest'ultima, infatti, varia a seconda dei differenti tessuti. Nel plasma, infatti, raggiunge valori di 40-90 μM : nel muscolo scheletrico è circa 50 volte quella plasmatica e nei testicoli, dove raggiunge il valore massimo, è 2000 volte più alta rispetto al plasma (Brass 2002; Brass et al 2004). Risulta evidente, dunque, l'importanza rivestita dai sistemi di trasporto della carnitina. Tra questi, particolarmente, quelli di membrana plasmatica renali ed intestinali: è qui, infatti, che viene regolato l'assorbimento e l'escrezione od il riassorbimento di tale molecola. Un ruolo secondario è quello svolto dai trasportatori di membrana degli organelli cellulari (mitocondri, perossisomi e reticolo endoplasmico). L'importanza di questi trasportatori è proporzionale al volume di tali organelli rispetto al volume intracellulare.

-1.10- IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEI MITOCONDRI

Il sistema della carnitina mitocondriale è costituito dal carrier della carnitina e dalle transferasi CPT I e II (carnitina palmitoiltransferasi I e II), rispettivamente localizzate sul lato interno della membrana mitocondriale esterna (spazio intermembrana) e sul lato interno della membrana mitocondriale interna (matrice).

Nell'ambito di questo sistema è noto il carrier mitocondriale che, diversamente dai trasportatori di carnitina di membrana plasmatica, è stato ampiamente studiato e caratterizzato sia in

mitocondri intatti che in sistemi ricostituiti (Indiveri et al 1989, 1990, 1991a, b, 1995, 1997, 1998, 2002).

Il carrier mitocondriale della carnitina (CACT) 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. Il trasportatore è cineticamente asimmetrico: la K_m per la carnitina nel versante citosolico è 1 mM, mentre quella sul versante intra- mitocondriale (matrice) è 10 mM.

Quest'ultima è più alta della concentrazione media di carnitina all'interno del mitocondrio, normalmente in equilibrio con quella citosolica. Il trasporto di carnitina dalla matrice mitocondriale al citosol è, dunque, la tappa limitante per la traslocazione degli acili e, quindi, di tutto il processo della β - ossidazione. Il trasporto è inibito da reagenti dei gruppi sulfidrilici (-SH), come mersalyl ed N-etilmaleimmide, e da analoghi del substrato come le sulfobetaine. Il trasporto è, inoltre, influenzato dalla presenza, nelle sistema ricostituito, di cardiolipina, un fosfolipidi costitutivamente presente nella membrana mitocondriale interna (Noel 1986; Indiveri 1990; 1998). Tale sistema di trasporto è in grado di interagire con diversi composti farmacologici, quali mildronato (Oppedisano et al 2008) ed antibiotici β -lattamici (Pochini et al 2008). L'interazione con il mildronato, analizzata nel sistema dei proteoliposomi, risulta essere di tipo covalente suggerendo che avviene direttamente con il sito di legame per la carnitina; la K_m è, infatti, di 0.53 mM, molto simile a quella del trasportatore per la carnitina (Indiveri et al 1994). Diversa è invece quella sul versante interno suggerendo che il mildronato può essere anche trasportato ma solo dall'esterno all'interno del mitocondrio in scambio con carnitina intra- mitocondriale, causando una deplezione di tale molecola e, quindi, una diminuzione della β -ossidazione con possibile cambiamento del metabolismo cellulare da lipidico a glucidico. Queste osservazioni possono spiegare gli effetti

collaterali (cardiomiopatia e statosi) causati dalla somministrazione di mildronato (Spaniol et al 2003; Zaugg et al 2003). Per quanto riguarda gli anticorpi β -lattamici, le interazioni osservate hanno permesso di raggiungere delle conclusioni rispetto alle relazioni esistenti tra struttura del composto e tipo di inibizione osservata.

Nel caso specifico del trasportatore mitocondriale della carnitina sono stati descritti due meccanismi inibitori, uno competitivo determinato da interazioni reversibili ed uno irreversibile dovuto alla formazione di legami covalenti tra il composto analizzato e residui di cisteina presenti nel trasportatore.

-1.11- IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEL RETICOLO ENDOPLASMICO

Il reticolo endoplasmatico è una rete di membrane e cisterne che si estende dalla membrana nucleare attraverso il citoplasma (Palade 1956). Nell'ER avvengono tutti i processi di biosintesi dei lipidi cellulari e delle proteine. Il trasporto attraverso la membrana dell'ER può riguardare import/export di proteine o metaboliti. Il trafficking delle proteine (processo di maturazione ed inserimento delle proteine nella membrana) è stato ampiamente descritto; per quanto riguarda il trasporto di metaboliti, invece, poco è noto (Rapoport et al 1996).

L'importanza del trasporto di carnitina nell'ER è collegata ai processi metabolici che richiedono gli acil-CoA citosolici. Tra gli enzimi che richiedono tali tioesteri vanno annoverati: una transferasi orientata verso la porzione intraluminale coinvolta nella sintesi di triacilglicerolo per la produzione delle VLDL; una aciltransferasi interna acil-CoA- colesterolo coinvolta nel metabolismo del colesterolo; una carnitina acetiltransferasi ed una carnitina palmitoiltransferasi interne necessarie per l'acetilazione di composti intraluminari, l'allungamento di acidi grassi ed altre funzioni importanti (Gooding et al 2005; Gibbons et al 1992, Yang et al 1995; Broadway et al 1999; Gibbons et al 2000). Così, come in altri organelli, la carnitina del reticolo endoplasmatico, può anche svolgere un'importante funzione nel trasferimento di metaboliti fra il reticolo endoplasmatico

ed il citosol. Tuttavia, solo di recente, è stata proposta l'esistenza di un sistema di trasporto per la carnitina (ERCT) sulla base di studi eseguiti con microsomi intatti (Gooding et al 2004). La dimostrazione definitiva che si tratta di un trasporto mediato da proteina è stata data dalla ricostituzione del trasportatore nel sistema di membrane artificiali dei liposomi (Tonazzi et al 2006).

Questo approccio permette, anche, l'ulteriore caratterizzazione del sistema di trasporto di membrana a livello funzionale e rappresenta una metodologia per esaminare l'attività di trasporto nelle frazioni di proteina purificata per studi molecolari. Le proprietà funzionali descritte per tale trasportatore sono differenti da quelle del trasportatore mitocondriale, in quanto ERCT presenta caratteristiche più simili a quelle di un poro (Indiveri et al 1991b; Pochini et al 2004). Gli studi condotti sul trasportatore ricostituito hanno permesso di determinare che esso catalizza una reazione di uniport di primo ordine inibita da HgCl_2 (van Iwaarden et al 1992) (mediante l'interazione con i gruppi SH) e PLD e DIDS (mediante interazione con i residui di lisina presenti nel trasportatore) (Tonazzi et al 2005). Il trasportatore ricostituito, inoltre, catalizza un efflusso di carnitina dai proteoliposomi stimolato dalla presenza, nel compartimento esterno, di acilcarnitine a lunga catena. La K_m del trasportatore per la carnitina presente sul lato esterno è circa 10.9 mM (Ramsay 1994).

-1.12- IL TRASPORTATORE DELLA CARNITINA DEI PEROSSISOMI

I perossisomi contengono almeno 50 differenti enzimi che sono implicati in una pleora di vie metaboliche, particolarmente in reazioni ossidative. Differentemente dai mitocondri, tuttavia, i perossisomi non possono ridurre completamente gli acidi grassi fino ad unità singole di acetil- CoA, ma semplicemente accorciarli. Poiché anche la membrana dei perossisomi è selettivamente permeabile ai soluti, è necessario che siano presenti diversi sistemi di trasporto. È stata dimostrata la presenza di una transferasi per la carnitina responsabile del trasporto degli acil- CoA parzialmente ossidati dall'interno del perossisoma al citosol per la conseguente ossidazione nel mitocondrio. Le caratteristiche del traslocatore di acilcarnitina perossisomale devono essere ancora

ulteriormente investigate, ma si può supporre che tale trasportatore dovrebbe catalizzare un antiport tra acil-carnitina e carnitina (Weibel et al 1969).

-1.13- LA FAMIGLIA OCTN (SLC22A): TRASPORTATORI DELLA CARNITINA DI MEMBRANA PLASMATICA

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 (Tamai et al 1997, 1998, 2000). Queste traslocasi svolgono un ruolo molto importante nel mantenimento dell'omeostasi della carnitina nell'organismo. Il pool cellulare di carnitina è solo in parte dovuto alla sintesi endogena della molecola, che avviene nel fegato e non è sufficiente al fabbisogno dell'organismo (Bieber et al 1988; Ramsay et al 2001; Vaz et al 2002). Una quota significativa di carnitina proviene, quindi, dall'alimentazione: i processi di assorbimento e riassorbimento sono catalizzati nelle cellule intestinali e renali da specifici trasportatori; la distribuzione della carnitina ai vari tessuti è mediata dagli stessi trasportatori presenti nelle membrane di quasi tutte le cellule. Questi sistemi di trasporto sono, inoltre, coinvolti nel processo di escrezione; nel lume del tubulo renale, infatti, la carnitina può essere escreta come tale o essere utilizzata come vettore di eliminazione di molecole di scarto sottoforma di acilderivati. Ogni isoforma OCTN è responsabile dello svolgimento di una specifica funzione, come suggerisce la diversa localizzazione che le tre isoforme hanno nei tessuti. Metodi immunoistochimici hanno rivelato che OCTN1 e 2 sono massimamente espressi nel rene, OCTN3 è soprattutto espresso a livello testicolare (Tamai et al 2000; Lahjouji et al 2001; Wu et al 1999).

Finora, studi funzionali sui sistemi di trasporto OCTN sono stati realizzati in vescicole di brush border, in sistemi cellulari che over-esprimono la proteina (Tamai et al 1998; Tamai et al 2000; Wu et al 1999; Lahjouji et al 2002; Tamai et al 2001; Ohashi et al 1999; Stieger et al 1995; Friedrich et al 2003; Ohashi et al 2001). e nel sistema di membrane artificiali dei proteoliposomi

(Pochini et al 2004). È stato proposto che la proteina OCTN1 sia in grado di trasportare tetraetilammonio (TEA) e, con minore affinità, carnitina (Tamai et al 1997). Il trasporto di carnitina catalizzato da OCTN1 sembra essere Na^+ dipendente, mentre quello di TEA Na^+ indipendente. In realtà studi più recenti mostrerebbero che la sua funzione principale sia quella di assorbire ergotienina, non carnitina, dalla dieta (Grundemann et al 2005; Grigat et al 2007; Nakamura et al 2008; Tahara et al 2009).

I dati presenti in letteratura rispetto ad OCTN3 riguardano principalmente l'isoforma murina (Tamai et al 2000), che sarebbe responsabile del trasporto Na^+ indipendente di carnitina, principalmente nei testicoli (Tamai et al 2000, Duran et al 2005, Kobayashi et al 2007, Alnouti et al 2006). Per quanto riguarda l'isoforma umana non è stato ancora identificato il cDNA ma l'espressione della proteina è stata verificata nello sperma. La localizzazione sub-cellulare resta, tuttavia, ancora poco definita (Xuan et al 2003, Kobayashi et al 2007): alcuni autori riportano la presenza di OCTN3 nella membrana plasmatica, altri nella membrana basolaterale dell'intestino e nella membrana di brush- border delle cellule renali (Tamai et al 2000, Duran et al 2005, Kobayashi et al 2007). Esistono, infine, dati riguardanti la localizzazione nei perossisomi (Xuan et al 2003; Lamhonwah et al 2003, 2005, 2008).

Il ruolo fisiologico di OCTN3 sembra essere correlato all'importanza della carnitina per lo sviluppo e la maturazione degli spermatozoi (nei testicoli infatti è presente una concentrazione di carnitina 2000 volte maggiore di quella plasmatica) (Xuan et al 2003; Kobayashi et al 2007; Alnouti et al 2006; Enomoto et al 2002; Jeulin et al 1996).

Questo, tuttavia, sembra essere in contrasto con il meccanismo di trasporto Na^+ indipendente che non permetterebbe un accumulo di carnitina contro gradiente di concentrazione. È stato proposto, quindi, che l'elevata concentrazione di carnitina nei testicoli è garantita da altri trasportatori, quali OCTN2 (Tamai et al 2000), mentre OCTN3 potrebbe giocare un ruolo nel mediare il flusso della carnitina dalle cellule intestinali al sangue.

Sono stati descritti, inoltre, i parametri cinetici per OCTN3: la Km per la carnitina è compresa in un range tra 3 e 26 μM (Tamai et al 2000; Xuan et al 2003; Lamhonwah et al 2003; Kobayashi et al 2007) ed il trasporto della stessa sembra essere inibito da alcuni suoi derivati (acil-carnitina).

-1.14- IL SISTEMA DI TRASPORTO DI MEMBRANA PLASMATICA OCTN2

Il trasportatore OCTN2 è stato identificato per la prima volta in HEK293 trasfettate con il cDNA umano codificante per OCTN2 (Tamai et al 1998). Il gene OCTN2 localizzato sul cromosoma 5q31 (sintenco con il cromosoma 11 murino) è costituito da 10 esoni da cui origina un trascritto di 3.5 Kb a cui corrisponde un prodotto proteico costituito da 557 amminoacidi. Tale trasportatore condivide il 75,8% di omologia con OCTN1 e presenta 12 probabili domini transmembrana come risulta dallo studio del suo profilo idropatico. Di questi 12 segmenti transmembrana gli ultimi due, compresi tra il residuo in posizione 450 e l'estremità carbossi-terminale, 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 specifica 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, nonché una firma molecolare di omologia a proteine di trasporto di zuccheri ed un dominio di legame ATP/GTP.

L'espressione di OCTN2 è stata valutata in differenti tessuti mediante northern blotting, ibridizzazione in situ, western blotting e real time PCR quantitativa. Il livello di espressione più alto è stato trovato in reni, fegato e muscolo scheletrico. (Ohashi et al 1999; Seth et al 1999; Wu et al

1999; Tamai et al 2000; Wagner et al 2000; Wang et al 2000;). Gli studi condotti sui sistemi cellulari hanno mostrato che OCTN2 trasporta principalmente carnitina con valori di K_m che vanno da 8 a 87 μM ; i valori di V_{max} sono ancora più variabili a causa, presumibilmente, delle interferenze dovute alla presenza di altri trasportatori. È stato dimostrato che OCTN2 può trasportare anche TEA (Tamai et al 2000), sebbene con minore affinità rispetto a quella per la carnitina; in particolare, sembra che esistano due siti per l'interazione con il TEA con diversa affinità tra loro. Studi di inibizione reciproca tra TEA e carnitina hanno condotto all'osservazione che entrambi legano lo stesso sito o, al massimo, due siti diversi tra loro ma molto vicini (Seth et al 1999; Wu et al 1999; Tamai et al 2000). 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.

Anche nel sistema ricostituito OCTN2 mostra le stesse caratteristiche di quelle identificate direttamente nelle cellule (Pochini et al 2004). Il meccanismo di trasporto è, infatti, un cotrasporto di carnitina e Na^+ in scambio con carnitina o derivati della carnitina, spiegando il fenomeno della trans- stimolazione osservato nei sistemi cellulari intatti. Il Na^+ intraliposomale inibisce il trasporto indicando una precisa specificità nell'attivazione della reazione vettoriale; inoltre, grazie al sistema ricostituito, sono state descritte le caratteristiche chimiche delle molecole che interagiscono o che vengono trasportate da OCTN2: presenza di un gruppo carbossilico (infatti la colina non viene trasportata) e presenza di un gruppo amminico trisostituito dall'altro lato della molecola. La distanza tra questi due gruppi principali deve essere almeno di cinque atomi di carbonio; infine la presenza di un gruppo acilico esterificato con il gruppo β -idrossilico della carnitina consente al composto di interesse di interagire con OCTN2 senza alcun problema.

Ottimizzando il sistema della ricostituzione di OCTN2, è stato possibile ottenere ulteriori informazioni sull'attività del trasportatore, quali ad esempio la dipendenza dell'attività di trasporto

dal pH. Il sistema OCTN2 mostra un optimum di attività quando il pH raggiunge valori tra 5.5 e 6; questo è in linea con le condizioni fisiologiche del contesto renale da cui è estratto per la ricostituzione (Pochini et al 2004). Relativamente allo studio della Km esterna, l'impiego della ricostituzione in liposomi ha permesso di ottenere valori simili o più alti rispetto a quelli ricavati mediante esperimenti su vescicole di brush-border, simili a quelli ottenuti per OCTN2 overespresso, e più alti rispetto ai valori ottenuti da OCTN2 espresso in differenti tipi cellulari.

Il valore della Km interna, calcolato nei proteoliposomi, risulta essere di circa un ordine di grandezza più alto rispetto alla Km esterna mostrando una asimmetria funzionale in accordo con la presenza di un solo sito di legame per gli ioni sodio sul versante esterno del trasportatore. Ciò conferma che l'orientamento della proteina nei proteoliposomi è quello che si riscontra sulla membrana delle cellule renali. Tale asimmetria è confermata anche dall'impiego di molecole ad azione inibitrice quali reagenti tiolici, MTSES, MTSET e p-CMBS, che sono stati aggiunti all'esterno della membrana del liposoma. Infatti, l'inibizione può essere esercitata soltanto se questi reagenti interagiscono con i quattro residui di cisteina localizzati sulla porzione esterna della proteina; gli altri tre residui sono invece presenti nei segmenti transmembrana e quindi sono non accessibili da tali reagenti tiolici aggiunti all'esterno dei proteoliposomi.

Tutti questi dati confermano il ruolo fisiologico del trasportatore: esso risulta infatti implicato nel riassorbimento della carnitina dall'ultrafiltrato renale, la quale viene trasportata in scambio con prodotti che devono invece essere escreti attraverso le urine (Ramsay et al 2001; Reda et al 2003; Foster et al 2004; Longo et al 2006; Bieber 1988; Vaz et al 2002).

Il sistema di scambio accoppiato al co- trasporto di Na⁺ permette di evitare lo sbilancio osmotico che ci sarebbe nel caso del solo co- trasporto di carnitina e Na⁺. È stata descritta, recentemente, l'esistenza di 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 (Maekawa et al 2007).

Per quanto riguarda la regolazione dell'espressione e della funzione di OCTN2, poche sono le informazioni presenti in letteratura: è stato dimostrato che la proteina PDZK1 stimola l'attività di trasporto mediante diretta interazione con la porzione C-terminale di OCTN2 (Sugiura et al 2008; Kato et al 2005). La cartregulina, una proteina omologa di OCTN2, ma non in grado di effettuare la stessa attività vettoriale, sembra essere responsabile dell'attivazione della trascrizione di tale trasportatore (Nagai et al 2006 a,b).

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 (Weng et al 2010). L'incremento della stessa carnitina nel mezzo di coltura sembrerebbe attivare la trascrizione del trasportatore OCTN2. Si tratta, ovviamente, di dati preliminari ma che rappresentano un punto iniziale nella comprensione del ruolo svolto dalla carnitina nella regolazione dell'espressione dei sistemi di trasporto responsabili dell'omeostasi di tale molecola. In alcune cellule tumorali murine, infine, che mostrano una down-regolazione di OCTN2, la presenza di carnitina nel loro mezzo di coltura induce un incremento della mortalità cellulare dovuta ad apoptosi (Fan et al 2009).

-1.15- OCTN2 ED INTERAZIONE CON FARMACI

Molti autori hanno riportato l'interazione di OCTN2 con farmaci e xenobiotici, alcuni dei quali vengono anche trasportati da tale molecola. I composti testati sono molto diversi tra di loro a testimonianza dell'ampio spettro di molecole che possono essere riconosciute dal sito di legame di OCTN2. Tra i farmaci testati nei diversi modelli sperimentali sono da ricordare i farmaci cardiovascolari, gli antibiotici, gli antivirali, gli antipsicotici, gli antitumorali e gli analoghi della carnitina.

L'interazione dei farmaci cardiovascolari quali verapamil, mildronato e spironolattone, con OCTN2 è stata ampiamente documentata in cellule trasfettate con il cDNA codificante per tale

trasportatore. In tale modello sperimentale è stato descritto come verapamil e spironolattone esercitino un'inibizione mista, mentre il mildronato un'inibizione competitiva (Grube et al 2006).

È stato mostrato, inoltre, che l'antipsicotico sulpiride interagisca e venga trasportato da OCTN2 nelle cellule intestinali umane, Caco-2 (Watanabe et al 2002).

Oociti trasfettati con hOCTN2 mostrano trasporto di imatinib (Hu et al 2008), mentre molti antibiotici β -lattamici inibiscono il trasporto di carnitina catalizzato da OCTN2 (Kano et al 2009).

Misurazioni effettuate con HPLC hanno mostrato che molti di tali composti sono anche trasportati da OCTN2, spiegando alcuni degli effetti collaterali dovuti a tali farmaci, assimilabili alla deficienza di carnitina. Tali studi hanno fornito una vasta panoramica sulle molecole in grado di interagire con OCTN2 sebbene esistano molte discrepanze tra i dati riportati dai differenti gruppi dovute, probabilmente, ai diversi modelli sperimentali utilizzati. I meccanismi inibitori, inoltre, non sono stati completamente chiariti a causa dell'impossibilità di limitare le interferenze presenti nei sistemi cellulari intatti. Tali problematiche possono essere risolte utilizzando sistemi di membrane artificiali in cui la proteina di interesse è pressoché completamente isolata dal contesto cellulare (Indiveri et al 2010).

-1.16- IMPLICAZIONI DI OCTN2 NELLA CANCEROGENESI -

L'importanza rivestita dalle anomalie del metabolismo delle cellule tumorali è di grande rilevanza perché la comprensione di tali fenomeni può dare indicazioni sui cambiamenti causati dalla trasformazione cellulare o sulla possibilità che tali cambiamenti inducano essi stessi carcinogenesi.

Il metabolismo delle cellule tumorali è, infatti, caratterizzato da:

- Incremento della glicolisi (Fujibayashi et al 1997) associato all'aumento del trasporto di glucosio (Dang et al 1997) e della gluconogenesi (Lundholm et al 1982);

- Diminuzione dell'ossidazione del piruvato con aumento della produzione di acido lattico (Mazurek et al 1997);
- Incremento dell'attività degli enzimi della glutamminolisi (Wasa et al 1996) con alterazione del metabolismo degli amminoacidi e delle proteine (Souba et al 1992);
- Incremento dell'attività degli enzimi della via dei pentosi fosfato (Boros et al 1998);
- Diminuzione dell'attività dello shuttle malato- aspartato (Mazurek et al 1998);
- Incremento del turnover del glicerolo e degli acidi grassi (Shaw et al 1987);
- Riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi (Prip Buus et al 1992; Ockner et al 1993).

Alla base della deregolazione del metabolismo lipidico nelle cellule tumorali sono presenti anomalie dell'attività degli enzimi e delle proteine di trasporto del sistema delle carnitine, con conseguente diminuzione della β - ossidazione degli acidi grassi.

Alcuni farmaci chemioterapici contribuiscono, peraltro, alla disfunzione del sistema delle carnitine anche nelle cellule dei tessuti normali; tali effetti sono però controvertiti previa somministrazione di carnitina esogena senza influenzare negativamente l'effetto antitumorale del farmaco in questione.

Lo studio del metabolismo lipidico, dunque, è di particolare interesse per analizzare le modificazioni indotte direttamente o indirettamente dal cancro sul network della carnitina.

Il possibile ruolo del sistema della carnitina nell'induzione o nel peggioramento della sindrome metabolica associata al cancro è stato studiato in differenti modelli sperimentali (Calvani et al 1999) che hanno mostrato numerose anomalie nella regolazione dell'espressione dei componenti di tale sistema. In particolare ratti Walker 256 con carcinosarcoma sono stati utilizzati per lo studio degli enzimi CPTs in diversi tessuti, tumorali e non, dimostrando come l'attività delle isoforme della Carnitina Palmitoil Transferasi risulti alterata dalla presenza del tumore e da alcuni trattamenti farmacologici.

In realtà pochi dati sono, finora, disponibili rispetto all'alterazione dei trasportatori di carnitina nelle cellule tumorali; studi di natura epidemiologica hanno mostrato che il rapporto tra le concentrazioni di carnitina libera e di esteri della carnitina sembra modificato in pazienti affetti da tumori rispetto ai controlli sani (Yazdanapanah et al 1997; Peluso et al 2000).

Di particolare interesse è, inoltre, l'interazione tra i componenti del sistema delle carnitine ed i farmaci chemioterapici comunemente utilizzati. Tra questi, quelli noti per alterare il normale funzionamento del network della carnitina sono il cisplatino, il taxolo, l'ifosfamide, e l'adriamicina.

Il cisplatino è una molecola inorganica, divalente, solubile in acqua che causa, come effetto collaterale, un aumento dell'escrezione renale della carnitina; ciò è da considerarsi un marker precoce dei danni sistemici causati dal cisplatino (Berardi et al 1996; Haschke et al 2010). Il mancato riassorbimento renale di carnitina, anche in questo caso, può indurre una sindrome da deficienza di carnitina che aggrava lo stato di funzione metabolica dei pazienti affetti da tumore.

Il meccanismo mediante il quale il cisplatino induce un aumento dell'escrezione renale di carnitina è ancora sconosciuto; esistono, finora, pochi risultati sperimentali sull'interazione del cisplatino con il sistema di trasporto OCTN2, il principale trasportatore di carnitina presente a livello renale. L'isoforma murina sembra essere implicata nel mancato riassorbimento di carnitina dall'ultrafiltrato renale (Lancaster et al 2010) e, per quanto riguarda l'isoforma umana, alcuni studi sembrano documentare una down-regolazione del gene di OCTN2 dovuta al trattamento con cisplatino (Haschke et al 2010); non sembra, invece, che tale agente farmacologico sia da considerarsi substrato del sistema di trasporto OCTN2 (Yonezawa et al 2006).

-1.17- MODELLO SPERIMENTALE HPV PER LO STUDIO DELLA REGOLAZIONE DEL PROMOTORE DI OCTN2

La famiglia dei papilloma virus umani (Human Papilloma Viruses) comprende più di 100 tipi differenti che infettano, preferenzialmente, la mucosa dei genitali, del tratto respiratorio superiore e della pelle; consiste in un gruppo eterogeneo di virus a dsDNA incapsulati.

Un sottogruppo della famiglia degli HPV mucosali, detto ad alto rischio, è responsabile approssimativamente del 5% di tutti i tumori umani, che rappresentano un terzo di tutti i tumori indotti da virus. È stato disegnato un albero filogenetico basato sulla sequenza della principale proteina del capsido L1 definendo i differenti generi di HPV (de Villiers et al 2004). Il *genus* alpha comprende circa 30 tipi di HPV che infettano la mucosa del tratto genitale e diversi tipi cutanei benigni, responsabili semplicemente della formazione di verruche della pelle. Il *genus* alpha (HPV mucosali) è diviso in due gruppi: “low risk” (tra cui HPV 6 ed 11) ed “high risk” (HPV 16 e 18). Il *genus* degli HPV beta, comprende alcuni tipi cutanei responsabili dell’insorgenza di Non Melanoma Skin Cancer, particolarmente in pazienti affetti da *Epidermodysplasia verruciformis* (EV). Studi funzionali sulle proteine derivanti dall’espressione dei geni “early” di HPV hanno mostrato che le oncoproteine E5, E6 ed E7 giocano un ruolo importante nella carcinogenesi indotta da tali virus. Entrambe queste proteine hanno sviluppato un certo numero di strategie per evadere l’immuno- sorveglianza permettendo la persistenza virale e per alterare il ciclo cellulare ed il controllo dell’apoptosi, facilitando l’accumulo di danni e mutazioni al carico del DNA e, quindi, la trasformazione cellulare (zur Hausen 2002; Ghittoni et al 2010).

Il genoma di tutti gli HPV consiste di un filamento di double stranded DNA di circa 8Kb e codifica per circa 8 geni; sono identificabili due regioni principali, una contenente i geni precoci E1,E2,E3,E4,E5,E6 ed E7 (Early Genes) ed un’altra contenente i geni tardivi (Late Genes) L1 ed L2 codificanti per le proteine del capsido maggiore (L1) e minore (L2). Il genoma di HPV presenta, inoltre, una regione non codificante (LCR: Long Control Region) che comprende la maggior parte

degli elementi regolatori implicati nella replicazione e trascrizione del DNA virale. Le proteine codificate dai geni E6 ed E7 sono altamente conservate tra quasi tutti i differenti HPV identificati finora (Chen et al 2007; Nobre et al 2009).

Gli studi funzionali sono stati condotti principalmente sui tipi mucosali 16 e 18 definiti “high risk” in quanto correlati all’insorgenza di cancro alla cervice uterina; sono stati prodotti, inoltre, dei vaccini diretti contro questi due tipi di HPV.

HPV16 E6 è una proteina di 151 amminoacidi, che presenta due motivi zinc finger contenenti due cisteine (C-XX-C), conservate tra tutti i tipi di HPV. La principale e meglio caratterizzata attività di HPV16 E6 è la sua abilità di indurre degradazione del tumor suppressor p53, fattore di trascrizione responsabile dell’arresto del ciclo cellulare e, se necessario, dell’entrata delle cellule in apoptosi in seguito, ad esempio, a danni sul DNA.

HPV16 E6 si lega, principalmente, al dominio LXXLL presente nella proteina E6AP (Ubiquitin-ligasi 3); il complesso E6/E6AP interagisce fisicamente con p53, ubiquitinandolo e dirigendolo al proteasoma dove viene degradato (Tommasino et al 2003). Considerata l’importante funzione di p53 nel mantenimento dell’integrità genomica, le cellule infettate da HPV16 mostrano una maggiore propensione all’accumulo di anomalie cromosomiche, incrementando la possibilità di trasformazione tumorale. L’abilità di degradazione di p53 sembra essere una caratteristica della proteina E6 dei tipi di HPV “high risk” (Sheffner et al 1993). La proteina E6 può, inoltre, interferire con il processo di differenziazione e progressione del ciclo cellulare interagendo fisicamente con p300 e CBP con conseguente alterazione della regolazione dei geni target di p53 (Patel et al 1999).

HPV16 E6 interagisce, infine, con differenti membri della famiglia delle guanilato ciclasi associate a membrana (MAGUK), quali ad esempio hDLG, Scribble, MUPP1 e MAGI-3. Si tratta di proteine implicate nel mantenimento della polarità cellulare e nella regolazione dei contatti cellula- cellula. Le interazioni con HPV16 E6 avvengono mediante i domini PDZ delle MAGUK ed i PDZ binding- motif su E6, con conseguente degradazione delle guanilato ciclasi associate a

membrane. Tale fenomeno contribuisce alla perdita della polarità cellulare e dei contatti cellula-cellula, caratteristiche tipiche delle cellule trasformate.

Mutazioni a carico della proteina E6 di HPV 16 nella zona C- terminale, dove sono presenti i PDZ binding motif, abolisce la capacità trasformante di tale proteina (Funke et al 2005).

HPV16 E6 riesce ad alterare il processo apoptotico anche in modo indipendente da p53, degradando Bak mediante il proteasoma, in seguito ad ubiquitinilazione. La degradazione di Bak, appartenente alla famiglia Bcl-2, impedisce l'attivazione della cascata delle caspasi e, quindi, il processo apoptotico conseguente a rilascio del citocromo C mitocondriale (Jackson et al 2000). L'apoptosi è anche bloccata grazie all'up-regolazione di proteine inibitrici dell'apoptosi, quali c-IAP2 e survivina, normalmente target di NFκB pathway (James et al 2006).

HPV16E6 è nota anche perché in grado di attivare la trascrizione del gene codificante per hTERT (human TElomerase Reverse Transcriptase): le cellule somatiche sono caratterizzate da un'attività della telomerasi molto bassa: questo è alla base della senescenza cellulare, poiché ad ogni ciclo replicativo i telomeri si accorciano.

Le cellule infettate da HPV16, al contrario, presentano un'elevata attività telomerasica garantendogli una pressoché infinita capacità proliferativi (Bedard et al 2008).

La capacità di alterare il processo di differenziazione dei cheratinociti è garantito, inoltre, dall'interazione con il pathway di Notch. La famiglia Notch è costituita da geni codificanti per recettori di membrana plasmatica implicati nella determinazione cellulare e nella differenziazione.

In cellule epiteliali primarie, un aumento dell'attività di Notch causa, normalmente, arresto del ciclo cellulare e inizio della differenziazione. Nelle cellule infettate e trasformate da HPV16, invece, la degradazione di p53 porta ad una diminuzione dell'attività di Notch (Yugawa et al 2007).

Un altro dei prodotti dei geni precoci è l'oncoproteina E7, in grado di interagire con le proteine "pocket" pRb, p107 e p130. Queste sono proteine importanti nel controllo del ciclo

cellulare, in quanto regolano negativamente l'attività di differenti fattori di trascrizione quali la famiglia E2F.

La fosforilazione di pRb dovuta alle chinasi ciclica dipendenti (CDK), in condizioni normali, induce la degradazione dello stesso pRb con conseguente attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia E2F. HPV16 E7 interagisce fisicamente con pRb mimando l'attività delle CDK e, quindi, con conseguente attivazione costitutiva di E2F. Tale fenomeno è, successivamente, responsabile della trascrizione di geni (ciclina A ed E) che consentono il passaggio delle cellule in fase S del ciclo cellulare (Cobrinik 2005). Per quanto riguarda p130, questa esercita la sua funzione regolatoria nella transizione G0/G1, mentre p107 è attiva nella transizione G1/S ed in fase G2 (Hwang et al 2002).

È stato dimostrato, inoltre, che HPV16 E7 può interagire, direttamente, con E2F indipendentemente da pRb, così come legarsi a p21 e p27 degradandoli; ciò neutralizza il loro effetto inibitorio sulla progressione del ciclo cellulare (Jones et al 1997). Va sottolineato che, a livello strutturale, le proteine E7 di tutti i tipi di HPV ("low" e "high risk") possono interagire con pRb, in quanto dotate del dominio di legame per pRb (LXCXE), ma l'affinità di tale legame varia considerevolmente tra i vari tipi. Una caratteristica comune a quelli in grado di immortalizzare, in vivo ed in vitro, è che in seguito ad interazione con pRb, questa viene ubiquitinata e degradata dal proteasoma; tale fenomeno non è presente tra i "low risk" (Munger et al 1989).

L'alcalinizzazione è, infine, un altro dei meccanismi alla base dell'immortalizzazione cellulare indotta da E7; ciò in conseguenza della stimolazione di NHE-1, trasportatore di membrana plasmatica ubiquitariamente espresso, in grado di trasportare H^+ all'esterno della cellula in scambio con Na^+ (Reshkin et al 2000).

Sebbene gli HPV High Risk siano inequivocabilmente associati con la carcinogenesi, la maggior parte delle infezioni resta asintomatica. Solo poche sono le donne che presentano un'infezione persistente fino allo sviluppo del cancro alla cervice uterina. È stato dimostrato che

HPV16 riesce a modulare la risposta immunitaria mediata dalla famiglia dei recettori toll- like (TLRs) considerati “sensori molecolari” dei patogeni. In particolare, TLR9 è in grado di identificare virus a dsDNA , come appunto HPV, e sembra essere down-regolato dalle oncoproteine virali E6 ed E7 di HPV16 (Hasan et al 2007) .

L'utilizzo del modello sperimentale dei cheratinociti infettati da HPV16 è utile nello studio della regolazione dell'espressione genica: si tratta infatti di cellule in cui, la presenza delle oncoproteine virali E6 ed E7 crea precise e ben caratterizzate alterazioni molecolari principalmente a carico di famiglie di fattori di trascrizione implicati nella regolazione di molte vie di traduzione di segnali intra- cellulari.

La regolazione dei promotori dei geni codificanti per i sistemi di trasporto della famiglia OCTN è pressochè sconosciuta: i cheratinociti immortalizzati in seguito ad infezione da HPV sono da considerarsi, quindi, un buon modello sperimentale per verificare quali siano i fattori di trascrizione in grado di stimolare o reprimere l'espressione di tali geni. Inoltre, in quanto linee cellulari trasformate, sono utili nella valutazione dell'impatto sul metabolismo cellulare tumorale di un'eventuale alterazione di sistemi di trasporto di membrana plasmatica.

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, incidendo la pelliccia degli animali con un taglio a “V” con le forbici (Biber et al 1981).

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: il 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 0 °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 mescolamento 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 far precipitare i mitocondri ed i nuclei.

Tutte le operazioni finora descritte vanno effettuate in camera fredda, in quanto molte componenti cellulari sono termolabili e, di conseguenza, le procedure di rottura delle cellule danno risultati migliori se condotte a temperature basse, generalmente intorno a 4 °C.

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 differente 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 intaccellulari 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 Biureto.

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 $50\text{ }\mu\text{l}$, vengono scongelate e mantenute in ghiaccio ad una temperatura di $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ad esse vengono aggiunti $80\text{ }\mu\text{l}$ 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 (dodeciloctaossietilenetere) 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 idrofoba che interagisce con la porzione lipofila del traslocatore.

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 sovrantante, 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 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 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 Na_2CO_3 al 2% in NaOH 0.1 M;
- 0.075 ml di tartrato di sodio e potassio all'1%;
- 0.075 ml di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ allo 0.5%;
- 0.75 ml di SDS al 10%.

La proteina solubilizzata in C_{12}E_8 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 H_2O , 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 μl del reattivo di Folin (1 Folin : 2 H_2O). 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- PREPARAZIONE DEI LIPOSOMI -

I liposomi vengono preparati solubilizzando 1 g di fosfolipidi (Fluka), parzialmente purificato e contenente 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 0°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.

- 2.6- INCORPORAZIONE DELLA PROTEINA 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 maniera tale da ripristinare l'ambiente in cui essa normalmente si trova, così da riprodurre la sua funzione fisiologica. 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) (Kramer et al 1986).

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 sostituirsi ai fosfolipidi di membrana, intercalandosi fra le proteine e questi ultimi, 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 μ l è la seguente:

- 25 μ l di proteina solubilizzata in $C_{12}E_8$ al 3%;
- 95 μ l di detergente $C_{12}E_8$ al 10%;
- 100 μ l di liposomi (10 mg di fosfolipidi);
- L- carnitina 10 mM (oppure come differentemente specificato nelle legende delle figure);
- Hepes/Tris 20 mM a pH 6.0;
- H_2O bidistillata degassata fino a raggiungere il volume di 700 μ l.

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 sostanze della miscela al loro interno.

Tutte le operazioni sono effettuate a temperature comprese fra i 20 °C e i 30 °C.

- 2.7- 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 5 °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 2.5 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 $C_{12}E_8$ in eccesso facilitando, al contempo, il corretto inserimento della traslocasi 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 $C_{12}E_8$, 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, ottenendo così proteoliposomi purificati dal detergente.

- 2.8- PREPARAZIONE DELLE COLONNE SEPHADEX G-75

Per separare delle 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 sostanze 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 e 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.

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, in una colonna di vetro presentante sul fondo un setto poroso in grado di trattenere la resina, la sospensione precedentemente preparata, utilizzando sempre acqua degassata.

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 ad una concentrazione opportunamente scelta, in base a quelle dei 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.

A questo punto è possibile cromatografare i 550- 570 µl di eluato 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 intorbida, 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. Queste colonne Sephadex G-75 hanno dimensioni di 0.7 cm x 8 cm.

Quando la resina viene impaccata in esse, 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.

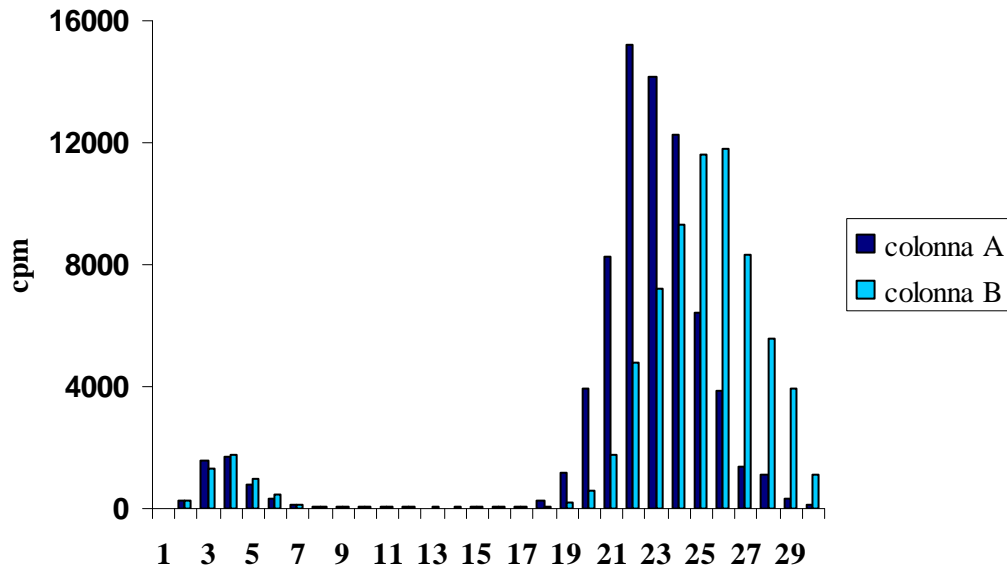
Ad ogni passaggio si raccoglie l'eluato e ad ogni prova vengono aggiunti 3 ml di miscela scintillante Pico-fluor 40 (PerkinElmer) che permette la lettura della radioattività.

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. Dal grafico sottostante si osserva che 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.



Il grafico mostra, infine, che il millilitro seguente non contiene radioattività, ed è per questo che successivamente all'eluizione dei proteoliposomi, viene effettuato un lavaggio con 1 ml di NaCl 50 mM. Le colonne contengono però ancora la radioattività rimasta all'esterno dei proteoliposomi dopo l'esperimento di trasporto, quindi vengono lavate con circa 3.5 ml di NaCl 50 mM.

- 2.9- MISURA DI TRASPORTO DELL'UPTAKE DI SUBSTRATO RADIOATTIVO NEI PROTEOLIPOSOMI

L'eluato torbido ottenuto dalle Sephadex G-75 e contenente i proteoliposomi, in seguito ad agitazione su vortex allo scopo di omogenare la soluzione, viene suddiviso in aliquote di 100 µl usate come campioni sui quali testare l'attività di trasporto.

Ad un campione di riferimento si aggiungono 10 µl di mersalyl 20 µM che è la sostanza utilizzata come "stop inhibitor" e 10 µl di ³H-carnitina alla concentrazione finale desiderata. Tuttavia gli esperimenti di trasporto condotti in presenza di DTE extraliposomiale, non possono essere inibiti con il mersalyl, quindi è stata utilizzata una miscela di Arginina 5mM e

Tetraetilammonio 5 mM, poiché, come descritto in precedenza (Pochini et al 2004), sono due molecole in grado di inibire il sistema di trasporto OCTN2 estratto dalle vescicole di brush- border di reni di ratto.

Si tratta di una prova di controllo, in cui inibitore e substrato radioattivo sono aggiunti contemporaneamente al tempo zero. 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 della ^3H -carnitina ai campioni, i proteoliposomi vengono messi a contatto, nel caso dei nostri esperimenti, con l'agente farmacologico omeprazolo alla concentrazione di 30 μM , in presenza o assenza dell'agente riducente dei gruppi sulfidrilici DTE alle concentrazioni indicate nelle leggende alle figure. Per gli esperimenti di cinetica la velocità iniziale del trasporto è stata misurata dopo 15 minuti di trasporto utilizzando due diverse concentrazioni di omeprazolo in presenza (6 μM e 12 μM) ed assenza (12 μM e 24 μM) di DTE 5 mM.

Per gli esperimenti di efflusso i proteoliposomi contenenti carnitina fredda 10 mM sono stati passati attraverso una Sephadex G-75 in modo da rimuovere il substrato esterno e, successivamente, incubati con [^3H]carnitina 1 μM per 90 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 di carnitina fredda, o omeprazolo, all'esterno 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.

L'agente farmacologico omeprazolo è attivo previo trattamento acido: viene solubilizzato in etanolo alla concentrazione di 25 mM e poi diluito 10 volte in HCl 0.1 M (pH 1). Dopo 15 minuti di incubazione il pH della soluzione viene portato a pH 6.0 usando Tris in polvere.

Sono stati condotti anche esperimenti utilizzando vescicole di brush- border intatte basandosi su una procedura già utilizzata in precedenza (Ohnishi et al 2003). 10 µl di brush border sono stati centrifugati per 5 minuti a 13000 x g a 4°C. Per equilibrare le vescicole con carnitina, il pellet è stato risospeso con 10 µl di un buffer contenente saccarosio 200 mM, Hepes/ Tris pH 6.0 12 mM, NaCl 50 mM e carnitina 2.5 mM. Dopo 60 minuti di incubazione in tale tampone, il trasporto è stato misurato aggiungendo 90 µl di un buffer contenente saccarosio 200 mM, Hepes/ Tris pH 6.0 12 mM, NaCl 50 mM e carrier free ³H- carnitina in modo da raggiungere una concentrazione di ³H- carnitina di 0.25 mM.

Le operazioni finora elencate, vengono tutte effettuate alla temperatura di circa 25°C.

Immediatamente dopo la fine del trasporto, 100 µl di ogni prova vengono cromatografati su colonne Sephadex G-75, precedentemente tamponate con NaCl 50 mM, in modo da rimuovere il substrato radioattivo esterno, cioè la glutammina triziata non trasportata, come descritto nel paragrafo precedente.

I proteoliposomi eluiti, vengono raccolti in appositi contenitori, generalmente di polietilene, chiamati "vial", a cui si aggiungono 3 ml di miscela scintillante Pico-fluor 40 (PerkinElmer).

Le vial vengono agitate ed inserite all'interno di speciali contenitori di polietilene, suddivisi in una serie di piccoli scompartimenti chiamati rack. Questi ultimi vengono identificati con un opportuno programma relativo all'isotopo in questione e collocati in contatore a scintillazione liquida (Beckman LS-7500) per misurare la radioattività in colpi al minuto (cpm).

- 2.10- MISURA DELLA RADIOATTIVITA' ENTRATA NEI PROTEOLIPOSOMI E

CALCOLO DELL'ATTIVITA' 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 , ^{14}C e ^{35}S , frequentemente usati in biologia.

Al campione da leggere vengono aggiunti 3 ml della miscela scintillante Pico-fluor 40 (PerkinElmer), costituita da idrocarburi aromatici in grado di trasformare le radiazioni β in fluorescenza. 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, espressa come nanomoli di substrato trasportato per milligrammo di proteine, nel tempo di incubazione, si ricava dalla seguente formula:

$$\text{Attività} = \text{cpm} / \text{A.S.} \times \text{mg di proteina}$$

dove:

cpm è la radioattività trovata all'interno dei proteoliposomi;

mg indica i milligrammi di proteina presenti nei campioni;

A.S. è l'attività specifica, che si calcola secondo la relazione:

$$\text{Attività specifica} = \text{radioattività totale} / \text{nmoli di } ^3\text{H-glutammina}$$

dove:

radioattività totale è il numero di colpi per minuto emessi da 10 μ l di soluzione di substrato radioattivo diluiti con 3 ml di miscela scintillante;

nmoli di substrato è il numero di nanomoli totali contenute in 10 μ l della medesima soluzione di substrato radioattivo, impegnate nelle reazioni di scambio.

- 2.11- 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 (Grafitt).

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

- Equazione di Michaelis-Menten:

$$V = \frac{[S]}{K_m + [S]} \cdot V_{\max}$$

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

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

dove:

V = velocità iniziale del trasporto;

V_{max} = velocità massima del trasporto;

K_m = concentrazione di substrato ([S]) alla quale V = ½ 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 IC₅₀:

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

dove:

s è un fattore di pendenza;

x rappresenta il valore di inibizione;

IC₅₀ = 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.

- 2.12- ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

I prodotti amplificati con le reazioni di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. La concentrazione dell'agarosio è stata opportunamente scelta in base alla lunghezza dei frammenti di DNA sintetizzati (0.8-1.5%). Per la preparazione del gel e come tampone per la corsa elettroforetica, è stata impiegata una soluzione di TAE 1X (Tris-Acido Acetico- EDTA).

Per evidenziare le molecole di DNA è stato aggiunto Etidio Bromuro alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml. L' Etidio Bromuro si intercala tra le coppie di basi del DNA rendendolo fluorescente se esposto alla luce ultravioletta. Sul gel di agarosio viene caricata anche una miscela di frammenti di DNA aventi lunghezze e concentrazioni note (markers): confrontando la loro posizione sul gel, al termine della corsa elettroforetica, con quella dei frammenti prodotti mediante PCR, è possibile conoscere la grandezza di questi ultimi, generalmente espressa in bp (paia di basi).

-2.13- PURIFICAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA DA GEL D'AGAROSIO

I frammenti di DNA separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, sono stati purificati tramite il "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" della Promega.

Questo sistema è basato sulla capacità del DNA di legarsi a una membrana di silice in presenza di sali caotropici. Dopo la corsa elettroforetica, è stata tagliata una fetta di gel, contenente il frammento da purificare, è stata pesata e sono stati aggiunti, 10 µl di "Membrane Binding Solution"* (in dotazione del Kit) per ogni 10 mg di frammento di agarosio.

La miscela viene incubata a 65°C per 10 minuti: il riscaldamento permette la completa fusione dell'agarosio. Successivamente la miscela è stata trasferita su una colonna costituita da una membrana di silice. Dopo l'incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente, durante il quale il DNA aderisce alla resina la miscela è stata centrifugata per 1 minuto a 16000 x g e successivamente è stata lavata due volte con una soluzione contenente etanolo. Infine, per permettere il distacco del

DNA dalla resina, sono stati aggiunti 30 µl di acqua. La “Membrane Binding Solution” contiene Guanidinio isotiocianato 4.5 M e Acetato di potassio 0.5 M.

- 2.14- PURIFICAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA DOPO DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE

Il cDNA di OCTN2 ed il vettore pET-41a(+) digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI e HindIII sono stati purificati con il kit “Jetquick Spin Column Technique” (Genomed).

Questo sistema è basato sulla capacità del DNA di legarsi a una membrana di silice in presenza di sali caotropici. Sono stati aggiunti 400 µl di soluzione H1 (in dotazione col kit) per ogni 100 µl di prodotto di digestione e, la miscela è stata trasferita su una colonna costituita da una membrana di silice su cui aderirà il DNA durante il minuto di incubazione. A questo punto si centrifuga per 1 minuto a 16000 x g e si procede a un lavaggio con la soluzione H2 contenente etanolo. Si centrifuga due volte per eliminare i residui di etanolo e si eluisce con 30 µl di acqua il cDNA di OCTN2 e con 20 µl di acqua il vettore pET-41a(+) per permettere il distacco del DNA dalla resina.

La soluzione H1 contiene guanidinio idrocloruro, EDTA, Tris/HCl, isopropanolo. La soluzione H2 contiene etanolo, NaCl, EDTA e Tris/HCl.

- 2.15- DETERMINAZIONE ED ANALISI DI SEQUENZE NUCLEOTIDICHE SECONDO IL METODO DI SANGER MODIFICATO

Con il metodo di Sanger modificato il filamento di DNA da sequenziare, detto filamento stampo, viene copiato utilizzando una DNA-polimerasi che agisce incorporando, nella catena di DNA in allungamento, deossinucleotidi trifosfati (dNTPs).

La sintesi del nuovo filamento di DNA comincia a partire da un primer oligonucleotidico che riconosce in maniera specifica una determinata sequenza di basi sullo stampo. La presenza in

piccola quantità di un 2', 3' -dideossinucleotide 5'- trifosfato (ddNTP) nella miscela dei quattro nucleotidi porterà alla sua casuale incorporazione nella catena di DNA in allungamento.

Una volta incorporato nella catena, il ddNTP porterà alla terminazione l'estensione in quanto il filamento neosintetizzato risulterà privo dell'ossidrile in 3' del dideossinucleotide, necessario alla formazione del legame fosfodiesterico con il successivo nucleotide. Inoltre, i dideossinucleotidi utilizzati per il sequenziamento dei campioni di DNA, sono marcati con fluorescenza.

Per ogni reazione è stata calcolata la concentrazione ottimale di DNA ed è stato seguito il seguente protocollo:

0.2-1 µg DNA;

3.2 picomoli primer;

4 µl big dye solution *;

H₂O fino ad un volume finale di 20 µl.

La Big dye solution * è una miscela di reazione costituita da : Enzima Taq polimerasi e miscela di nucleotidi fluorescenti del "Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit " della Applied Biosystem.

Sono stati eseguiti 25 cicli nelle seguenti condizioni:

Denaturation	96°C	10 secondi
Annealing	50°C	5 secondi
Extension	72°C	4 minuti

- 2.16- CLONAGGIO DEL GENE hOCTN2

L'RNA totale è stato isolato da fibroblasti umani in coltura e in seguito retrotrascritto. Il cDNA codificante per hOCTN2 ha una grandezza di circa 1674 bp ed è stato amplificato usando i primer forward e reverse sotto riportati:

5'- ATGCGGGACTACGACGAGGTGACCG-3'

5'- TTAGAAGGCTGTGCTTTTAAGGATT-3'

La correttezza della sequenza è stata verificando utilizzando il sequenziatore automatico ABI 310 Applied Biosystem.

In seguito il cDNA è stato amplificato con altri primers:

5'- GCGGATCCATGCGGGACTACGACGAG-3'

5'-CCCAAGCTTTTAGAAGGCTGTGCTTTT-3'

contenenti i siti di restrizione riconosciuti da BamHI e Hind III.

Il cDNA è stato clonato nel vettore di espressione pET41a(+) all'interno dei medesimi siti. Il vettore ricombinante chiamato pET41a(+)-hOCTN2 codifica per una proteina di fusione corrispondente al trasportatore hOCTN2 con tre sequenze poste all'estremità N-terminale codificanti per la proteina GST, una sequenza di 6 istidine e una sequenza S-tag.

Seguendo un'altra strategia di clonaggio, il cDNA corrispondente alla proteina hOCTN2 è stato clonato nel vettore di espressione pET21a(+) nei siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione NdeI e XhoI, rimuovendo precedentemente il sito NdeI nella posizione 1159 mediante mutagenesi sito diretta. Sono stati utilizzati i seguenti primers:

5'- TTGAAGTCCCAGCATACGTGTTGGCCT-3'

5'- AGGCCAACACGTATGCTGGGACTTCAA-3'

che non comportano nessun cambiamento amminoacidico.

In seguito il cDNA è stato amplificato utilizzando i primers:

5'-GGGAATTCCATATGAAAGACTACGACGAGGTG-3'

5'-CCGCTCGAGGAAGGCTGTGCTTTTAAGGAT-3'

contenenti i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione.

- 2.17- DIGESTIONE DEL cDNA DI OCTN2.

Il cDNA purificato è stato bi-digerito seguendo il seguente protocollo per il clonaggio nel vettore pET41a(+):

0.6 µg di DNA purificato;

3 µl di buffer di digestione di Bam HI* 10x;

2 µl di acqua;

1 µl di Bam HI (10u/µl);

1 µl di Hind III (20u/µl);

per 5 ore e 30 minuti a 37°C;

Il cDNA purificato è stato digerito seguendo il seguente protocollo per il clonaggio nel vettore pET21a (+) :

0.5 µg di DNA purificato;

2 µl di buffer di digestione di NEB4;

1 µl di Nde I (10u/µl);

5.5 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C;

Dopo purificazione, il cDNA è stato poi mono-digerito secondo il seguente protocollo:

0.45 µg di DNA purificato;

2 µl di buffer di digestione R;

1 µl di Xho I(10u/µl);

6.5 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C

Il buffer di digestione NEB4 contiene: Acetato di potassio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, Magnesio acetato 10 mM, Ditiotreitolo 1 mM pH 7.9.

Il buffer di digestione R contiene: Tris/HCl 10 mM pH 8.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, BSA 0.1 mg/ml.

- 2.18- DIGESTIONE DEL pET-41a(+)

Per digerire il vettore è stato seguito il seguente protocollo:

1 µg di DNA di pET-41a(+);

2 µl di buffer di digestione di Bam HI* 10x;

15 µl di acqua;

1 µl di Bam HI;

1 µl di Hind III;

5 ore e 30 minuti a 37°C;

*Il buffer di digestione di Bam HI 1X contiene: Tris/HCl 10 mM a pH 8, MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, 2-mercaptoetanololo 1mM, Triton X-100 0.02%, 0.1 mg/ml di BSA.

-2.19- DIGESTIONE DEL VETTORE pET 21a(+)

Il vettore di espressione è stato digerito seguendo il seguente protocollo:

1 µg di DNA pET 21a(+);

2 µl di buffer di digestione di NEB4;

1 µl di Nde I (10u/µl);

6 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C;

Dopo purificazione, il cDNA è stato poi mono-digerito secondo il seguente protocollo:

1 µg di DNA pET 21 a(+) monodigerito purificato;

2 µl di buffer di digestione R;

1 µl di Xho I(10u/µl);

6 µl di H₂O;

Per 5 ore a 37°C.

Il buffer di digestione NEB4 contiene: Acetato di potassio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, Magnesio acetato 10 mM, Ditiotreitolo 1 mM a pH 7.9.

Il buffer di digestione R contiene: Tris/HCl 10 mM pH 8.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM e BSA 0.1 mg/ml.

- 2.20- TRATTAMENTO DEL VETTORE CON FOSFATASI ALCALINA

Il vettore è sottoposto, dopo digestione, al trattamento con la fosfatasi per catalizzare nel DNA l'idrolisi dei residui 5'-fosfato.

Per effettuare il trattamento con la "Calf Intestine Alkaline Phosphatase" della Fermentas è stato seguito il seguente protocollo:

20 µl di DNA di vettore digerito

3 µl di buffer CIAP;

6 µl di H₂O;

1 µl di CIAP.

La miscela di reazione si lascia incubare a 37°C per 30' e si blocca lasciandola a 85°C per 15'. Il buffer CIAP contiene: Tris-HCl 0.1 M a pH 7.5, MgCl₂ 0.1 M.

-2. 21- LIGATION

Con questa tecnica è possibile inserire il frammento di DNA digerito nel vettore di espressione grazie alle estremità coesive create dalla digestione con gli stessi enzimi di restrizione.

Per facilitare la reazione di ligation è necessario che il rapporto tra vettore e frammento da clonare al suo interno sia 1:3, 1:4. Il vettore e il frammento vengono incubati per cinque minuti a temperatura ambiente:

150 ng di DNA digerito

50 ng di plasmide digerito e trattato con fosfatasi alcalina;

7.3 µl di H₂O;

1 µl di T4 ligasi (0,2 U);

10 µl di buffer per la ligation.

Il buffer per la ligation contiene: Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT (ditiotreitolo) 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 µg/ml.

Al termine dell'incubazione cellule di E. Coli TG1, precedentemente rese competenti, vengono trasformate con la miscela di ligation.

- 2.22- CELLULE COMPETENTI

Abbiamo reso competenti le cellule di E. Coli del ceppo TG1 utilizzando una variazione del metodo di Cohen (Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA, 1972). La procedura è efficace per la maggior parte dei ceppi di E. Coli.

E' stata prelevata una singola colonia da una piastra contenente colonie cresciute per 16-20 ore a 37°C e trasferita in 50 ml di brodo LB. La coltura viene incubata per tre ore a 37°C sotto vigorosa agitazione (300 cicli/minuto in un incubatore orbitante). Per un'efficiente trasformazione è essenziale che il numero di cellule vive non ecceda 10⁸ cellule per ml. La crescita cellulare è stata

monitorata misurando la D.O. a 600 nm, e a un valore compreso tra 0.4 – 0.6 le cellule sono state trasferite in un tubo di polipropilene sterile da 50 ml e conservate in ghiaccio per 30 minuti.

In seguito sono state sedimentate mediante centrifugazione a 3600 x g per 10 minuti a 4°C.

Il sovranatante è stato decantato ed il pellet risospeso in 5 ml di CaCl₂ 50 mM e conservato in ghiaccio per 30'. Le cellule sono poi state nuovamente sedimentate mediante centrifugazione e riprese in 2 ml di CaCl₂ 50 mM freddo.

-2. 23 - TRASFORMAZIONE

La trasformazione è un processo in cui vengono inseriti dei plasmidi all'interno di cellule batteriche, precedentemente rese competenti, allo scopo di far produrre loro un'elevata quantità del DNA inserito. Normalmente il volume di DNA inserito non deve superare il 5% di quello delle cellule. 5 µl (ca. 50 ng) della miscela di ligation sono stati incubati in ghiaccio per 30' con 100 µl di cellule competenti, quindi sottoposti ad uno shock termico per 90 secondi a 42°C. Successivamente alla miscela di reazione sono stati aggiunti 100 µl di brodo LB ed il tutto è stato incubato a 37°C per 1 ora. Le cellule che ospitano il plasmide sono state infine selezionate su piastre contenenti LB, agar 1.5% e ampicillina 100 mg/ml.

-2. 24- ESTRAZIONE DEL DNA MEDIANTE IL KIT QIAPREP SPIN MINIPREP

La coltura, contenente la colonia cresciuta per 12-16 ore a 37°C in 5 ml di brodo LB, viene centrifugata e il pellet è risospeso con 250 µl di buffer P1 (contenente RNasi A). A questo vengono aggiunti 250 µl di buffer P2, contenente idrossido di sodio (NaOH) che denatura il DNA cromosomico, invertendo per 4-6 volte fin quando la soluzione non diviene limpida.

Si aggiungono successivamente 350 µl di buffer N3 che contiene acido acetico e guanidinio idrocloruro; immediatamente si inverte per 4-6 volte fin quando la soluzione non diventa viscosa.

Dopo centrifugazione per 10' a 16000 x g, si forma un pellet bianco e compatto; il sovrantante si trasferisce su una QIAprep Spin Column e si centrifuga nuovamente a 16000 x g per 60''.

Si procede col lavaggio della QIAprep Spin Column utilizzando 500 µl di buffer PB (contenente isopropanolo e guanidinio idrocloruro), si centrifuga per 60'' e si aggiungono 750 µl di buffer PE, che contiene etanolo. Si centrifuga nuovamente a 16000 x g per 60'' e, successivamente, per 1' per eliminare tutto il buffer di lavaggio.

Si pone la QIAprep Column in una eppendorf da 1.5 ml e, per eluire il DNA, si aggiungono 50 µl di buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) o di H₂O direttamente al centro della colonnina. Dopo 1' a temperatura ambiente, si centrifuga per 1'.

- 2.25- ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE GST-hOCTN2

Per ottenere l'espressione di hOCTN2-GST il ceppo cellulare E.coli Rosetta(DE3) pLysS è stato trasformato con il costrutto pET41a(+)-hOCTN2, mediante il metodo del cloruro di calcio.

Per selezionare le colonie trasformate sono state utilizzate piastre di LB agar contenenti 30 µg/mL di kanamicina e 34 µg/mL di cloramfenicolo. Le cellule contenenti il plasmide sono state in seguito inoculate in 100 ml di brodo 2X TY contenenti 30 µg/mL di kanamicina e 34 µg/mL di cloramfenicolo e fatte crescere per tutta la notte a 37°C in un incubatore rotante. Successivamente 50 mL di coltura cellulare sono stati diluiti in 0.5 L di brodo 2X TY fresco, addizionato con sorbitolo 1M e betaina 2.5 mM per creare lo shock osmotico e, a metà della fase logaritmica della crescita batterica, è stata indotta la sintesi della proteina ricombinante mediante l'aggiunta di IPTG 0.4 mM e la temperatura è stata portata 28°C.

-2.26- ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2(R2K)

Per ottenere l'espressione di hOCTN2 il ceppo cellulare E.coli Rosetta(DE3) pLysS è stato trasformato con il costrutto pET21a(+)-hOCTN2, mediante il metodo del cloruro di calcio. Per selezionare le colonie trasformate sono state utilizzate piastre di LB agar contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo. Le cellule contenenti il plasmide sono state in seguito inoculate in 100 ml di brodo 2x TY contenenti 100 µg/mL di ampicillina e 34 µg/mL di cloramfenicolo e fatte crescere per tutta la notte a 37°C in un incubatore rotante. Successivamente 50 mL di coltura cellulare sono stati diluiti in 0.5 L di brodo 2X TY fresco contenente gli antibiotici e, a metà della fase logaritmica della crescita batterica, è stata indotta la sintesi della proteina ricombinante mediante l'aggiunta di IPTG 0.1 mM e la temperatura è stata portata 28°C.

-2.27- ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN SDS

La separazione delle proteine è effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (dodecilsolfato di sodio). E' usato un sistema di mini gel le cui dimensioni sono 8 x 10 cm e lo spessore è 0.75mm. La soluzione per la preparazione del gel di separazione al 12% è costituita da:

2.117 ml di acrilammide/bisacrilammide (acrilammide 30% e bisacrilammide 0.2%);

1.5 ml di Tris (triidrossimetilamminoetano)/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 (tetrametiletilendiammina) (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 viene effettuata con il metodo del blu di Coomassie.

- 2.28-WESTERN BLOTTING ED IMMUNODECORAZIONE

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 carta da filtro, membrana di nitrocellulosa, gel, carta da filtro e si pone nell'elettroblotting per 20 minuti a 15 V. Successivamente la membrana è posta per un'ora in un buffer di incubazione, dove vengono aggiunti 2 ml di albumina al 3% e l'anticorpo primario, che si lega alla proteina contro cui è diretto. Si procede, quindi, a 3-4 lavaggi di 10 minuti con il tampone di lavaggio per eliminare l'anticorpo che non si è legato.

Effettuati i lavaggi, la membrana di nitrocellulosa si pone, per un'ora, nel tampone di incubazione, contenente 2 ml di albumina all'1%, in cui viene aggiunto l'anticorpo secondario che riconosce il frammento Fc dell'anticorpo primario e porta legata la perossidasi. Successivamente si

effettuano altri 3-4 lavaggi con il tampone di lavaggio. Nell'ultimo passaggio si pone la membrana nella soluzione di sviluppo: la perossidasi, coniugata all'anticorpo secondario, reagisce con il perossido d'idrogeno (H_2O_2), presente in soluzione, liberando O_2 , che provoca l'ossidazione del DAB (diaminobenzidina), il quale, ossidato, produce un precipitato rosso scuro in corrispondenza delle bande di interesse.

La reazione viene bloccata con l'aggiunta di acqua distillata.

Il tampone di trasferimento (900 ml di H_2O + 100 ml di metanolo) è costituito da: Glicina 1.44%, Tris 0.3%, SDS 0.01 %.

Il tampone di lavaggio è costituito da: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0

Il tampone di incubazione è costituito da: 50 ml di tampone di lavaggio e TWEEN 20 0.5%.

La soluzione di sviluppo è costituita da: 20 ml Tris 50 mM pH 7.5, una punta di spatola di DAB e 20 μ l H_2O_2 40 %.

- 2.29 -PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2-GST

La frazione insolubile del lisato cellulare indotto, è stata incubata per 15 minuti con una soluzione di DTE 100 mM e in seguito solubilizzata con un tampone contenente 3 M urea, 0.8% di sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 e centrifugato a 12000 x g a 4°C. Il sovranatante (1ml) è stato caricato su una colonna precedentemente riempita con resina Profinity IMAC Ni⁺-charged (0.5 cm di diametro, 2.5 cm di altezza), pre-equilibrata con un tampone contenente 0.1 % sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.4. L'eluizione è stata ottenuta in seguito all'aggiunta di 3 mL di tampone contenente 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 e in seguito 3 ml dello stesso tampone contenente 50 mM imidazolo. Sono state raccolte 12 frazioni cromatografiche e la proteina purificata è stata rilevata nella frazione 10.

-2.30-PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE hOCTN2(R2K)

La frazione insolubile del lisato cellulare indotto, è stata incubata per 15 minuti con una soluzione di DTE 100 mM e in seguito solubilizzata con un tampone contenente 3 M urea, 0.8% di sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 e centrifugato a 12000 x g a 4°C. Il sovrantante (1ml) è stato caricato su una colonna precedentemente riempita con resina His-select Ni-chelating affinity gel (0.5 cm di diametro, 2.5 cm di altezza), pre-equilibrata con un tampone contenente 0.1 % sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. L'eluizione è stata ottenuta in seguito all'aggiunta di 3 mL di tampone contenente 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 ed in seguito 3 ml dello stesso tampone contenente 50 mM imidazolo. Sono state raccolte 15 frazioni cromatografiche e la proteina purificata è stata rilevata nella frazione 14.

-2.31- PRODUZIONE DI VETTORI RETROVIRALI E RETROTRASDUZIONE DI CHERATINOCITI PRIMARI

L'approccio sperimentale utilizzato nella creazione di una linea cellulare in grado di esprimere stabilmente le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16 consiste nell'infezione retrovirale. Il DNA codificante per le proteine E6 ed E7 è stato clonato nel vettore retrovirale pLXSN (Clontech) G418 resistente. Tale costrutto, insieme al pLXSN di controllo viene utilizzato per la retrotrasfezione nelle cellule di packaging, Phoenix (cellule utilizzate per la produzione di virus anfotropici). La retrotrasfezione è effettuata, nel laboratorio di sicurezza L3, utilizzando il "CalPhos Mammalian transfection kit" (BD- Biosciences) secondo il seguente protocollo:

- Giorno 0: piastrare le Phoenix in dishes con un diametro di 10 cm in modo che raggiungano una confluenza del 50- 70% il giorno della trasfezione;
- Giorno 1: TRASFEZIONE. La preparazione dei complessi avviene usando 10-15 µg di DNA plasmidico, 62 µl di CaCl₂ 2M, H₂O fino a 440 µl e aggiungendo 500 µl di HBS (2X). La funzione dell'HBS insieme al CaCl₂ è quella di creare pori nella

membrana cellulare delle Phoenix e di veicolare il DNA da trasferire all'interno. Prima dell'aggiunta dei complessi, le cellule vengono poste in 5 ml di mezzo di coltura addizionato con Clorachina 25 μ M. La funzione della clorachina è quella di degradare le DNAasi in modo da aumentare l'efficienza della retrotrasfezione e quindi il titolo virale. La clorachina diventa, tuttavia, tossica per le cellule; dopo 6/8 ore, quindi, il mezzo deve essere cambiato e le cellule lavate due volte con PBS 1X.

- Giorno 2: 24 ore dopo la trasfezione, il mezzo delle cellule viene nuovamente cambiato, senza effettuare il lavaggio in PBS.
- Giorno 3: 48 ore dopo la trasfezione, il mezzo di coltura della cellule contiene il titolo virale più alto. In queste condizioni, quindi, il mezzo viene raccolto, passato due volte attraverso filtri 0.22 μ M ed usato per infettare i cheratinociti primari. L'infezione dei cheratinociti primari viene effettuata, normalmente, in flaconi di coltura da 25 cm²: viene eliminato il mezzo di coltura dei cheratinociti ed aggiunta la sospensione contenente il virus, addizionato di polibrene 5 μ g/ml. La funzione del polibrene è quella di facilitare l'adesione del virus alle membrane delle cellule e, quindi, di aumentare l'efficienza di infezione. Dopo 3 ore dall'infezione il mezzo contenente il virus viene sostituito con quello specifico per i cheratinociti.
- Giorno 4: le cellule infettate vengono poste in selezione con l'antibiotico desiderato (nel caso del pLXSN 0.5 mg di G418) per 5-6 giorni. La selezione consente di identificare le cellule che, sopravvivendo al trattamento antibiotico, risultano positive all'infezione con le oncoproteine E6 ed E7. Quando il controllo non infettato è completamente morto, si considera terminata la selezione e le cellule vengono poste nel normale laboratorio di coltura cellulare (livello di sicurezza L1).

La linea cellulare Phoenix (derivata dalle HEK 393 T) cresce in adesione e viene mantenuta in coltura in un mezzo costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con glucosio 4.5 g/L, FCS 10%, Glutamina 1 mM ed antibiotici Penicillina/Streptomicina 1X.

I cheratinociti, provenienti da biopsie di prepuzio umano, sono cellule che crescono in adesione insieme a fibroblasti murini (NIH3T3), da considerarsi un "sostegno" dei cheratinociti stessi: ciò consente di mimare le condizioni fisiologiche. Il mezzo di coltura è così costituito: un quarto di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), tre quarti di Ham's F12, FCS (Fetal Calf Serum) 2.5%, idrocortisone 0.4 µg/ml, tossina colerica 8.4 ng/ml, insulina 5 µg/ml, adenina 24 µg/ml, Epidermal Growth Factor 10 ng/ml, antibiotici penicillina/streptomicina 1X.

Le cellule vengono tripsinizzate quando raggiungono, circa, l'80% di confluenza previa rimozione dello strato di feeder mediante lavaggio con PBS-EDTA 0.02%. Il numero di doubling population viene calcolato tenendo in considerazione il numero di passaggi in coltura e lo "split ratio".

-2.32- COLTURA DI LINEE CELLULARI TUMORALI UMANE E TRATTAMENTO DEMETILANTE DEL DNA

Linee cellulari provenienti da tumori della testa e del collo (HNC 41, 91, 97, 124, 136, 150, 160, 199, 206, 211, 212) sono state mantenute in coltura nel mezzo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato con FCS 10%, Glutamina 1 mM, Piruvato di sodio 1 mM, antibiotici Penicillina/Streptomicina e Ciproxina 1X.

Linee cellulari provenienti da tumori al seno (HBL-100, HCC1937, Cal 51) sono state mantenute in coltura in un mezzo costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e Ham's F12 in parti uguali addizionato con FCS 10%, Glutamina 1 mM, Piruvato di sodio 1 mM, antibiotici Penicillina/Streptomicina e Ciproxina 1X.

Linee cellulari provenienti da tumori al colon (TC-7, LoVo, Co-115) sono state mantenute in coltura nel mezzo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato con FCS 20%, Glutammina 1 mM, antibiotici Penicillina/Streptomicina e Ciprossina 1X.

Il trattamento demetilante del DNA genomico è stato effettuato su tutte le linee cellulari sopra riportate, insieme ad HPK dp 9 e HPH 16 E6E7 dp 145, utilizzando il reagente 5- AZA-citidina (Sigma) alla concentrazione di 30 μ M solubilizzato in DMSO. Le cellule sono state piastrate in dishes dal diametro di 60mm in modo da avere una confluenza del 30% all'inizio del trattamento il giorno seguente. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 24 ore per quattro giorni e nelle piastre di controllo è stato aggiunto DMSO. Alla fine del trattamento le cellule sono state lisate direttamente in piastra con il buffer di lisi del kit dell'estrazione dell'RNA in presenza di 2-mercaptoetanololo e conservate a -80°C per 24 ore prima dell'estrazione dell'RNA totale.

Gli esperimenti in cui è stata indotta l'espressione di hOCTN2 sono stati condotti in trasfezione transiente nei cheratinociti retrotrasdotti con HPV16 E6E7.

Questa procedura sperimentale prevede l'utilizzo, come agente trasfettante, di lipofectamina (Invitrogen). Tale composto è in grado di veicolare molecole di DNA, ma non di RNA, dall'esterno all'interno delle cellule in presenza di un mezzo privo di siero, OptiMEM (Gibco). I cheratinociti sono un modello cellulare in cui l'efficienza di trasfezione è molto bassa (raggiunge al massimo il 30%) per cui il protocollo di trasfezione è stato messo a punto piastrando le cellule in modo da ottenere una confluenza di circa 80% al momento della trasfezione. Nel caso del trattamento con il cisplatino le cellule sono state trasfettate in piastre, 10 cm di diametro, con 3 μ g di costrutto pCDNA3-OCTN2 e pCDNA3 vuoto come controllo e, dopo otto ore dal momento della trasfezione, sono state passate in piastre più piccole con 60 mm di diametro. Dopo 12 ore dal momento della trasfezione il mezzo di coltura è stato addizionato con concentrazioni crescenti di cisplatino (10, 25, 50 100 e 200 μ M) per ulteriori 24 ore, al termine delle quali sono state tripsinizzate e contate con il metodo del tripan blu.

-2.33–ANALISI DEI DATI MEDIANTE REAL TIME PCR QUANTITATIVA

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule trattate con 5-AZA-citidina e DMSO, utilizzando il kit “Absolutely RNA miniprep kit” (Stratagene) secondo le istruzioni del manuale. In seguito il cDNA è stato sintetizzato usando il kit “RevertAid Hminus First Strand cDNA synthesis” (Fermentas) a partire da 1 µg di RNA totale con random hexaprimers e la trascrittasi inversa di Molony Murine Leukemia Virus. Per valutare l'espressione dei geni E6 ed E7 di HPV16, hOCTN2 e GAPDH in real time PCR quantitativa sono stati usati i seguenti primers: 5' GTT TCA GGA CCC ACA GGA GC 3' e 5' GCA TAA ATC CCG AAA AGC AAA G 3' per E6; 5'- AAT TCA TGG CGA CAC CAA-3' e 5'- TTT GCA ATA AAG GTC TGT- 3' per E7; 5' GCC AAA AGG GTC ATC ATC 3' e 5' TGC CAG TGA GCT TCC CGT TC 3' per GAPDH; 5' CC AAA GCC AAT GGG ATT GTT 3' e 5'CT GTT GCT TCT TGG AAC TTA GGT CTT 3' per OCTN2.

Le analisi di Real Time PCR di tipo quantitativo sono state effettuate usando “MesaGreen qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay” (Eurogentec) secondo il seguente protocollo per ogni campione:

- 10 µl di Master Mix;
- 0.4 µl di primer Fw 200 nM;
- 0.4 µl di primer Rev 200 nM;
- 9.2 µl di cDNA alle diluizioni scelte per la curva di taratura.

La reazione di PCR è stata effettuata in “96 well plate low profile” nel sistema Stratagene MX3000 ed analizzata con il software MXPRO di Stratagene secondo il metodo del calibrator.

CAPITOLO 3. RISULTATI

-3.1- INATTIVAZIONE DA PARTE DELL'OMEPRAZOLO DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 DI RATTO RICOSTITUITO IN LIPOSOMI

-3.1.1-INIBIZIONE DEL TRASPORTATORE DI CARNITINA

In questo lavoro di tesi è stato investigato l'effetto dell'omeprazolo sul trasportatore di carnitina ricostituito in liposomi. L'attività di trasporto è stata misurata come uptake di ^3H -carnitina $10\ \mu\text{M}$ in proteoliposomi contenenti carnitina fredda $10\ \text{mM}$, (antiport omologo carnitina /carnitina) in presenza di omeprazolo aggiunto all'esterno previa, o no, attivazione acida a pH 1.0 (Bim et al 1985; Besancon et al 1997; Shin et al 2004) e mantenuto in buffer a pH 7.0 prima dell'uso.

Come descritto in precedenza (Pochini et al 2004), l'accumulo di ^3H -carnitina nei proteoliposomi è dipendente dal tempo: aumenta fino a $1.7\ \text{nmol/mg proteina}$ a 90 minuti.

L'omeprazolo attivato, alla concentrazione di $30\ \mu\text{M}$, inibisce nettamente il trasporto: dopo 15 minuti è stata, infatti, registrata una inibizione del trasporto dell'80% che diminuisce al 70% dopo 90 minuti; l'aggiunta di omeprazolo non attivato, al contrario, non ha mostrato quasi alcun effetto inibitorio.

I dati sperimentali riportati in figura 1 sono stati interpolati con un'equazione di velocità del primo ordine dalla quale è stata calcolata la velocità del trasporto come prodotto tra la costante κ del trasporto ed il trasporto all'equilibrio. La velocità iniziale del trasporto in presenza ed assenza di omeprazolo è risultata essere 0.0017 o $0.08\ \text{nmol min}^{-1}\ \text{mg proteina}^{-1}$, rispettivamente.

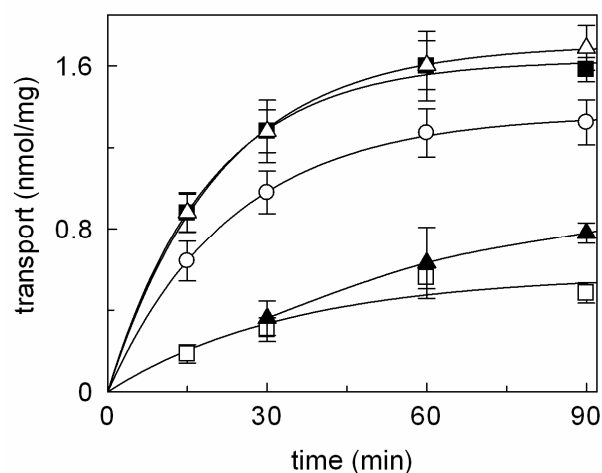
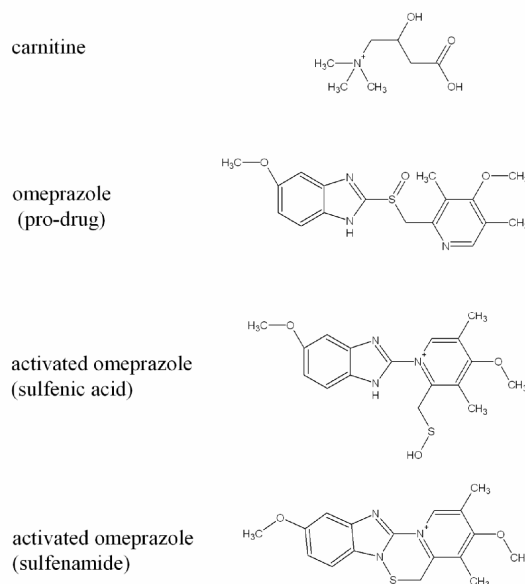


Figura 1: Effetto dell'omeprazolo sull'antiport di carnitina mediato dal trasportatore ricostituito: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ^3H -carnitina 10 μM e NaCl 50 mM a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 10 mM in assenza (Δ , \blacksquare) o in presenza di omeprazolo 30 μM attivato (\square , \blacktriangle) o non attivato (\circ). In \blacksquare e \blacktriangle , è stato aggiunto, 2 minuti prima dell'inizio del trasporto, DTE 2 mM. 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

Le due forme di omeprazolo attivato presentano gruppi funzionali, come mostrato in figura 2, che possono interagire con i residui di cisteina del trasportatore formando un disulfide misto come era stato già descritto per la pompa gastrica H^+/K^+ -ATPasi.



Uno o più residui di cisteina del trasportatore della carnitina sono esposti nel versante esterno dei proteoliposomi, corrispondente al versante extracitosolico nella cellula intatta. Questi gruppi funzionali potrebbero essere, dunque, quelli implicati nel meccanismo di inibizione dell'omeprazolo mediante la formazione di disolfidi misti.

Per dimostrare tale ipotesi, è stato testato l'effetto del DTE, agente riducente dei ponti disolfuro: l'aggiunta di DTE a proteoliposomi trattati con omeprazolo attivato dopo 30 minuti, porta ad un recupero parziale dell'attività di trasporto, mentre non ha alcun effetto su proteoliposomi non trattati da omeprazolo. Tale effetto risulta ancora più evidente dopo 90 minuti di trasporto, con un recupero dell'attività di trasporto di circa il 50% (figura 1).

L'effetto dell'omeprazolo è stato valutato anche in vescicole di brush border intatte: in tale sistema l'attività di trasporto è stata misurata come trasporto di ^3H -carnitina 0.25 mM, in 2 minuti, in vescicole pre- equilibrate con 2.5 mM di carnitina non triziata. Come mostrato in figura 3, l'omeprazolo inibisce il trasporto di carnitina efficientemente ed il DTE permette il recupero dell'attività di trasporto nei campioni trattati con omeprazolo. Tali risultati sono paragonabili a quelli ottenuti nel sistema ricostituito. Sono state, tuttavia, riscontrate alcune differenze quantitative legate al fatto che i due modelli sperimentali sono diversi sia in termini di volume interno che di proteine presenti: nelle vescicole intatte ci sono, ovviamente, molti più trasportatori di quelli presenti nei proteoliposomi dove, virtualmente, non esistono interferenze da parte di altri sistemi di trasporto (Pochini et al 2004; Piermatti et al 2008).

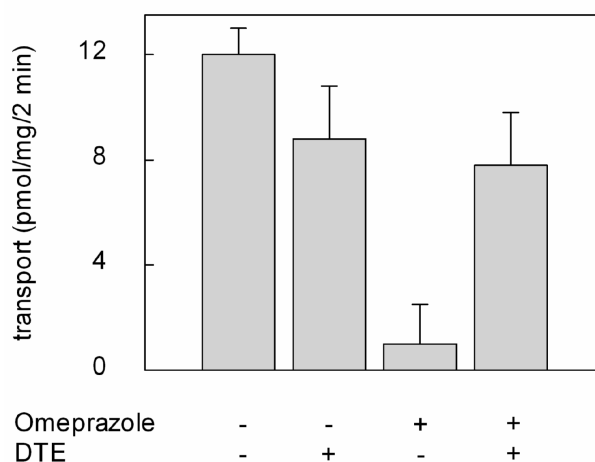


Figura 3: Effetto dell'omeprazolo sul trasporto di carnitina in vescicole di brush border intatte: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ^3H -carnitina 250 μM e NaCl 50 mM a tempo zero all'esterno delle vescicole di brush-border contenenti carnitina 2.5 mM. Il trasporto è stato inibito dopo 2 minuti come descritto in Materiali e Metodi. L'omeprazolo attivato 30 μM e/o il DTE 30 μM sono stati aggiunti dove indicati da (+) 30 secondi prima dell'inizio del trasporto. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti

Il mancato recupero totale dell'attività di trasporto da parte del DTE può essere spiegato secondo due ipotesi: (i) il DTE può risolvere solo i disolfuri misti formati tra proteina ed omeprazolo e (ii) l'omeprazolo non legato può, comunque, avere un effetto inibitorio attraverso interazioni di tipo non covalente.

Per discriminare l'inibizione del trasporto causata dall'interazione covalente da quella non covalente, è stata misurata l'attività residua di trasporto dopo incubazione dei proteoliposomi con l'inibitore e successiva rimozione dello stesso non legato.

In tal caso, l'esperimento è stato condotto come descritto per altri trasportatori (Pochini et al 2004; Oppedisano et al 2008) dopo trattamento con omeprazolo, i proteoliposomi sono stati passati su colonne Sephadex G-75 per eliminare l'omeprazolo che non avesse interagito con la proteina e, quindi, è stata misurata l'attività di trasporto. I risultati sono riportati in figura 4: i proteoliposomi incubati con omeprazolo 30 μM mostrano una chiara inibizione (80% dopo 15 minuti e 48% dopo 90 minuti) anche dopo rimozione dell'inibitore non legato, confermando che questa inibizione è

dovuta alle interazioni covalenti con la proteina. Nessuna inibizione, invece, è stata registrata in proteoliposomi trattati con DTE prima del passaggio sulle colonne Sephadex, indicando che tutto l'inibitore viene eliminato dal passaggio sulle colonne cromatografiche e che il DTE è in grado di ridurre e risolvere tutti i legami covalenti tra omeprazolo ed OCTN2; l'aggiunta di DTE a campioni di controllo non trattati da omeprazolo non ha mostrato alcuna differenza nell'attività di trasporto paragonata al controllo senza omeprazolo né DTE.

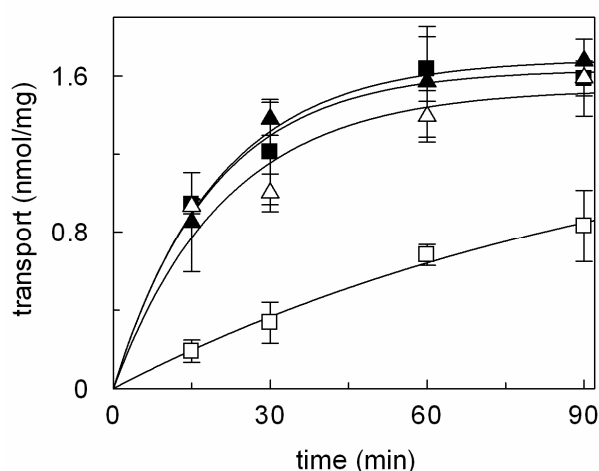


Figura 4: Effetto dell'omeprazolo legato covalentemente sull'antiporto di carnitina mediato dal trasportatore ricostituito: I proteoliposomi sono stati incubati con omeprazolo 30 μ M attivato (□, ▲) o con il solo buffer (Δ, ■). Il DTE 2 mM (■, ▲) è stato aggiunto dopo 2 minuti. Dopo 2 minuti tutti i campioni di proteoliposomi sono stati passati nuovamente su Sephadex G-75 come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo 3 H-carnitina 10 μ M e NaCl 50 mM a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 10 mM. 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.

Come precedentemente mostrato in figura 1, tuttavia, è stato possibile registrare l'inibizione da omeprazolo, anche dopo trattamento con l'agente riducente, se l'inibitore non viene eliminato dai proteoliposomi. Questa osservazione sembra confermare l'ipotesi che esista una interazione di tipo non covalente tra l'omeprazolo ed il sistema di trasporto. È stata studiata, dunque, la dipendenza del recupero dell'attività di trasporto dalla concentrazione di DTE. Il recupero dell'attività di trasporto, come mostrato in figura 5, presenta una cinetica dipendente dalla

concentrazione di DTE extraliposomiale, con un picco massimo quando la concentrazione di DTE raggiunge 5 mM.

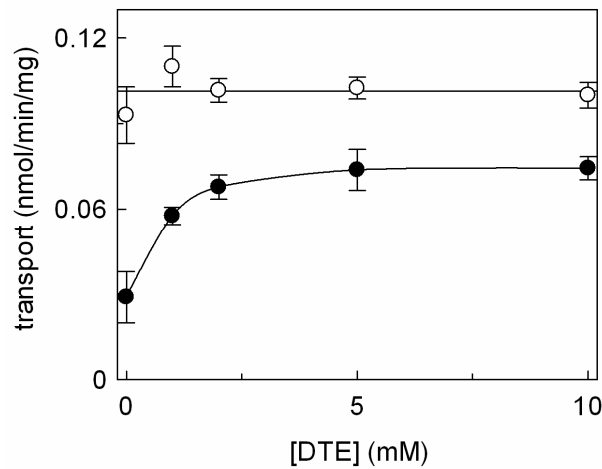


Figura 5: Dipendenza dell'attività di trasporto del sistema ricostituito dalla concentrazione di DTE: Il DTE è stato aggiunto alle concentrazioni indicate a proteoliposomi protrattati (●) o meno (○) con omeprazolo attivato 30 μ M per 2 minuti, trascorsi i quali il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo 3 H-carnitina 10 μ M e NaCl 50 mM a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 10 mM. Il trasporto è stato inibito dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Tale recupero, tuttavia, non è risultato essere del 100% o, comunque, paragonabile al controllo. La differenza rappresenta la frazione di inibizione dovuta all'interazione non covalente; trattando infatti, un'aliquota di proteoliposomi con omeprazolo 30 μ M e DTE 5 mM e, successivamente, passandoli su colonna Sephadex G-75, l'attività di trasporto viene completamente recuperata.

-3.1.2- CINETICA DI INIZIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 DA PARTE DELL'OMEPRAZOLO

Per caratterizzare i due meccanismi di interazione con il sistema di trasporto OCTN2 dell'omeprazolo, sono stati condotti esperimenti di cinetica in presenza ed assenza di DTE. L'agente riducente è stato utilizzato alla concentrazione di 5 mM, quella cioè che mostrava il massimo del recupero dell'attività di trasporto (figura 5). È stata studiata, dunque, la dipendenza

dell'inibizione dalla concentrazione extraliposomiale di omeprazolo, misurando la velocità di antiport, come uptake di ^3H -carnitina $10\ \mu\text{M}$ in proteoliposomi contenenti carnitina $10\ \text{mM}$.

La curva dose- risposta è mostrata in figura 6: la completa inibizione del trasporto, in assenza di DTE, è stata osservata quando la concentrazione di omeprazolo raggiunge il valore di $100\ \mu\text{M}$ con una IC_{50} di $5.7 \pm 0.23\ \mu\text{M}$ (media di tre esperimenti indipendenti); in presenza di DTE, invece, l'inibizione è risultata essere meno pronunciata con una IC_{50} di $20.4 \pm 4\ \mu\text{M}$ (media di tre esperimenti indipendenti). Lo stesso esperimento condotto con omeprazolo non attivato non mostra quasi alcuna inibizione dell'attività di trasporto.

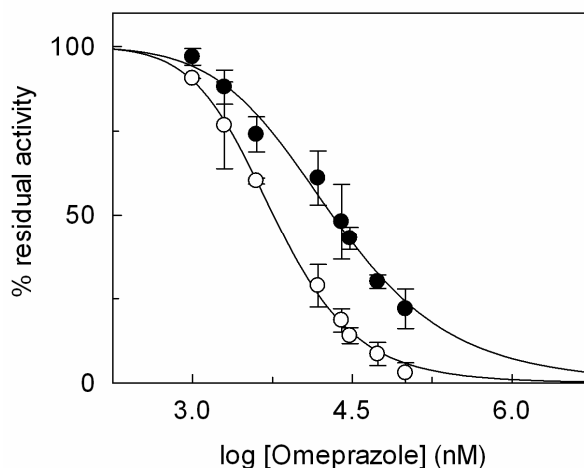


Figura 6: Effetto dell'omeprazolo sul sistema di trasporto ricostituito: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ^3H -carnitina $10\ \mu\text{M}$, NaCl $50\ \text{mM}$ e le indicate concentrazioni di omeprazolo a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina $10\ \text{mM}$ in presenza (●) e assenza (○) di DTE $5\ \text{mM}$. Il trasporto è stato inibito dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Sono stati condotti, successivamente, esperimenti rivolti alla caratterizzazione cinetica dell'inibizione del trasporto da parte dell'omeprazolo, misurando la velocità del trasporto in presenza di due diverse concentrazioni di omeprazolo attivato.

I dati sono stati analizzati secondo l'equazione dei doppi reciproci di Lineweaver- Burk.

Nel caso dell'esperimento condotto in assenza dell'agente riducente DTE, come mostrato in figura 7 A, le tre rette hanno un comune punto di intersezione sull'asse delle ascisse; questo aspetto è tipico dell'inibizione non competitiva: la costante di affinità del trasportatore per l'inibitore (K_i) è risultata essere di $5.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ (media di tre esperimenti indipendenti). Lo stesso esperimento è stato condotto in presenza di DTE (figura 7 B): anche in questo caso i risultati sono stati interpolati secondo l'equazione di Lineweaver- Burk, mostrando, tuttavia, una cinetica di inibizione differente dalla precedente; le tre rette infatti hanno un comune punto di intersezione con l'asse delle ordinate, tipico dell'inibizione competitiva. La K_i calcolata come media di tre esperimenti indipendenti è risultata essere di $14.6 \pm 1.9 \mu\text{M}$.

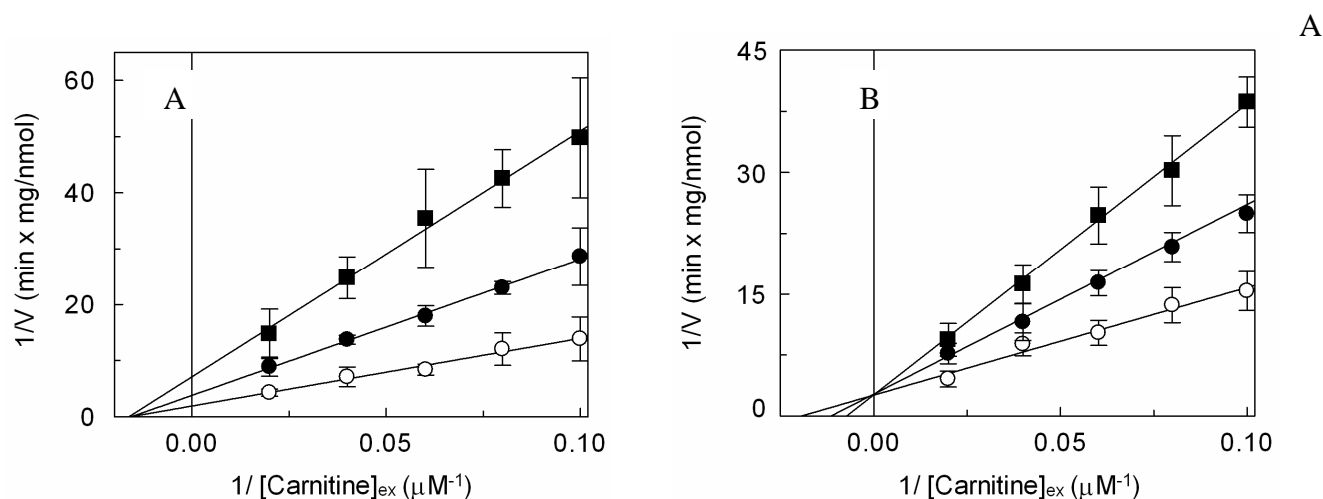


Figura 7: Analisi cinetica dell'inibizione dell'omeprazolo del sistema di trasporto ricostituito: Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo ³H-carnitina alle indicate concentrazioni, NaCl 50 mM e le indicate concentrazioni di omeprazolo a tempo zero all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 10 mM in presenza (B) e assenza (A) di DTE 5 mM. I dati sperimentali sono stati interpolati secondo l'equazione dei doppi reciproci di Lineweaver- Burk in assenza (○) o in presenza di omeprazolo attivato 6 μM (●) e 12 μM (■) in A, 12 μM (●) e 24 μM (■) in B. Il trasporto è stato inibito dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Gli stessi dati sperimentali sono stati analizzati utilizzando il metodo di Dixon (Dixon 1953), dimostrando che l'inibizione competitiva riscontrata è completa: il grafico ottenuto è,

infatti, di tipo lineare, diverso dalla condizione in cui l'inibizione competitiva è incompleta (Dixon 1953; Pochini et al 2004, Tonazzi et al 2005; Oppedisano et al 2008).

È stato valutato, successivamente, l'effetto protettivo della presenza di carnitina extraliposomiale durante l'incubazione con l'omeprazolo, in assenza di DTE. Sorprendentemente, in presenza di carnitina si osserva un'aumento dell'inibizione da parte dell'omeprazolo: dal 30 % in assenza di carnitina al 50% e 70% in presenza di carnitina 1 mM e 15 mM, rispettivamente, aggiunti all'esterno dei proteoliposomi insieme all'omeprazolo 30 μ M (figura 8).

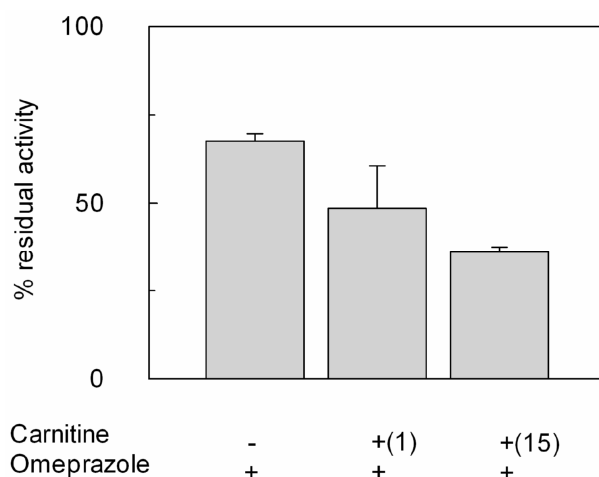


Figura 8: Influenza del substrato sull'inibizione del trasportatore ricostituito da parte dell'omeprazolo: I proteoliposomi sono stati trattati come descritto nella figura prima del trasporto: la carnitina alle concentrazioni mM indicate dalle parentesi in presenza o assenza di omeprazolo attivato 20 μ M dove indicato da (+). Tutti i campioni sono stati passati su colonne Sephadex G-75 per rimuovere il substrato che non avesse interagito. Il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo 3 H-carnitina 10 μ M e NaCl 50 mM all'esterno di proteoliposomi contenenti carnitina 10 mM Il trasporto è stato inibito dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti ed indicano la percentuale di attività residua rispetto al controllo.

L'effetto dell'omeprazolo sul lato interno del trasportatore, in assenza di DTE, non è stato studiato, a causa di un limite della procedura sperimentale: l'agente farmacologico, infatti, viene aggiunto nella miscela di ricostituzione ed in tali condizioni, l'omeprazolo attivato può interagire con tutti i residui di cisteina del trasportatore prima della ricostituzione e, quindi, dell'inserimento della proteina nei liposomi. È stato, quindi, valutato l'effetto dell'omeprazolo solo in presenza di

DTE nella miscela di ricostituzione, in condizioni in cui non potesse avere alcuna interazione di tipo covalente con il trasportatore.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la velocità di trasporto misurata in presenza di concentrazioni crescenti di omeprazolo intraliposomiale (in un range da 1 μ M ad 1mM) non ha risentito di alcuna variazione.

-3.1.3- VALUTAZIONE DEL TRASPORTO DI OMEPRAZOLO

Considerando che l'interazione tra l'omeprazolo ed il sistema di trasporto OCTN2 può avvenire nel sito di legame per il substrato, è stata valutata l'ipotesi che l'omeprazolo potesse essere, esso stesso, substrato di tale sistema di trasporto.

OCTN2 media un antiport omologo quindi il trasporto di omeprazolo è stato misurato usando come contro-substrato ³H-carnitina. Questa strategia era stata già, in precedenza, messa a punto per valutare il trasporto di altri composti, in scambio con la carnitina, da parte di OCTN2 (Pchini et al 2004; Permiatti et al 2008). Tali esperimenti sono stati condotti incubando i proteoliposomi con ³H-carnitina in modo da garantire un uptake della stessa all'interno delle vescicole fino al raggiungimento dell'equilibrio (dopo 90 minuti); al termine dell'incubazione, i proteoliposomi contengono, quindi, ³H-carnitina 10 mM. La misurazione dell'attività di trasporto, in efflusso, è stata effettuata aggiungendo all'esterno carnitina fredda o omeprazolo 0.5 mM insieme a NaCl 50 mM.

I risultati sono riportati in figura 9: l'aggiunta della carnitina ha causato l'efflusso della radioattività interna dovuto allo scambio ³H-carnitina/carnitina; l'omeprazolo, al contrario, non ha provocato nessuna variazione dell'efflusso in presenza ed in assenza di DTE.

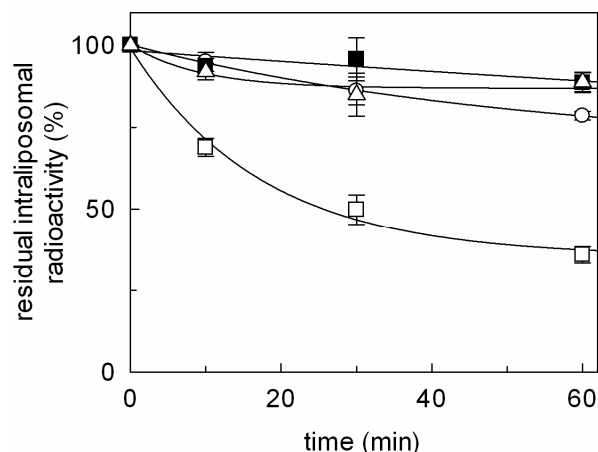


Figura 9: Efflusso di ^3H -carnitina mediato dal sistema ricostituito in presenza di omeprazolo extraliposomiale : I proteoliposomi sono stati premarcati come descritto in Materiali e Metodi. Dopo il secondo passaggio su Sephadex G-75, il trasporto è stato misurato come descritto in Materiali e Metodi aggiungendo NaCl 50 mM e carnitina 0.5 mM (□), omeprazolo attivato 0.5 mM (■), omeprazolo attivato 0.5 mM e DTE 5 mM (Δ) o solo buffer (○) all'esterno di proteoliposomi. Il trasporto è stato inibito dopo 15 minuti come descritto in Materiali e Metodi. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Questi dati sembrano indicare che l'omeprazolo non può essere trasportato dall'esterno all'interno dei proteoliposomi.

Sono stati condotti, dunque, gli stessi esperimenti misurando l'uptake di ^3H -carnitina in proteoliposomi contenenti 1.5 mM di omeprazolo o carnitina. In tali condizioni sperimentali la carnitina interna è stata usata a concentrazioni inferiori a quelle normali per essere paragonabile a quella dell'omeprazolo che non poteva essere aggiunto ai proteoliposomi a concentrazioni superiori ad 1.5 mM.

Anche in questo caso l'accumulo di carnitina radioattiva nei proteoliposomi è risultato essere paragonabile a quello in assenza di substrato e, in ogni caso, molto più basso di quello in cui la carnitina è presente all'interno dei proteoliposomi, dimostrando nuovamente che l'agente farmacologico non veniva trasportato dal sistema OCTN2.

-3.2- OVER-ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE IN *E.coli* DEL COSTRUTTO GST-hOCTN2

-3.2.1- OVERESPRESSIONE DEL COSTRUTTO GST-hOCTN2

Il cDNA relativo alla proteina hOCTN2 di 1674bp, è stato isolato dall'RNA totale di fibroblasti cutanei umani e, quindi, amplificato mediante PCR utilizzando primer costruiti secondo la sequenza di hOCTN2 contenuta in banca dati.

Dopo averne verificato la correttezza della sequenza, il cDNA isolato è stato clonato all'interno di diversi vettori di espressione quali il pET-28 a(+), il pMWT7, il pH6EX3 e il pET-22b(+). I vettori ricombinanti elencati sono stati utilizzati per trasformare diversi ceppi di *E. coli*, come il ceppo Rosetta(DE3)pLysS, il ceppo RosettaGami2(DE3)pLysS, il ceppo C41(DE3), il ceppo C43(DE3) ed il ceppo BL21(DE3). È stato, infine, utilizzato anche il vettore di espressione pGEX-4T1, che permette l'inserimento a monte del gene di interesse della Glutathione-S-Transferasi (GST), allo scopo di aumentare la solubilità della proteina over- espressa e di essere utilizzato nella purificazione in condizioni non denaturanti usando come resina l'agarosio glutatione.

Il costrutto è stato utilizzato per trasformare differenti ceppi di *E. coli* in diverse condizioni di espressione. La proteina over- espressa, tuttavia, è stata sempre identificata nella frazione insolubile del lisato cellulare. Tale risultato ha impedito l'utilizzo di detergenti non denaturanti nella solubilizzazione della proteina di interesse rendendo impossibile la purificazione con la resina agarosio- glutatione.

Per questo motivo, il cDNA codificante per la proteina hOCTN2, è stato clonato all'interno del vettore di espressione pET-41a(+) che permette l'inserimento di una coda di poli-istidina, tra la proteina di interesse e GST, utile alla purificazione del trasportatore over-espresso in condizioni

denaturanti. Il costrutto pET41a(+)-hOCTN2, è stato, dunque, utilizzato per trasformare il ceppo batterico Rosetta(DE3)pLysS.

Per ottimizzare l'espressione della proteina di interesse, sono state variate sia la temperatura che il tempo di induzione, ottenendo la migliore espressione mantenendo le cellule in coltura a 28°C, inducendo l'espressione con IPTG 0.4 mM ed aggiungendo il mezzo di coltura con sorbitolo 1M e betaina 2.5 mM. Questa strategia ha permesso di creare uno shock osmotico alla cellula ospite con conseguente over- espressione del trasportatore hOCTN2-GST (Figura 10).

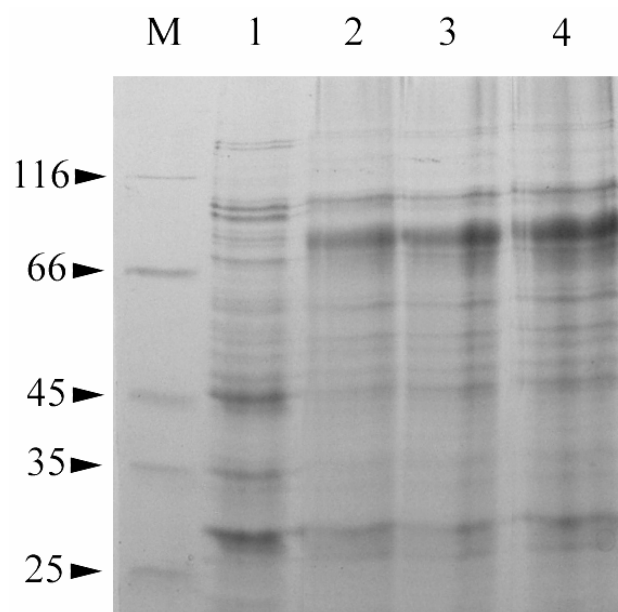


Figura 10 Espressione del costrutto pET41a(+)-hOCTN2 in *E.coli* Rosetta (DE3). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1 lisato cellulare non indotto (30 µg); linee 2-4, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 µg) dopo 2, 4 e 6 ore dall'induzione rispettivamente.

-3.2.2- PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA OVER-ESPRESSA GST-hOCTN2

La proteina over-espressa GST-hOCTN2 è stata solubilizzata, come nel caso del trasportatore hOCTN1, con il detergente denaturante Sarkosyl, alla concentrazione 0.8%, poiché non solubile in detergenti non ionici come Triton X-100 e C₁₂E₈.

Il lisato cellulare (Figura 10 linea 1) è stato, dunque, trattato con un tampone contenente Urea 3 M, 0.8% Sarkosyl, 8 mM DTE. In seguito a centrifugazione per 5 minuti a 6000 g, la proteina presente nella frazione solubile è stata caricata sulla colonna cromatografia al Nichel.

Ques'ultima è stata, successivamente, lavata con 10 ml di un tampone contenente Tris/HCl 20 mM pH8.5, Triton X-100 0.1%, NaCl 200 mM e DTE 5mM e poi altri 5 ml dello stesso tampone addizionato di Imidazolo 10 mM per rimuovere le proteine batteriche eventualmente legate in maniera aspecifica alla colonna.

L'eluizione della proteina GST-hOCTN2 è stata ottenuta con lo stesso tampone di quello usato in precedenza, in cui è stato aggiunto Imidazolo 50 mM. Come mostrato in Figura 11 la proteina è stata completamente purificata dal resto del pattern proteico e risulta essere arricchita circa 10 volte rispetto al lisato cellulare.

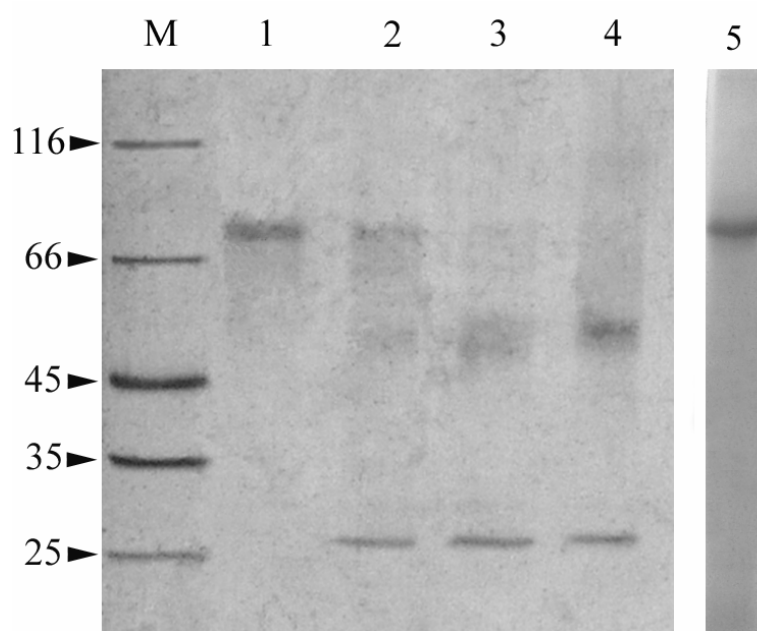


Figura 11 Purificazione e taglio mediante trombina del costrutto GST-hOCTN2. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, proteina di fusione purificata (10 µg); linee 2-4, proteina corrispondente alla linea 1 dopo incubazione 1, 3 e 4 ore con trombina, rispettivamente. Linea 5, Immunodecorazione DAB utilizzando un anticorpo anti-His (1:1000) su membrana PVDF dopo western blotting del campione della linea 1.

-3.2.3- TRATTAMENTO CON LA TROMBINA E SEPARAZIONE DI hOCTN2 DA GST

La proteina purificata, è stata incubata con la trombina al fine di separare la proteina di interesse, hOCTN2 dalla proteina di fusione GST, essendo presente una sequenza riconosciuta da tale enzima tra le due sequenze proteiche.

È stato ottimizzato il tempo di reazione per ottenere la completa separazione e, come è possibile osservare nella figura 11, la si ottiene dopo 4 ore di incubazione a 25°C con 0.1 U di trombina.

La frazione digerita con la trombina è stata, successivamente, sottoposta a cromatografia per esclusione molecolare e, come mostrato nella figura 12, completamente separata da GST. Al termine della procedura di purificazione, sono stati ottenuti 0.2 mg di proteina purificata per litro di coltura cellulare.

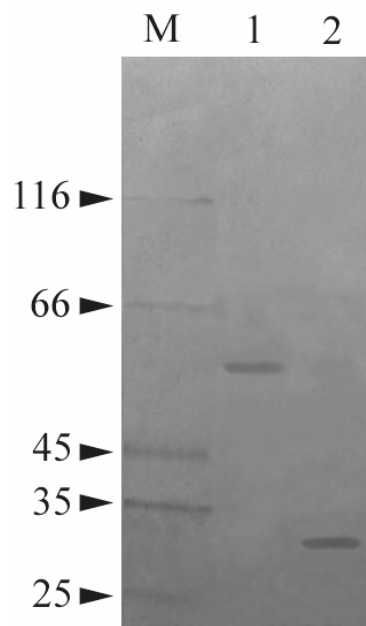


Figura 12 Purificazione della proteina over-espressa hOCTN2. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1 hOCTN2; linea 2, GST.

-3.2.4- OVERESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DEL COSTRUTTO hOCTN2

(R2K)

Allo scopo di over- esprimere il trasportatore hOCTN2, senza la proteina di fusione GST, è stata utilizzata un'altra strategia basata sulla conoscenza della frequenza di utilizzo di determinati codoni in *E. coli* rispetto a quello degli organismi eucariotici. Nel caso specifico è stato cambiato il secondo codone del cDNA codificante per hOCTN2 (il wild-type CGG con la tripletta AAA). Tale cambiamento ha condotto ad una sostituzione conservativa dell' amminoacido arginina in lisina; si tratta, infatti, di una mutazione che non produce variazioni nel rapporto struttura/ funzione.

Il cDNA di hOCTN2 è stato, successivamente, clonato all'interno del vettore di espressione pET-21a(+). Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS, con conseguente over- espressione della proteina di interesse. La migliore condizione di espressione si riscontra, come evidenziato in figura 13, dopo 4 ore di induzione della sintesi proteica, con IPTG 0.1 mM alla temperatura di 28°C.

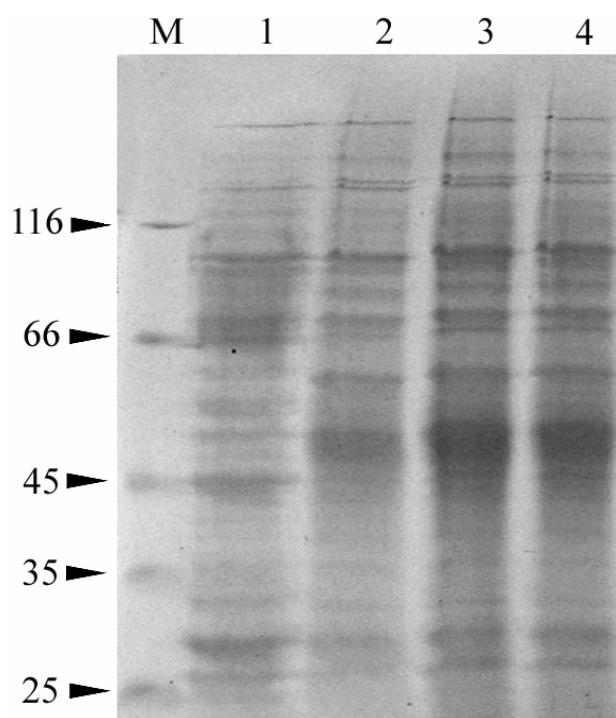


Figura 13 Espressione del costrutto ricombinante pET21a(+)-hOCTN2 in *E.coli* Rosetta (DE3)pLysS. Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, lisato cellulare non indotto (30 µg), linee 2-4, pellet della frazione insolubile (30 µg) dopo 1, 2, e 4 ore dopo l'induzione della sintesi proteica rispettivamente.

Anche in questo caso, tuttavia, la proteina over- espressa è presente nella frazione insolubile del lisato indotto. La strategia di purificazione utilizzata nel caso di tale trasportatore è, pressoché, identica a quella messa a punto per il costrutto GST-hOCTN2. Le differenze sperimentali riguardano, principalmente, l'utilizzo di un pH differente dei tamponi (pH 8.0 anziché pH 8.5) e della concentrazione di imidazolo nel tampone di eluizione (100 mM anziché 50 mM).

Come mostrato nella figura 14, la massa molecolare apparente del trasportatore purificato risulta essere 54 kDa, coincidente con il peso molecolare della proteina ottenuta dal costrutto GST-hOCTN2, in seguito a digestione enzimatica.

La presenza di hOCTN2 all'interno del lisato cellulare indotto è stata verificata anche mediante immunodecorazione, utilizzando un anticorpo diretto contro la coda di poli-istidina (figura 14).

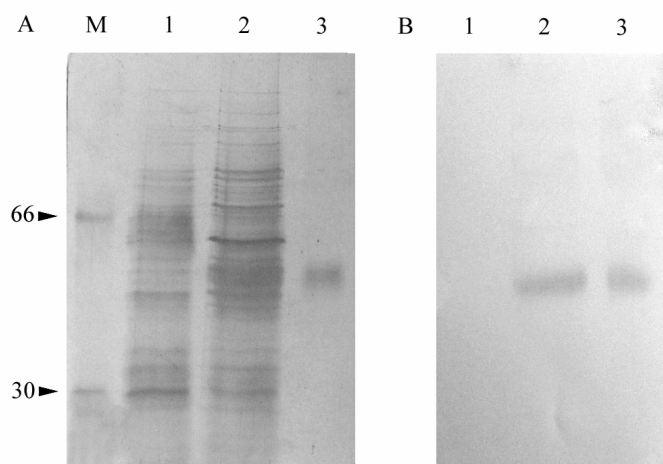


Figura 14 Purificazione della proteina hOCTN2(R2K). Le proteine sono state separate mediante SDS-Page e colorate come descritto in Materiali e metodi. (A) Linea M, markers molecolari come descritti in figura 1; linea 1, lisato cellulare non indotto (30 µg); linea 2, pellet della frazione insolubile del lisato cellulare (30 µg) corrispondente la linea 4 della figura 10; linea 3, hOCTN2 purificata (3 µg). (B) Immunodecorazione DAB utilizzando un anticorpo anti-His (1:1000) su membrana PVDF dopo western blotting dei campioni delle linee 1-3.

La resa totale della proteina purificata in questo caso risulta essere 3.5 mg per litro di coltura cellulare.

-3.3.- ESPRESSIONE DI hOCTN2 IN CHERATINOCITI RETROTRASDOTTI CON HPV16 E6 E7

La capacità di HPV16 E6E7 di immortalizzare i cheratinociti primari in coltura è ampiamente documentata in letteratura; questo sistema costituisce quindi, un buon modello per lo studio dei meccanismi molecolari che sottendono alla deregolazione di molte proteine cellulari. Per queste ragioni è stata valutata l'espressione del cDNA codificante per hOCTN2 in cheratinociti primari retrotrasdotti, o meno, con HPV16 E6E7.

La figura 15 A mostra il risultato di tre indipendenti RT-PCR di tipo quantitativo, dove è possibile osservare una netta down- regolazione dell'espressione di OCTN2 in presenza delle oncoproteine virali.

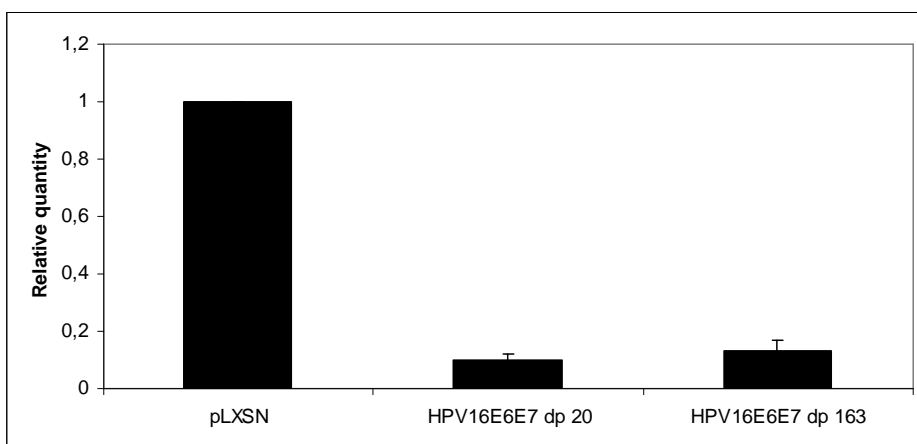


Figura 15 A: Down- regolazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in cellule infettate da HPV 16E6E7: I cheratinociti primari sono stati retrotrasdotti con pLXSN vuoto e pLXSNE6E7 e sono stati raccolti pellet a due diversi tempi dal momento dell'infezione (dopo 20 e 163 passaggi in coltura). L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi. RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

I numeri corrispondenti al raddoppiamento della popolazione (dp) indicano due momenti differenti dell'infezione da parte di HPV16. Gli effetti molecolari osservati negli stadi precoci dell'infezione, infatti, sono generalmente associabili alla diretta presenza delle oncoproteine virali nella cellula, mentre quelli descritti in stadi più tardivi (con numeri di raddoppiamento della popolazione superiori a 100) sono legati alla trasformazione tumorale cui vanno incontro le cellule infettate da HPV in seguito ad integrazione delle oncoproteine nel genoma dell'ospite.

In figura 15 A è possibile osservare come la down- regolazione del trasportatore OCTN2 sia presente indipendentemente dal numero di raddoppiamento della popolazione; poiché tali risultati preliminari indicavano una presunta implicazione dell'infezione da parte di HPV, sono state effettuate altre analisi di real time di tipo quantitativo (figura 15 B) utilizzando linee cellulari retrotrasdotte singolarmente con le oncoproteine virali E6 ed E7.

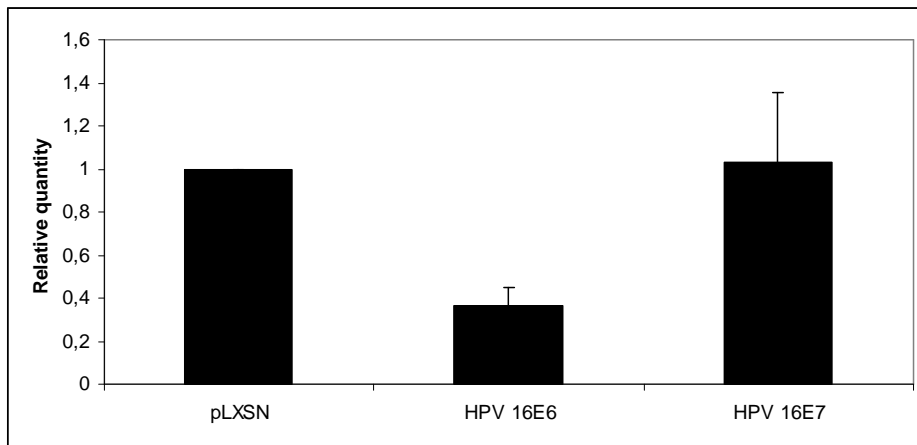


Figura 15 B: Misurazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in cellule infettate da HPV 16E6 e HPV 16E7: I cheratinociti primari sono stati retrotrasdotti con pLXSN vuoto e pLXSNE6 e pLXSNE7. L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi da pellet di cellule in coltura in flaconi t 25 cm². RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Il risultato ha indicato che l'oncoproteina E6 è in grado, da sola, di down-regolare l'espressione di OCTN2 rispetto alla condizione di controllo (cheratinociti retrotrasdotti con il solo pLXSN), mentre la presenza dell'oncoproteina E7 non sembra avere alcun effetto.

Uno dei meccanismi principali di interazione e degradazione mediato da HPV16E6 è legato al proteasoma; per tale ragione è stato effettuato un trattamento di inibizione del proteasoma (mediante MG132) su cellule retrotrasdote con HPV16 E6E7 allo scopo di verificare che questo influenzasse o meno l'espressione di OCTN2. In tale condizione sperimentale è stato osservato che i livelli di mRNA di OCTN2 aumentano (dati non mostrati) indicando che uno, o più, dei fattori di trascrizione degradati da HPV16 E6 può essere responsabile anche della regolazione di OCTN2.

L'oncoproteina E6 è in grado di interagire fisicamente e degradare proteine contenenti domini PDZ; è da sottolineare, a tal proposito, che PDZK1 è tra le poche proteine per cui è stata mostrata una relazione con la regolazione dell'espressione e funzione di OCTN2. Si tratta di un'interazione che avverrebbe tra il dominio PDZ di PDZK1 ed il PDZ binding motif di OCTN2.

In seguito all'osservazione di tale fenomeno di down regolazione, anche in un'altra infezione indipendente (non mostrato), è stato valutato l'effetto dell'overespressione, in trasfezione transiente,

di OCTN2 in cellule retrotrasdotte con HPV16 E6E7. La figura 16 mostra come la percentuale di morte cellulare aumenti in presenza dell'overespressione di OCTN2.

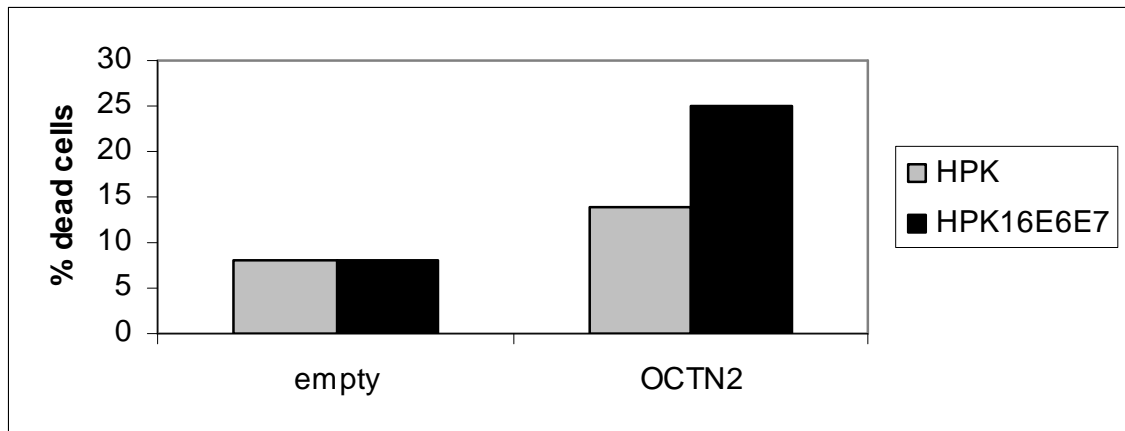


Figura 16: L'overespressione di OCTN2 in cheratinociti primari ed in cheratinociti retrotrasdotti con HPV16E6E7 induce aumento della morte cellulare: I cheratinociti primari e retrotrasdotti con HPV16E6E7 sono stati trasfettati, come descritto in materiali e metodi, con pCDNA3 – OCTN2 e pCDNA3 vuoto come controllo. Dopo 24 ore dal momento della trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e contate con il metodo del tripan blu per valutare la percentuale di cellule morte.

E' stato, dunque, ipotizzato che tale fenomeno potesse essere ulteriormente accentuato dal trattamento con il cisplatino, chemioterapico usato di routine, essendo nota l'abilità di OCTN2 di interagire con diversi composti farmacologici. I dati ottenuti sono ancora preliminari ma sembrano indicare che le cellule che overesprimono la proteina OCTN2 mostrino una maggiore sensibilità al cisplatino (figura 17).

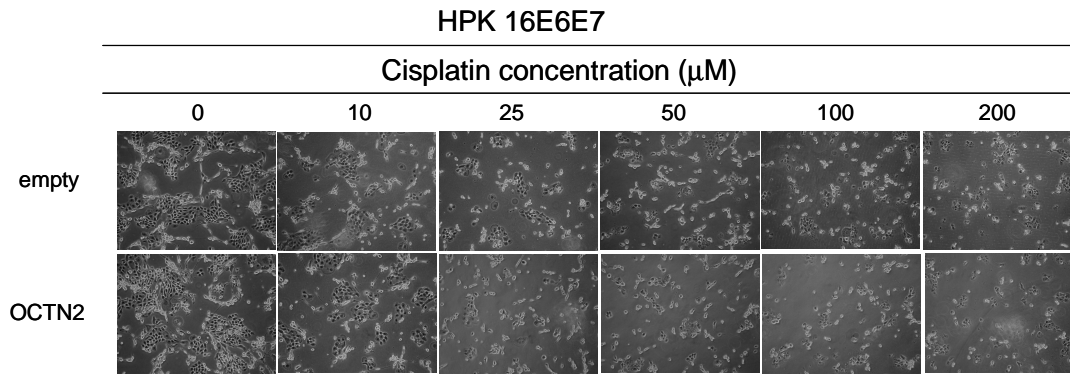


Figura 17: Effetto del cisplatino su cheratinociti che overesprimono il trasportatore OCTN2: I cheratinociti retrotrasdotti con HPV16E6E7 sono stati trasfettati, come descritto in materiali e metodi, con pCDNA3 – OCTN2 e pCDNA3 vuoto come controllo. Dopo 8 ore dal momento della trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e ripiastrate come descritto in Materiali e Metodi e poi trattate con cisplatino alle concentrazioni indicate in figura per 24 ore. Le foto (magnificazione 40X) sono state effettuate con macchina fotografica del microscopio ottico.

I dati dello stesso esperimento sono stati utilizzati per calcolare l'IC-50 per il cisplatino delle cellule overesprimenti OCTN2; come mostrato in figura 18 la presenza di OCTN2 induce una maggiore sensibilità delle cellule nei confronti dell'agente chemioterapico provocando una leggera diminuzione del valore di IC-50 da 122 μM nel caso della trasfezione con il vettore vuoto a 99 μM nel caso della trasfezione con OCTN2.

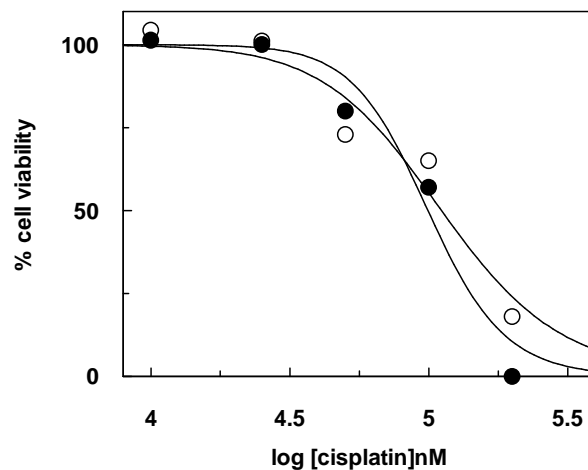


Figura 18: Effetto del chemioterapico cisplatino sulla vitalità cellulare: I cheratinociti retrotrasdotti con HPV16E6E7 sono stati trasfettati, come descritto in materiali e metodi, con pCDNA3 – OCTN2 (●) e pCDNA3 vuoto (○) come controllo. Come descritto in Materiali e Metodi sono state poi trattate con cisplatino alle concentrazioni indicate in figura per 24 ore. I dati sono interpolati secondo una curva dose- risposta.

-3.4- ESPRESSIONE DI hOCTN2 LINEE CELLULARI TUMORALI

In seguito all'osservazione sperimentale della down- regolazione dei livelli di mRNA per OCTN2 anche a stadi tardivi dell'infezione da HPV (cioè in cellule trasformate) é stata valutata l'espressione di tale trasportatore in diverse linee cellulari tumorali mediante RT- PCR di tipo quantitativo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di effettuare uno studio comparativo del profilo di espressione di tale sistema di trasporto in condizioni normali e patologiche utilizzando 18 linee cellulari tumorali.

È stata valutata, inizialmente, l'espressione di hOCTN2 in sole quattro linee cellulari, due derivate da cancro al seno (HBL-100 ed HCC 1937) e due derivate da tumori di testa e collo (HNC 124 ed HNC 136). Come mostrato in figura 19 è stato osservato che OCTN2 è nettamente down-regolato in tutte le linee tumorali.

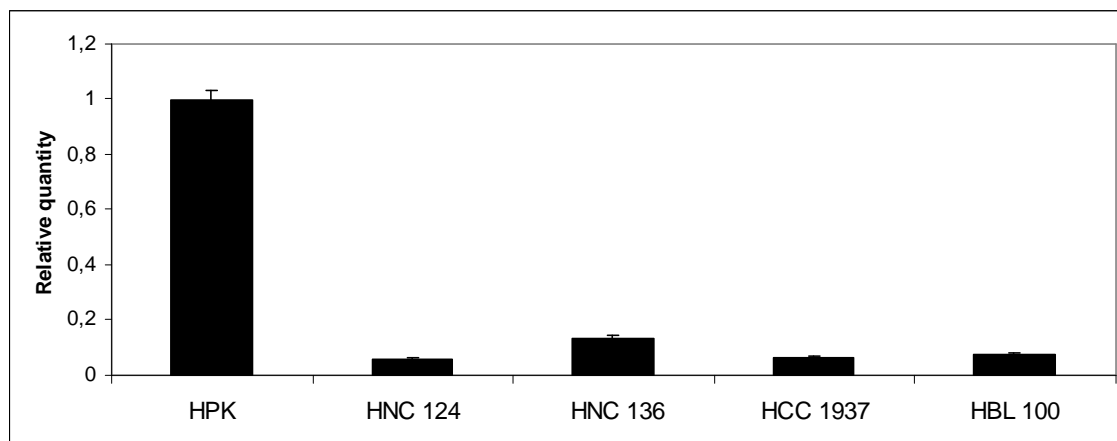


Figura 19: Misurazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in linee cellulari tumorali: Le linee cellulari di tumori di testa e collo (HNC 124 e 136) e di seno (HCC 1937 ed HBL-100) sono state mantenute in coltura come descritto in Materiali e Metodi. L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi da pellet di cellule. RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Una delle caratteristiche comuni a molte linee tumorali HNC è che diversi geni, quale il tumor suppressor Dok- 1, sono metilati nella loro regione promotrice. La metilazione è uno dei processi molecolari responsabile della repressione dell'espressione genica. Per tale ragione è stato effettuato un trattamento demetilante su diverse linee cellulari tumorali con il reagente chimico 5-aza- citidina.

Il risultato è mostrato in figura 20: tra le HNC, in A, (tumori di testa e collo) analizzate, in seguito al trattamento demetilante, l'espressione di OCTN2 aumenta considerevolmente in HNC 41, 97, 124, 150 e 211; l'aumento in HNC 91e 212 è ancora presente ma meno evidente rispetto alle altre descritte in precedenza. Quasi nessun effetto viene riportato per le HNC 160 e 199. Tra le linee cellulari derivate da tumori al seno, in B, l'effetto maggiore di aumento dell'espressione di OCTN2 è stato osservato nella linea HCC1937; anche le altre tre, tuttavia, mostrano un considerevole incremento nei livelli di mRNA per OCTN2. Le linee cellulari derivanti da tumori del colon, in B, infine, mostrano tutte un aumento dell'espressione di OCTN2 in seguito all'azione demetilante.

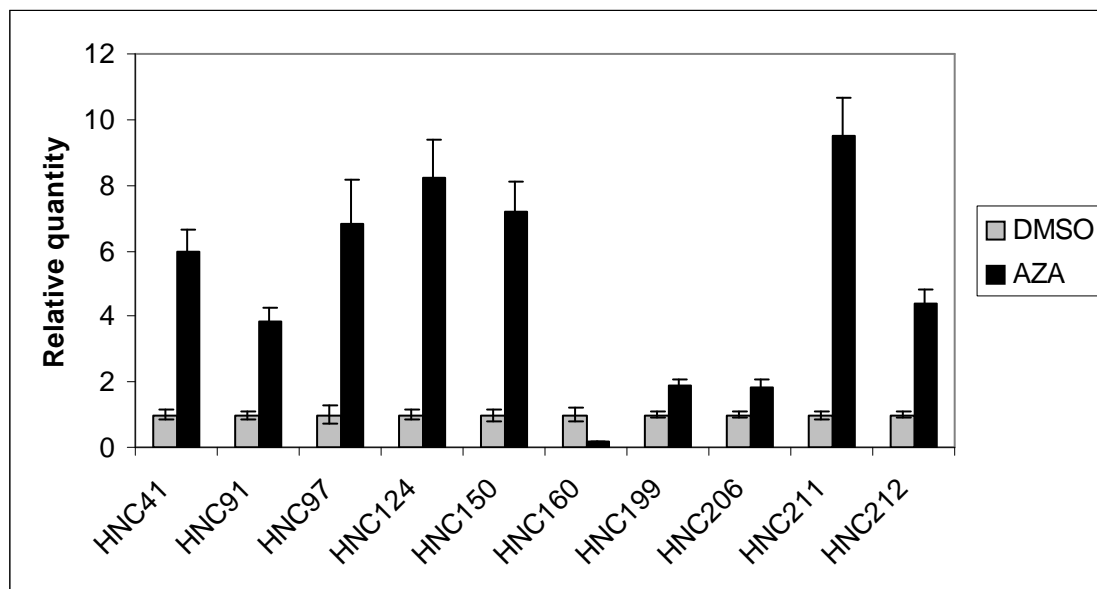


Figura 20 A: Misurazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in linee cellulari tumorali: Le linee cellulari di tumori di testa e collo sono state mantenute in coltura come descritto in Materiali e Metodi. L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi da pellet di cellule. RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

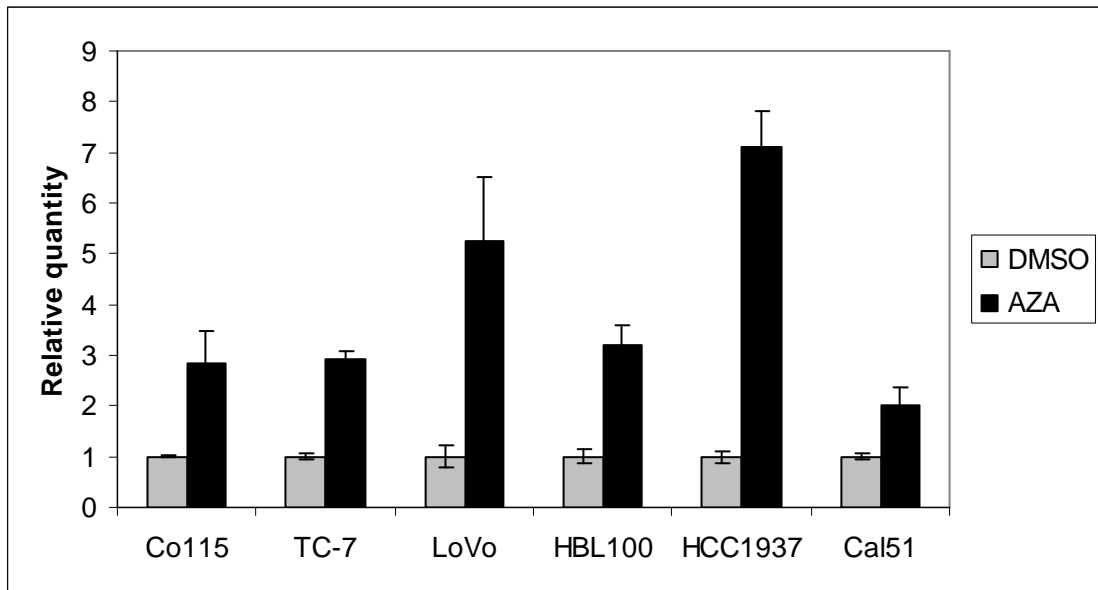


Figura 20 B: Misurazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in linee cellulari tumorali: Le linee cellulari di tumori di colon (Co115, TC-7, LoVo) seno (HBL-100, HCC1937, Cal 51) sono state mantenute in coltura come descritto in Materiali e Metodi. L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi da pellet di cellule. RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

Tale risultato apre la strada ad ulteriori indagini volte allo studio della regione promotrice a monte del gene codificante per OCTN2: l'aumento dei livelli di mRNA in seguito al trattamento con 5-aza-citidina, infatti, potrebbe essere legato ad una diretta demetilazione del promotore o, ancora, alla demetilazione di uno o più fattori di trascrizione responsabili, in quelle cellule, della down-regolazione di tale sistema di trasporto. Infine, l'osservazione di un aumento dei livelli di mRNA non è stato accompagnato dall'osservazione di un aumento dei livelli di proteina a causa della mancanza di un anticorpo efficiente diretto contro tale proteina.

L'effetto del trattamento demetilante è stato valutato, infine, anche su cheratinociti primari e retrotrasdotti con HPV16 E6E7; come mostrato in figura 21, anche nelle cellule infettate stabilmente da HPV16 E6E7 si osserva un recupero dell'espressione di OCTN2, molto più evidente rispetto a quello osservato nei cheratinociti primari di controllo. L'effetto rilevato in questi ultimi, tuttavia, mostra che esiste una metilazione basale della regione promotrice di OCTN2 o, nuovamente, di fattori di regolazione di tale sistema di trasporto.

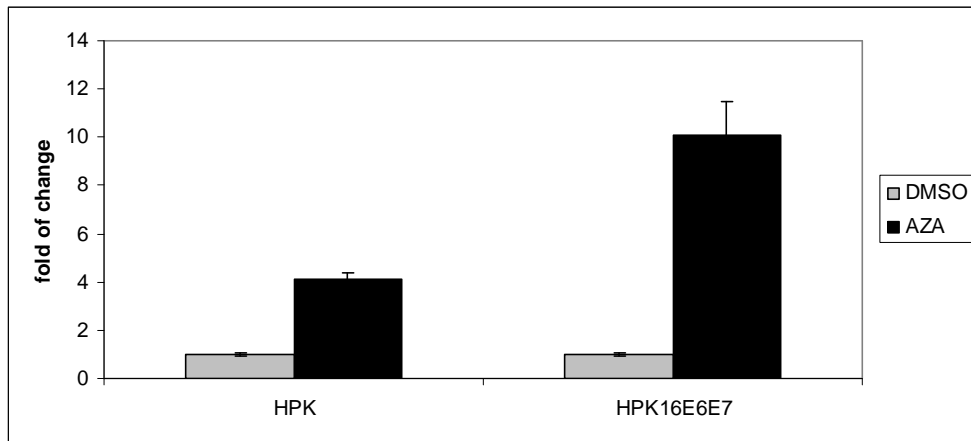


Figura 21: Misurazione dei livelli di mRNA di OCTN2 in cheratinociti trattati con 5-aza-citidina: I cheratinociti primari e retrotrasdotti con HPV16 E6E7 sono stati mantenuti in coltura e trattati con 5-aza-citidina come descritto in Materiali e Metodi. L'mRNA totale è stato estratto e retrotrascritto in cDNA come descritto in Materiali e Metodi. RT-PCR è stata effettuata in MX3000 Stratagene ed i dati analizzati con il software MXPro. I valori rappresentano la media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti.

CAPITOLO 4. CONCLUSIONI

-4.1- INATTIVAZIONE DI OCTN2 DA PARTE DELL'OMEPRAZOLO

Nel presente lavoro di tesi il sistema della ricostituzione in liposomi è stato utilizzato come modello per studiare, a livello molecolare, le interazioni tra il trasportatore OCTN2, estratto da vescicole di brush- border di reni di ratto, e l'omeprazolo. Nei proteoliposomi è stato mostrato che tale sistema di trasporto contiene gruppi tiolici esposti nell'ambiente extracellulare in accordo con la predizione della struttura secondaria di OCTN2 (Tamai et al 1998). I dati descritti in questo lavoro hanno mostrato per la prima volta che l'omeprazolo interagisce con il trasportatore di carnitina con conseguente inibizione della sua attività; quest'ultima è stata osservata anche in vescicole di brush- border intatte dimostrando, inequivocabilmente, che il trasportatore si inserisce, nei proteoliposomi, con lo stesso orientamento di quello delle membrane native.

Tale fenomeno, può essere spiegato dal fatto che il raggio dei proteoliposomi è piccolo sufficientemente da forzare le molecole, che sono asimmetriche, ad inserirsi tutte con lo stesso orientamento (Kramer et al 1986; Palmieri et al 1995; Pochini et al 2004;).

Nel presente lavoro è stata documentata, per la prima volta, l'interazione dell'omeprazolo con il sistema di trasporto di carnitina OCTN2. Tale agente farmacologico, infatti, si lega covalentemente alle cisteine del trasportatore con alta affinità, come mostrato nel caso di altre proteine di membrana (Lorentzon et al 1985; Bin Im et al 1985; Besancon et al 1997; Lambrecht et al 1998; Nishioka et al 1999; Shin et al 2004; Pauli- Magnus et al 2001;). In questo caso è stata descritta una cinetica di inibizione non competitiva confermata dal fatto che i valori di K_i e di IC_{50} coincidono, come accade in questo tipo caratteristico di inibizione.

È stato, tuttavia, dimostrato come l'omeprazolo sia in grado di esercitare un altro tipo di inibizione, senza previa formazione di legami covalenti, in esperimenti condotti in presenza dell'agente riducente dei ponti disolfuro DTE. In tal caso la cinetica di inibizione descritta è di tipo competitivo in cui l'omeprazolo è, quindi, in grado di interagire con il sito di legame per il substrato.

L'affinità del trasportatore per l'omeprazolo, in questo caso, è risultata essere più bassa di quella covalente: i valori di IC-50 e Ki infatti, sono entrambi più alti di quelli relativi all'inibizione non competitiva.

L'inibizione non covalente può essere interpretata alla luce della comparazione tra la struttura della carnitina e dell'omeprazolo (come descritto nel capitolo 2) e tenendo in considerazione i gruppi funzionali indispensabili per il legame tra OCTN2 ed i substrati: un gruppo amminico trisostituito ed un gruppo carbossilico (Ohashi et al 2001, 2002; Pochini et al 2004; Todesco et al 2008). Quando il sistema ricostituito è stato mostrato, inoltre, come la distanza tra i due gruppi essenziali non sia importante per l'interazione con il trasportatore e che le molecole che mancano di uno o più gruppi metil-amminici possono interagire ed inibire il trasportatore ma non possono essere trasportate (Pochini et al 2004).

La forma attivata, ma non quella non attivata, dell'omeprazolo possiede un gruppo piridinico carico ed un ossigeno metossilico a tre atomi di carbonio di distanza: questa peculiarità strutturale soddisfa le condizioni richieste affinché la molecola possa interagire con il trasportatore senza esserne substrato. Il valore della Ki relativa all'inibizione competitiva, tuttavia, è risultato essere più basso della Km del trasportatore per la carnitina stessa, indicando che OCTN2 ha un'affinità maggiore o comparabile per l'omeprazolo rispetto a quella per il substrato fisiologico.

Tale osservazione sperimentale può essere spiegata dalla presenza, nel trasportatore, di un sito di legame per il substrato più grande di quanto necessario per la sola interazione con la carnitina, suo substrato fisiologico. I residui amminoacidici idrofobici ed idrofilici presenti in questo sito, dunque, possono creare interazioni con gruppi funzionali dell'omeprazolo non presenti nella molecola di carnitina.

Tali interazioni stabilizzano il legame con l'omeprazolo con una affinità paragonabile o maggiore a quella per la carnitina; le stesse, tuttavia, forzano il trasportatore in una conformazione alternativa che gli impedisce di effettuare i cambiamenti necessari per trasportare la molecola in

questione. A sostegno di tale ipotesi, ci sono i dati sperimentali che mostrano come l'aggiunta di omeprazolo all'interno dei proteoliposomi non induca alcuna inibizione del trasportatore.

L'inibizione non competitiva è tipica delle reazioni covalenti dell'inibitore con la proteina anche nel caso dell'interazione con il sito di legame per il substrato. Infatti l'inibizione competitiva mostra come l'omeprazolo interagisca con il sito di legame per il substrato. Alla luce di queste considerazioni si può concludere che i gruppi SH responsabili dell'inibizione siano da localizzare nel sito di interazione con il substrato o, comunque, molto vicino ad esso.

In tal caso, la presenza di carnitina dovrebbe proteggere il trasportatore dall'inibizione dell'omeprazolo, ma in realtà si verifica il contrario; molto probabilmente, quindi, il gruppo SH responsabile dell'interazione con l'agente farmacologico è in prossimità del sito di legame per il substrato ed il legame della carnitina è in grado di indurre cambiamenti conformazionali tali da facilitare la successiva interazione con l'omeprazolo.

L'implicazione dei due meccanismi inibitori può essere rilevante alla luce del fatto che la l'omeprazolo nel sangue raggiunge la concentrazione di 8 μM dopo 30 minuti dalla somministrazione orale del composto farmacologico. Questa concentrazione è, infatti, più alta dell'IC-50 dell'inibizione non competitiva e non molto differente da quella dell'inibizione competitiva non covalente.

OCTN2 è espresso, come è noto, in diversi tessuti come intestino, fegato e reni; è essenziale nella omeostasi della carnitina come dimostrato dalla deregolazione di tale processo nel caso di difetti genetici a suo carico. Queste sindromi sono denominate deficienze di carnitina primarie, caratterizzate da encefalopatia, problemi respiratori dovuti alla cardiomiopatia, cardiomegalia, disturbi metabolici, iperammonemia, ipoglicemia, lipidemia, ipercolesterolemia, debolezza muscolare, miopatia, vomito (Wang et al 1999; Nezu et al 1999; Lahjouji et al 2001).

L'inibizione di OCTN2 dovuta ad omeprazolo può causare degli effetti collaterali simili alla deficienza di carnitina più o meno evidenti a causa della dose somministrata e della capacità di ogni individuo di metabolizzare il farmaco.

-4.2- OVER- ESPRESSIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 UMANO

Nel presente lavoro di tesi è stato messo a punto un protocollo per l'overespressione in *E. coli* e purificazione del sistema di trasporto di carnitina OCTN2 umano. A tale scopo è stata utilizzata, inizialmente, la stessa procedura ottimizzata per il trasportatore hOCTN1 (Galluccio et al 2009). I due sistemi di trasporto presentano una elevata omologia di sequenza ma, tuttavia, le strategie di clonaggio ed overespressione utilizzate per hOCTN1 non hanno prodotto alcun risultato nel caso di hOCTN2. In seguito all'utilizzo di diversi plasmidi e ceppi di *E. coli*, sono state ottenuti due costrutti, con caratteristiche differenti, in grado di dare l'overespressione di hOCTN2 in una forma utilizzabile per la successiva purificazione.

La prima strategia prevedeva l'incorporazione della proteina GST a monte della sequenza codificante per OCTN2; trattandosi di una proteina di membrana plasmatica, infatti, il problema principale è costituito dall'insolubilità e dalla eventuale tossicità della stessa per la cellula ospite.

La possibilità di overesprimere tale sistema di trasporto come proteina di fusione con GST avrebbe dovuto causare un aumento della solubilità e, dunque, la possibilità di recuperare la proteina nella frazione solubile del lisato cellulare indotto, usando blandi detergenti in grado di mantenere la proteina nella sua conformazione nativa. L'overespressione, in questo caso, è stata ottenuta sottoponendo le cellule a stress osmotico: come mostrato in precedenza da altri autori (Blakwell et al 1991; Thomas et al 1995), infatti, la crescita e l'induzione in presenza di alte concentrazioni di osmoliti, quali sorbitolo e betaina, può avere un effetto positivo sull'over espressione di proteine di membrana, poiché il batterio risponde alla condizione di alta pressione osmotica aumentando l'uptake di tali osmoliti che fungono, all'interno della cellula, da chaperone

chimici che assistono la traduzione ed il folding della proteina over- espressa (Oganesyan et al 2007). La proteina di fusione, tuttavia, è stata ottenuta nella frazione insolubile del lisato cellulare indotto: questo ha comportato la necessità di mettere a punto un protocollo di purificazione basato sull'utilizzo di detergenti ionici, quali il Sarkosyl. La purificazione è stata poi effettuata su colonna cromatografica per affinità al Nichel, sfruttando la presenza di un'ulteriore coda di 6 istidine, ottenendo il costrutto GST-hOCTN2. La proteina GST è stata poi separata da hOCTN2 mediante digestione enzimatica con trombina ed ulteriore cromatografia ad esclusione molecolare.

La seconda strategia di clonaggio, presentata in questo lavoro di tesi, è stata messa a punto allo scopo di ottenere una resa maggiore di proteina purificata e senza GST tag. Si tratta di un protocollo di overespressione basato sull'ottimizzazione dell'utilizzo dei codoni da parte di *E. coli*.

È noto, infatti, che il secondo codone in *E. coli* influenza l'efficienza di traduzione delle proteine: in particolare, è stato riportato (Niimura et al 2003; Gustafsson et al 2004) che *E. coli*, preferenzialmente, utilizza le triplette AAA ed AAT; questa, inoltre, sembra essere una caratteristica condivisa da molte specie batteriche. Nel presente lavoro è stato, dunque, mutagenizzato il secondo codone codificante, nella sequenza wild type di hOCTN2, per l'amminoacido arginina; tale posizione è stata modificata con la tripletta AAA, codificante per l'amminoacido lisina. Tale mutagenesi è di tipo conservativo allo scopo di mantenere il più possibile integra la struttura terziaria della proteina.

La proteina è stata, successivamente, purificata su colonna cromatografia per affinità ottenendo una quantità maggiore rispetto a quella del costrutto GST-hOCTN2.

I risultati di questo lavoro aprono la strada a studi di tipo strutturale e funzionale. La proteina purificata, infatti, sarà utilizzata per la successiva cristallizzazione allo scopo di risolvere la sua struttura terziaria. La caratterizzazione funzionale del trasportatore, invece, sarà effettuata nel sistema ricostituito dei liposomi allo scopo di identificarne le proprietà cinetiche e le interazioni con farmaci, xenobiotici e molecole fisiologiche.

-4.3- STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DEL SISTEMA DI TRASPORTO OCTN2 IN LINEE TUMORALI UMANE

Nel presente lavoro di tesi è stato descritto, per la prima volta, il profilo di espressione del sistema di trasporto OCTN2 in linee cellulari tumorali derivate da tumori di testa e collo, seno, intestino ed in linee cellulari di cheratinociti trasformati in seguito ad infezione da parte di HPV (Human Papilloma Virus) 16, responsabile del cancro alla cervice uterina. In tali linee cellulari è stata osservata, mediante RT-PCR, una down- regolazione del gene codificante per questo trasportatore.

Il meccanismo di down- regolazione resta ancora da investigare, sebbene siano presenti dei dati preliminari che indicano come uno dei possibili fenomeni responsabili di tale regolazione sia la metilazione della regione promotrice di hOCTN2 o della regione promotrice di fattori di regolazione del gene hOCTN2 localizzato nel cromosoma 5.

Dati riportati in letteratura mostrano come le oncoproteine E6 ed E7 del ceppo 16 possano alterare, incrementandola, l'attività di due metiltransferasi (Guo et al. 1999; Burgers et al. 2007) responsabile del silenziamento di alcuni geni target. La predizione della regione promotrice del gene OCTN2, inoltre, mostra nella regione 5'-UTR la presenza di diverse isole GC che sono comuni target di metilazione.

La necessità da parte delle cellule tumorali di down- regolare un trasportatore di membrana plasmatica di carnitina quale OCTN2 potrebbe risiedere nel diverso metabolismo cui vanno incontro le cellule cancerose. Si tratta di un fenomeno noto come Warburg effect: le cellule tumorali infatti prediligono un metabolismo glucidico invece che lipidico; la presenza di alte concentrazioni di carnitina intracellulare, invece, stimolerebbe la produzione di energia dovuta alla β -ossidazione nei mitocondri alterando il processo di produzione anaerobia di ATP che è tipico delle cellule tumorali.

Nel presente lavoro di tesi, sono stati presentati, inoltre, alcuni dati preliminari sulla maggiore sensibilità delle cellule in cui viene overespressa la proteina OCTN2 ad un agente farmacologico normalmente utilizzato in chemioterapia, il cisplatino.

- BIBLIOGRAFIA -

Alnouti et al (2006) Petrick JS, Klaassen CD. Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice. *Drug Metab Dispos*; 34: 477-82.

Asano et al (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*; 266:24632-36.

Bedard et al (2008) The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol*; 82: 3894.

Berardi et al (1996) Renal carnitine excretion is a marker for cisplatin-induced tubular nephrotoxicity. *FASEB J*; 10:A470.

Besancon et al (1997) Sites of reaction of the gastric H,K-ATPase with extracytoplasmic thiol reagents. *J Biol Chem*; 272: 22438–46.

Biber et al (1981) A high yield preparation for rat kidney brush border membranes: different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta*; 647: 169- 176.

Bieber et al (1988) Carnitine. *Annu Rev Biochem*; 57: 261-83.

Bin Im et al (1985) Omeprazole, a specific inhibitor of gastric (H⁺-K⁺)-ATPase, is a H⁺-activated oxidizing agent of sulfhydryl groups. *J Biol Chem*; 260:4591–97.

Blakwell et al (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS*; 295:10-12.

Boros et al (1998) Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med Hypotheses*; 50:55–59.

Bowden et al (1988) The effect of sugars on β -lactamase aggregation in *Escherichia coli* *Biotech Prog*; 4:97–101.

Brass (2002). Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacol Rev*; 54: 589-98.

Brass (2004). Carnitine and sports medicine: use or abuse? *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 67-78

Bremer (1983) Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev*; 63: 1420-80.

Broadway et al (1999) Carnitine acyltransferases and associated transport processes in the endoplasmic reticulum. Missing links in the VLDL story? *Adv Exp Medical Biol*; 466: 59–67.

Cai et al (2005) The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J*; 272:1625-38.

Calvani et al (1999) Carnitine system and cancer *Advances in nutrition and cancer*, vol 2.

Calvani et al (2000). Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic Res Cardiol*; 95:75-83.

Chen et al (2007) Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology*; 360, 447.

Cobrinik (2005) Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*; 24, 2796.

Dambrova et al (2002). Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect *Trends Cardiovasc Med*; 12: 275-9.

Dang et al (1997) Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*; 29:345–354.

de Villiers et al. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 1.

Di Virgilio et al (1989) Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca²⁺ with fura-2. *Methods Cell Biol*; 31:453-462.

Diamond (1987) Adaptive regulation of intestinal nutrient transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84:2242-45.

Diop et al (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry*; 44:5420-29.

Dixon (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*; 55:170–1.

Duran et al (2005) OCTN3: A Na⁺-independent L-carnitine transporter in enterocytes basolateral membrane. *J Cell Physiol*; 202: 929-35.

Eaton (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res*; 41: 197-239.

Enomoto et al (2002) Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem*; 277: 36262-71.

Fan et al (2009) Induction of apoptosis by L-carnitine through regulation of two main pathways in Hepa1c1c7 cells. *Amino acids*; 36:365-72.

Foster et al (2004). The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci*; 1033:1-16.

Friedrich et al (2003) Molecular cloning and functional characterization of the OCTN2 transporter at the RBE4 cells, an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res*; 968:69– 79.

Fujibayashi et al (1997) Transient increase in glycolytic metabolism in cultured tumor cells immediately after exposure to ionizing radiation: from gene expression to deoxyglucose uptake. *Radiat Res*; 147:729–734.

Funke et al (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem*; 74: 219.

Galluccio et al (2009) Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN1 transport protein. *Protein Expression and Purification*; 68: 215-220.

Galluccio et al (2010) Over- expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein. Submitted to *Molecular Biotechnology*.

Ganapathy et al (2009). Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther*; 121: 29-40.

Ghittoni R et al (2010) The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus. *Virus Genes*; 40:1-13.

Gibbons et al (1992) Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J*; 287: 749-53.

Gibbons et al (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*; 1483: 37-57.

Gooding et al (2004) Membrane transport of fatty acylcarnitine and free L-carnitine by rat liver microsomes. *Eur J Biochem*; 271: 954-61.

Grigat et al (2007) Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochem Pharmacol*; 74: 309-16.

Grube et al (2006) Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*; 113: 1114-22.

Grundemann et al (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102: 5256-61.

Gustafsson et al (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*; 22: 346-53.

Hasan et al (2007) TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*; 178, 3186.

Haschke et al (2010) Urinary excretion of carnitine as a marker of proximal tubular damage associated with platin-based antineoplastic drugs. *Nephrol Dial Transplant*; 25:426-33.

Hayashi et al (2005) Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology*; 41:916-924.

Hosoyamada et al (2004) Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*; 15:261-268.

Hruz et al (2000) Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane segment 11 of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Biochemistry*; 39:9367-72.

Hu et al (2008) Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res*; 14: 3141-8.

Huizing et al (1997) Cloning of the Human Carnitine-Acylcarnitine Carrier cDNA and Identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet*; 61:1239-45.

Hwang et al (2002) Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*; 277:2923-30.

Indiveri et al (1989) Purification of the mitochondrial carnitine carrier by chromatography on hydroxyapatite and celite. *FEBS Lett*; 253:217-220.

Indiveri et al (1990) Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*; 1020(1):81-86.

Indiveri et al (1991) a. Characterization of the unidirectional transport of carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*; 1069: 110-6.

Indiveri et al (1991) b. Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*; 1065: 231-8.

Indiveri et al (1994). The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochim Biophys Acta*; 1189: 65-73.

Indiveri et al (1998) Bacterial overexpression, purification, and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*; 249: 589-594.

Indiveri et al (2010) The carnitine transporter network: Interactions with drug. *Curr Chem Biol*; 4: 108-23.

Jackson et al (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*; 14: 3065.

James et al (2006) Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol*; 80:5301.

Jeulin et al (1996) Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*; 2: 87-102.

Jones et al (1997) The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21 Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*; 11: 2101.

Kano et al (2009) Carnitine/organic cation transporter OCTN2 (*Slc22a5*) is responsible for renal secretion of cephaloridine in mice. *Drug Metab Dispos*.

Kasahara et al (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem; J* 315:177-182.

Kato et al (2005) PDZK1 directly regulates the function of organic cation/carnitine transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol*; 67:674-43.

Kobayashi et al (2007). Transport of carnitine and acetylcarnitine by carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 and OCTN3 into epididymal spermatozoa. *Reproduction*; 134: 651-8.

Krämer et al (1986) Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column *Biochim Biophys Acta* 863: 289- 296.

Lahjouji et al (2001) Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitina deficiency. *Mol Genet Metab*; 73: 287-97.

Lahjouji et al (2002) L-Carnitine transport in mouse renal and intestinal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*; 1558:82– 93.

Lambrecht et al (1998) Identification of the site of inhibition by omeprazole of a fusion protein of the H,K-ATPase using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*; 273:13719-28.

Lamhonwah et al (2003) A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). *Biochem Biophys Res Commun*; 301: 98-101.

Lamhonwah et al (2005) OCTN3 is a mammalian peroxisomal membrane carnitine transporter. *Biochem Biophys Res Commun*; 338: 1966-72.

Lancaster et al (2010) Cisplatin-induced downregulation of OCTN2 affects carnitine wasting *Clin Cancer Res* 2010; 16:4789-99.

Li et al (2004) The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem*; 279(20):21012-20.

Longo et al (2006) Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*; 142C: 77-85.

Longo et al (2006) Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*;142: 77-85 Review.

Lorentzon et al (1985) The mechanism for inhibition of gastric (H/K)- ATPase by omeprazole *Biochim Biophys Acta*; 817: 25-32.

Lundholm et al (1982) Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients *Cancer*; 50:1142–50.

Maekawa et al (2007) 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.

Mazurek et al (1997) The role of phosphometabolites in cell proliferation energy metabolism and tumor therapy *J Bioenerg Biomembr*; 29:315–330.

Mazurek et al (1998) Metabolic characteristics of different malignant cancer cell lines. *Anticancer Res*; 18:3275–82.

Munger et al (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*; 8: 4099.

Nagai (2006) a Structure and function of a regulatory factor (cartregulin) for carnitine transport OCTN2. *Hokkaido Igaku Zasshi* 81:439-49.

Nagai et al (2006) b Cloning and functional characterization of a novel up regulator, cartregulin, of carnitine transporter OCTN2. *Arch Biochem Biophys*; 452:29-37.

Nakamura et al (2008) Functional characterization of ergothioneine transport by rat organic cation/carnitine transporter OCTN1 (slc22a4). *Biol Pharm Bull*; 31: 1580-4.

Nezu et al (1999) Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion- dependent carnitine transporter. *Nat Genet*; 21: 91-94.

Niimura et al (2003) Comparative analysis of the base biases at the gene terminal portions in seven eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res*;31:5195-201.

Nishioka et al (1999) Correlation between acid secretion and proton pump activity during inhibition by the proton pump inhibitors omeprazole and pantoprazole. *Biochem Pharmacol*; 58: 1349-59.

Nobre et al (2009) E7 oncoprotein of novel human papillomavirus type 108 lacking the E6 gene induces dysplasia in organotypic keratinocyte cultures. *J Virol*; 83: 2907.

Noel (1986) An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. Lipid requirement of carnitine acylcarnitine translocase. *Eur J Biochem*; 155:99-102.

Nunez et al (1994) Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of glycine transporter. *J Biol Chem*; 269:16920-24.

Ockner et al (1993) Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. *Hepatology*; 18:669–676.

Oganesyan et al (2007) Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Expr Purif*; 52: 280-5.

Ohashi et al (1999) Na⁽⁺⁾-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther*; 291: 778-84.

Ohashi et al (2001) Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol Pharmacol*; 59:358– 366.

Ohashi et al (2002) Studies on functional sites of organic cation/ carnitina transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein *J Pharmacol Exp Ther*; 302:1286-94.

Ohnishi et al (2003) Distinct transport activity of tetraethylammonium from L-carnitine in rat renal brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta*;1609:218-24.

Ohnishi et al (2008) Role of Na⁺/L-carnitine transporter (OCTN2) in renal handling of pivaloylcarnitine and valproylcarnitine formed during pivalic acid-containing prodrugs and valproic acid treatment. *Drug Metab Pharmacokinet*; 23: 293-303.

Oppedisano et al (2008) b Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein. *J Biochem Mol Toxicol*; 22, 8–14.

Palacin et al (2005) The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology*; 20:112-24. Review.

Palade (1956). The endoplasmic reticulum. *J Biophys Biochem Cytol*; 2: 85-98.

Palmieri et al (1995) Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies. *Methods Enzymol*; 260:349– 369.

Patel et al (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*; 18: 5061.

Pauli-Magnus et al (2001) Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 364: 551-557.

Peluso et al (2000) Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol*; 182: 339-50.

Piermatti et al (2008) Synthesis and characterization of carnitine nitro-derivatives. *Bioorg Med Chem*; 16: 1444–1451.

Pochini et al (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*; 1661, 78–86.

Pochini et al (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*; 1661: 78-86.

Pochini et al (2008) Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. *Chem Biol Interact*; 173, 187–194.

Prip Buus et al (1992) Evidence for an impaired long-chain fatty acid oxidation and ketogenesis in FAO hepatoma cells. *Eur J Biochem*; 209:291–298.

Quick et al (2003) Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *PNAS*; 99:8597–01.

Ramsay (1994) Carnitine and its role in acyl group metabolism. *Essays Biochem*; 28: 47-61.

Ramsay et al (2001) Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*; 1546: 21-43.

Rapoport (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem*; 65: 271-303.

Rebouche (2004) Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*; 1033: 30-41.

Reda et al. (2003) The carnitine system and body composition. *Acta Diabetol*; 40: S106-13.

Reshkin et al (2000) Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J*; 14: 2185.

- Rogers et al (2003)** Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 308:422-426.
- Scheffner et al (1993)** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*; 75,:495.
- Seth et al (1999)** Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function. *J Biol Chem*; 274: 33388-92.
- Sharom (1997)** The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity. *Biochem Soc Trans*; 3:1088-96.
- Shaw et al (1987)** Glucose and urea kinetics in patients with early and advanced gastrointestinal cancer: the response to glucose infusion, parenteral feeding, and surgical resection. *Surgery*; 101:181–191.
- Shin et al (2004)** Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H⁺, K⁺)-ATPase by proton pump inhibitors. *J Am Chem Soc*; 126: 7800–7811.
- Simkhovich et al (1988)** 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium) propionate (THP): a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*; 37: 195-202.
- Souba (1993)** Glutamine and cancer *Ann Surg*; 218:715–728.
- Spaniol et al (2003)** Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*; 44: 144-53.
- Stephens et al (2007)** New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*; 581: 431-44.
- Stieger et al (1995)** Characterization of L-carnitine transport by rat kidney brush-border-membrane vesicles. *Biochem J*; 309:643– 647.

Straumann et al (2006) Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem J*; 393:459-469.

Sugiura et al (2008) PDZK1 regulates two intestinal solute carriers (SLC15A1 and SLC22A5) in mice. *Drug Metab Dispos*; 36:1181-8.

Tahara et al (2009). Functional Genetic Variation in the Basal Promoter of the Organic Cation/Carnitine Transporters, OCTN1 (SLC22A4) and OCTN2 (SLC22A5). *J Pharmacol Exp Ther*.

Tamai et al (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett*; 419: 107-11.

Tamai et al (1998) Molecular and functional identification of sodium iondependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem*; 273: 20378-82.

Tamai et al (2000) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem*; 275: 40064-72.

Tamai et al (2001) Na⁽⁺⁾-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochim Biophys Acta*; 1512:273– 284.

Tanaka et al (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem*; 279:14961-14966.

Tein (2003) Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inherit Metab Dis*; 26:147-169. Review.

Thomas et al (1995) Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins *J Biol Chem*; 271: 11141–47.

Todesco et al (2008) Pharmacological manipulation of L- carnitine transport into L6 cells with stable overexpression of human OCTN2 *Cell Mol Life Sci*; 65: 1596-1608.

Tommasino et al (2003) The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 21, 307.

Tonazzi et al (2005) Identification by site-directed mutagenesis and chemical modification of three vicinal cysteine residues in rat mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. *J Biol Chem*; 280: 19607-12.

Tonazzi et al (2005) Relationships of Cysteine and Lysine residues with the substrate binding site of the mitochondrial ornithine/citrulline carrier: an inhibition kinetic approach combined with the analysis of the homology structural model, *Biochim Biophys Acta*; 1718, 53–60.

Tonazzi et al (2006) Functional reconstitution into liposomes and characterization of the carnitine transporter from rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*; 1758: 124-31.

van Iwaarden et al (1992) What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1113: 161-70.

Vaz et al (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*; 361: 417-29.

Wagner et al (2000) Functional and pharmacological characterization of human Na⁽⁺⁾-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am J Physiol Renal Physiol*; 279: F584-91.

Wang et al (1999) Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 96:2356-60.

Wang et al (2000). Functional analysis of mutations in the OCTN2 transporter causing primary carnitine deficiency: lack of genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*; 16: 401-7.

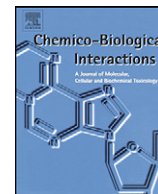
Wasa et al (1996) Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines *Ann Surg*; 224:189–197.

Watanabe et al (2002) Studies on intestinal absorption of sulpiride (2): transepithelial transport of sulpiride across the human intestinal cell line Caco-2. *Biol Pharm Bull*; 25: 1345-50.

Weibel et al (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*; 42: 68-91.

- Westin et al (2008).** Short- and medium-chain carnitine acyltransferases and acyl-CoA thioesterases in mouse provide complementary systems for transport of beta-oxidation products out of peroxisomes. *Cell Mol Life Sci*; 65: 982-90.
- Wu et al (1999).** Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther*; 290: 1482-92.
- Xuan et al (2003).** Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*; 306: 121-8.
- Yang et al (1995)** Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: structural studies *J Lipid Res*; 36: 125-36.
- Yazdanpanah et al (1997)** Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free Radic Biol Med*; 23:870–8.
- Yonezawa et al (2006)** Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3) and multidrug and toxin extrusion family J *J Pharmacol Exp Ther*; 319:879-86.
- Yugawa et al (2007)** Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*; 27: 3732.
- Zaugg et al (2003)** Myocardial function and energy metabolism in carnitine-deficient rats. *Cell Mol Life Sci*; 60: 767-75.
- zur Hausen (2002)** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*; 2: 342.

PUBBLICAZIONI



Inactivation by omeprazole of the carnitine transporter (OCTN2) reconstituted in liposomes

Lorena Pochini, Mariafrancesca Scalise, Cesare Indiveri*

Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P.Bucci 4c, 87036 Arcavacata di Rende, CS, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2008

Received in revised form 26 October 2008

Accepted 29 October 2008

Available online 6 November 2008

Keywords:

Omeprazole
Carnitine
Transport
OCTN2

ABSTRACT

The effect of omeprazole on the carnitine (OCTN2) transporter reconstituted in liposomes has been studied. Omeprazole externally added to the proteoliposomes, inhibited the carnitine/carnitine antiport catalysed by the reconstituted transporter. The inhibition was partially reversed by DTE indicating that it was caused by the covalent reaction of omeprazole with Cys residue(s) of the transporter. Similar results were found with intact brush border vesicles. The residual inhibition of the transport in the presence of DTE, indicated the occurrence of an alternative inhibition mechanism of non-covalent nature. The IC_{50} of the two inhibition modes derived from dose–response curves, were 5.7 μ M and 20.4 μ M, respectively. Kinetic studies of the inhibition showed that in the absence of DTE omeprazole behaved as non-competitive inhibitor. On the contrary, in the presence of DTE competitive inhibition was found. The K_i of the transporter for the inhibitor was 5.2 μ M or 14.6 μ M in the absence or presence of DTE, i.e., under condition of covalent (non-competitive) or non-covalent (competitive) interaction of the inhibitor with the transporter. The presence of the substrate during the incubation of the omeprazole (in the absence of DTE) with the proteoliposomes facilitated the covalent reaction of the pharmacological compound with the transporter. Omeprazole did not inhibit when present in the internal proteoliposomal compartment, indicating that the inhibition was specifically due to interaction with external site(s) of the protein. The pharmacological compound was not transported by the reconstituted transporter. The possible in vivo implications of the interaction of omeprazole with the transporter are discussed.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is well known that omeprazole causes reduction of gastric secretion by inhibiting the K^+/H^+ -ATPase with a covalent mechanism, which has been defined at the molecular level [1–5]. The pharmacological agent is chemically modified at acidic pH. After the structural modification a reactive group and a positive charge are introduced in the molecule. The activated compound reacts with an extracytoplasmic Cys residue of the protein forming a mixed disulphide which is responsible of the inhibition of the proton pump. It has been reported that omeprazole, besides interacting with the K^+/H^+ -ATPase reduces its mRNA level [6]. The formation of mixed disulphides is most probably involved in the inhibition of the p-glycoprotein [7] and the pNPPase of microsomes [8]. On this basis, other transport systems which have Cys functional (SH) groups may interact with omeprazole. Among the membrane trans-

porters which have been functionally studied in the last decade, the rat carnitine transporter OCTN2 possesses 7 Cys residues in its amino acid sequence, 4 of which should be exposed towards the extra cytoplasmic side of the transporter, as predicted by the hydropathy profile [9]. After studies in brush-border vesicles [10], this transport system has been cloned and functionally characterized in intact cell systems [9,11–20]. It is widely expressed in several tissues and, hence, it is involved in the regulation of the homeostasis of carnitine in mammals. The carnitine transporter extracted from rat kidney has been reconstituted in liposomes and identified as OCTN2 on the basis of its functional properties [21]. The reconstituted transporter catalyses a sodium-dependent antiport of carnitine with itself (homologous antiport) or with carnitine derivatives and other compounds (heterologous antiport) in agreement with the previous data reported in intact cells [20]. Some novel functional aspects of the transporter have been revealed using the reconstituted system. Among other properties, it has been found that hydrophilic SH reagents externally added to the proteoliposomes inhibit the transporter. This finding confirmed that the carnitine (OCTN2) transporter possesses extra cytoplasmic Cys residues, thus representing a potential target of omeprazole. The reconstituted system is a suitable experimental model to investi-

Abbreviations: $C_{12}E_8$, octaethylene glycol monododecyl ether; DTE, 1,4-dithioerythritol.

* Corresponding author. Tel.: +39 0984 492939; fax: +39 0984 492911.

E-mail address: indiveri@unical.it (C. Indiveri).

gate the interaction of pharmacological compounds with transport systems [22–24]. Thus, the interaction of omeprazole with the reconstituted carnitine transporter has been studied. Interestingly it has been found that omeprazole strongly inhibits the transport system with two different mechanisms implying a covalent reaction with Cys residue(s) of the transporter or a non-covalent interaction with the substrate binding site.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Amberlite XAD-4, egg yolk phospholipids (3-sn-phosphatidylcholine from egg yolk) and $C_{12}E_8$ were purchased from Fluka; L-[3H]carnitine from Amersham; Sephadex G-75, L-carnitine and omeprazole from Sigma. All the other reagents were of analytical grade.

2.2. Reconstitution of the carnitine transporter into liposomes

Brush border membranes were prepared from rat kidney [25] and stored at $-80^\circ C$. The carnitine transporter, solubilized with 2% $C_{12}E_8$, was reconstituted by removing the detergent with a hydrophobic chromatography column [21,26,27]. In this procedure the mixed micelles containing detergent, protein and phospholipids were repeatedly passed through the same Amberlite XAD-4 column. The composition of the initial mixture used for reconstitution (except when differently indicated) was: 25 μl of the solubilized protein (25–35 μg protein in 2% $C_{12}E_8$), 85 μl of 10% $C_{12}E_8$, 100 μl of 10% egg yolk phospholipids in the form of sonicated liposomes prepared as described in ref. [27], 10 mM L-carnitine, 20 mM HEPES/Tris (pH 6.0) in a final volume of 700 μl . After vortexing, this mixture was passed 15 times through the same Amberlite column (0.5 cm diameter \times 3.0 cm height) pre-equilibrated with a buffer containing 20 mM HEPES/Tris (pH 6.0) and 10 mM L-carnitine. All the operations were performed at $4^\circ C$, except the passages through Amberlite, which were carried out at room temperature.

2.3. Transport measurements

To remove the external substrate, 550 μl of proteoliposomes were passed through a Sephadex G-75 column (0.7 cm diameter \times 15 cm height) pre-equilibrated with 20 mM HEPES/Tris (pH 6.0) and the appropriate concentration of sucrose to balance the internal osmolarity. 550 μl of proteoliposomes were collected from these columns and divided in aliquots (samples) of 100 μl . Transport was started by adding [3H]carnitine at the indicated concentrations and 50 mM NaCl to the proteoliposomes samples and stopped by adding 50 μM mersalyl at the desired time interval. In control samples the inhibitor was added at time zero according to the inhibitor stop method [28]. The assay temperature was $25^\circ C$. Finally, each sample of proteoliposomes (100 μl) was passed through a Sephadex G-75 column (0.6 cm diameter \times 8 cm height) in order to separate the external from the internal radioactivity. Liposomes were eluted with 1 ml 50 mM NaCl and collected in 4 ml of scintillation mixture, vortexed and counted. The experimental values were corrected by subtracting the respective control. The mersalyl-insensitive radioactivity associated to the control samples was always less than 15% with respect to the mersalyl-sensitive carnitine transport. In the experiments performed in the presence of DTE, in which mersalyl could not be used, 5 mM arginine and 5 mM tetraethylammonium were used as inhibitor. This mixture inhibited the transport with efficiency only slightly lower than mersalyl, i.e., the inhibitor-insensitive

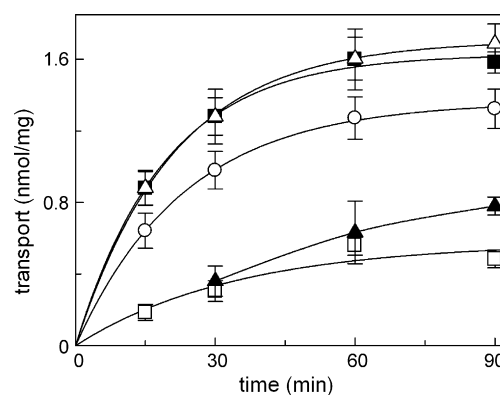


Fig. 1. Effect of omeprazole on the carnitine antiport mediated by the reconstituted transporter. Transport was measured as described in Section 2 adding 10 μM [3H]carnitine and 50 mM NaCl at time zero to proteoliposomes containing 10 mM carnitine in the absence (Δ , \blacksquare) or in the presence of activated (\square , \blacktriangle) or non-activated (\circ) 30 μM omeprazole. In \blacksquare and \blacktriangle , 2 mM DTE was added 2 min before the transport start. The transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Section 2. The values are means \pm S.D. from three experiments.

radioactivity associated to the control samples was always less than 20% with respect to the inhibitor-sensitive carnitine transport. It was verified that similar results were obtained using the inhibition mixture instead of mersalyl in experiments performed in the absence of DTE. For kinetic determinations, the initial rate of transport was measured by stopping the reaction after 15 min, i.e., within the initial linear range of [3H]carnitine uptake into the proteoliposomes ([21] and see Fig. 1). Rate constants and kinetic constants values were determined by the Graft (version 5.0.3) software.

For efflux measurements, the proteoliposomes containing 10 mM carnitine were prelabelled by transporter-mediated exchange equilibration before starting the transport assay [27]. This was achieved by incubating the proteoliposomes (550 μl), passed through Sephadex G-75 in order to remove the external substrate (see above), with 1 μM [3H]carnitine at high specific radioactivity (50–60 $\mu Ci/nmol$) in the presence of 50 mM NaCl for 90 min at $25^\circ C$. Then, the external radioactivity was removed by passing again the proteoliposomes through Sephadex G-75 as described above. Transport was started by adding unlabeled external carnitine at the concentration indicated in the legends to figures and stopped, at the appropriate time interval, as described above. Efflux activity cannot be calculated as specific activity for methodological reasons [27]. It was expressed as % residual intraliposomal radioactivity with respect to the radioactivity present in the proteoliposomes at time 0.

To measure carnitine transport in intact brush border vesicles, a procedure based on previously reported data [29] was used. 10 μl of brush borders prepared as described in Section 2.2, were centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 min at $4^\circ C$. To equilibrate the vesicles with carnitine, the pellet was resuspended with 10 μl of a buffer containing 200 mM sucrose, 12 mM HEPES/Tris (pH 6.0), 50 mM NaCl and 2.5 mM carnitine. After 60 min incubation, transport was started adding 90 μl of a buffer containing 200 mM sucrose, 12 mM HEPES/Tris (pH 6.0), 50 mM NaCl and carrier free [3H]carnitine, in order to reach a final concentration of 0.25 mM of [3H]carnitine. Transport was stopped at the indicated time by mersalyl and the internal radioactivity measured as described above for proteoliposomes. In these experiments, the radioactivity equilibrium was reached at about 4 min.

2.4. Acid activation of omeprazole

25 mM omeprazole in ethanol was diluted 10 fold in HCl 0.1 M (pH 1.0). After 15 min incubation the pH was adjusted to pH 6.0 by Tris powder.

2.5. Other methods

The protein concentration was determined by the modified Lowry procedure [30].

3. Results

3.1. Inhibition of the carnitine transporter by omeprazole

The effect of omeprazole on the carnitine transporter reconstituted in liposomes was investigated. The transport activity was measured as $10 \mu\text{M}$ [^3H]carnitine uptake into proteoliposomes containing 10 mM carnitine, (carnitine/carnitine homologous antiport) in the presence of externally added omeprazole activated by preincubation at pH 1.0 (see Section 2 and refs. [3,5]) or non-activated, i.e., kept in a buffer at pH 7.0 before the use. The time course of the carnitine transport is shown in Fig. 1. As previously described [21], the accumulation of labelled carnitine in the proteoliposomes depended on the time. It increased up to 1.7 nmol/mg protein at 90 min. $30 \mu\text{M}$ activated omeprazole strongly inhibited the transport. At 15 min about 80% inhibition was found. At 90 min the transport was still inhibited by about 70%. Whereas the addition of the non-activated compound had only a slight inhibitory effect. The experimental data were interpolated in a first order rate equation from which the initial rate of transport was calculated as the product of k and transport at equilibrium. The initial transport rate in the presence or absence of omeprazole was 0.017 or

$0.08 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$, respectively. The two forms of activated omeprazole have functional groups (see ref. [5] and Fig. 2) that could react with Cys residues of the protein forming a mixed disulphide, as it was previously found in the case of the gastric H^+/K^+ -ATPase [3–5]. One or more Cys SH group(s) of the carnitine transporter are exposed towards the external side of the proteoliposomes, which corresponds to the extracytoplasmic side of the transporter [21]. These functional groups could be involved in the mechanism of inhibition by omeprazole via the formation of a mixed disulphide. To evaluate this hypothesis the effect of DTE, a disulphide reducing agent, on the inhibition was tested. The addition of DTE after 30 min to the proteoliposomes treated with activated omeprazole, led to partial recovery of the transport function, which was clearly evident at 90 min of transport: about 50% of the activity was recovered respect to the inhibited sample. DTE had virtually no effect when added to the control proteoliposomes, in the absence of omeprazole. The effect of omeprazole on carnitine transport was investigated also in intact brush border vesicles. In this system the transport was measured as 0.25 mM [^3H]carnitine transport in 2 min in vesicles preequilibrated with 2.5 mM unlabeled carnitine (see Section 2). As shown in Fig. 3, omeprazole strongly inhibited the carnitine transport. DTE slightly inhibited the activity of the control; when added to the omeprazole inhibited samples, DTE led to a substantial recovery of the transport function. The results on omeprazole inhibition and recovery of the activity by DTE were similar in proteoliposomes and brush borders. Some quantitative differences are due to differences in properties of the experimental systems like the internal volume of the vesicles, the number of transporters per vesicles, the possible presence of interfering transport activities in brush border vesicles, which are strongly reduced or eliminated in the proteoliposomes [21,24]. The incomplete recovery of the transport function caused by DTE may be interpreted by two possible hypotheses: (i) only a fraction of the

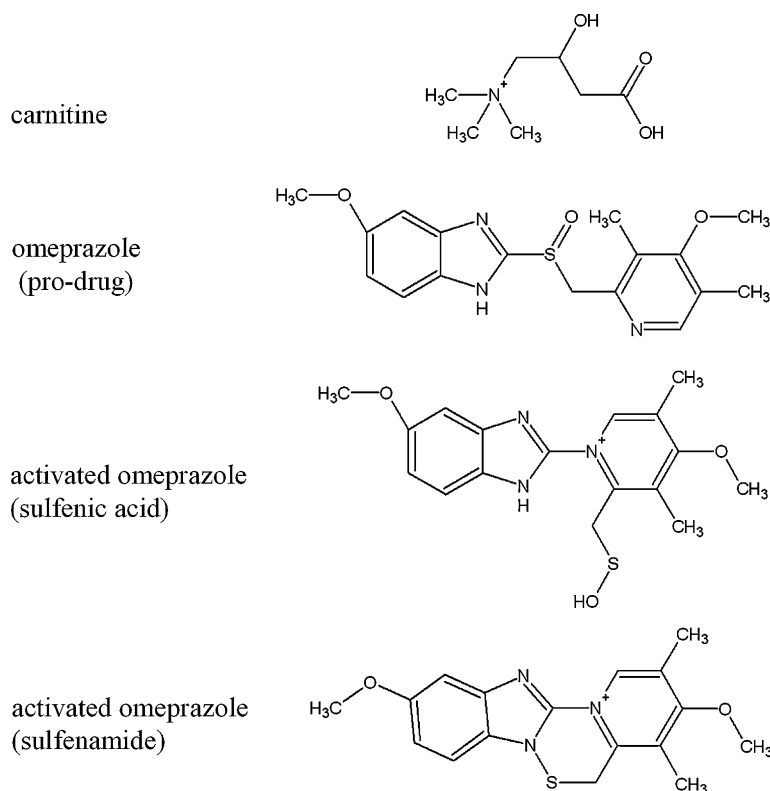


Fig. 2. Comparison among the structures of carnitine and omeprazole. Carnitine and different molecular forms of omeprazole are reported: the non-activated form (pro-drug) and the activated sulfenic acid and sulfenamide (see ref. [5]).

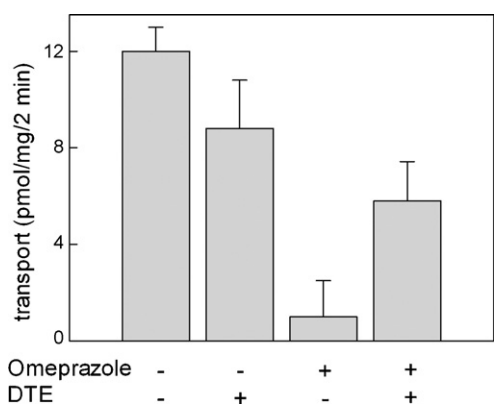


Fig. 3. Effect of omeprazole on the carnitine transport in intact brush border vesicles. Transport was measured adding 250 μM [^3H]carnitine and 50 mM NaCl at time zero to brush border vesicles containing 2.5 mM carnitine and stopped after 2 min as described in Section 2. Activated omeprazole (30 μM) and/or DTE (30 μM) were added where indicated by (+) 30 s before the transport. The values are means \pm S.D. from three experiments.

transporter-omeprazole mixed disulphide linkage was reversed by DTE and (ii) the unbound omeprazole was able to inhibit the transporter via non-covalent interactions, as well. To discriminate the inhibition of transport caused by covalent reaction (mixed disulphide formation) from that caused by non-covalent interaction, the residual activity of the transporter was determined after incubation of the proteoliposomes with the inhibitor and subsequent removal of the excess compound which had not reacted with the protein. To achieve this objective a strategy previously described for other transporters [22,31] was adopted. After treatment with omeprazole, the proteoliposomes were passed through Sephadex G-75 columns and, then, the transport activity was measured. Fig. 4 shows the results of the experiment. Proteoliposomes incubated with 30 μM omeprazole showed a clear inhibition of transport of 80% at 15 min and 48% at 90 min, respectively. The inhibition was due to the omeprazole which could not be removed by the size exclusion chromatography, i.e., was covalently bound (by mixed disulphide) to the transporter. Differently, no inhibition was found, in proteoliposomes treated with DTE before the passage through Sephadex G-75, indicating that all the inhibitor had been removed

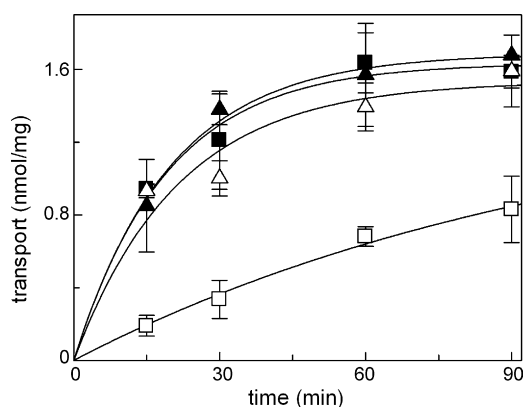


Fig. 4. Effect of covalently bound omeprazole on the carnitine antiport mediated by the reconstituted transporter. Proteoliposomes were incubated with activated 30 μM omeprazole (\square , \blacktriangle) or with buffer alone (Δ , \blacksquare). After 2 min 2 mM DTE (\blacksquare , \blacktriangle) was added. After 2 min all the proteoliposome samples were passed through Sephadex G-75 columns as described in Section 2. Then, transport was started adding 10 μM [^3H]carnitine and 50 mM NaCl at time zero to proteoliposomes containing 10 mM carnitine and stopped at the indicated times, as described in Section 2. The values are means \pm S.D. from three experiments.

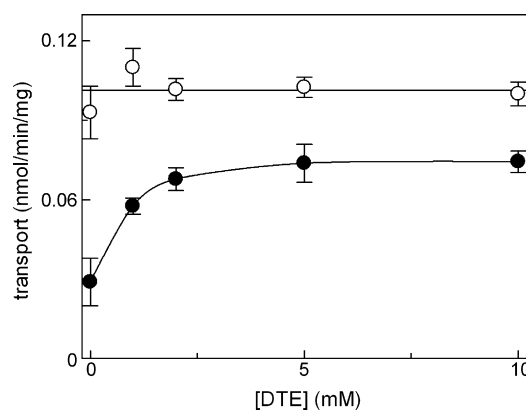


Fig. 5. Dependence on DTE of the transport activity of the reconstituted transporter. DTE was added at the indicated concentrations to proteoliposome pretreated (\bullet) or not (\circ) with 30 μM activated omeprazole for 2 min. After 2 min transport was started as described in Section 2 adding 10 μM [^3H]carnitine and 50 mM NaCl at time zero to proteoliposomes containing 10 mM carnitine. The transport reaction was stopped at 15 min, as described in Section 2. The values are means \pm S.D. from three experiments.

by the chromatography after the reaction with DTE, i.e., all the disulphide omeprazole–protein linkages had been reversed. Also in this case a control was performed adding DTE to the sample without inhibitor: no variation of transport activity was observed in comparison with the control, without omeprazole and DTE. The experiments described clearly showed that activated omeprazole covalently interacts with the transporter. The complete removal of inhibition by DTE demonstrated that a mixed protein–omeprazole disulphide was involved in the covalent inhibition. However, the data of Fig. 1 showed that the inhibition of the transporter was still evident after the disulphide cleavage by DTE, if the unbound inhibitor had not been removed from the proteoliposomes. This was in favour of the hypothesis of the occurrence of a non-covalent interaction of omeprazole with the transporter, as well. To verify this hypothesis, the dependence of the reversal of the inhibition on the concentration of DTE was studied. As shown in Fig. 5 the transport activity was recovered upon the addition of DTE in a concentration dependent manner. However, the maximal recovery of transport, observed at DTE concentrations above 5 mM, was lower than the control. The difference represented the fraction of inhibition by omeprazole due to non-covalent reaction which was lower than that caused by the covalent reaction (given by the difference of the transport at 5–10 mM and 0 mM DTE). If an aliquot of proteoliposomes treated with 5 mM DTE was passed through Sephadex G-75 columns as described for Fig. 4, the transport activity was completely recovered (not shown, but see Fig. 4).

3.2. Kinetics of the inhibition of the carnitine transporter by omeprazole

To characterize the effect of omeprazole caused by the two different mechanisms of interaction with the transporter, kinetic experiments were performed in the absence or presence of DTE. The reducing agent was used at the concentration of 5 mM, i.e., leading to the maximal recovery of transport activity (see Fig. 5). The dependence of the inhibition on the concentration of omeprazole was studied. The antiport rate, measured as uptake of 10 μM [^3H]carnitine into proteoliposomes containing 10 mM carnitine, was determined in the presence of increasing concentration of the pharmacological agent. The dose–response curves obtained are shown in Fig. 6. Nearly complete inhibition of the transport was observed at 100 μM omeprazole in the absence of DTE;

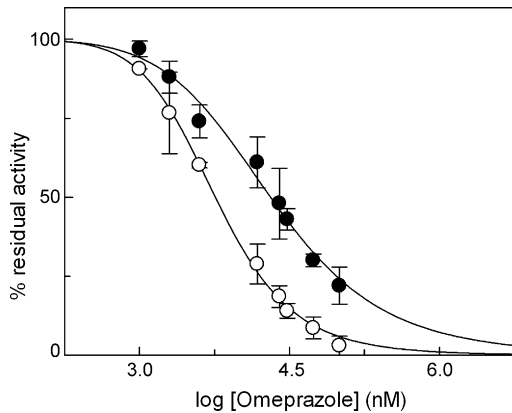


Fig. 6. Dose–response curves for the inhibition of the reconstituted transporter by omeprazole. Transport was measured as described in Section 2 adding 10 μM [^3H]carnitine and 50 mM NaCl together with the indicated concentrations of activated omeprazole at time zero to proteoliposomes containing 10 mM carnitine in the absence (○) or in the presence (●) of 5 mM DTE. The transport reaction was stopped at 15 min, as described in Section 2. Percent residual activity with respect to the control is reported. The values are means \pm S.D. from three experiments.

the calculated IC_{50} from 3 experiments was $5.7 \pm 0.23 \mu\text{M}$. The same experiment was performed adding omeprazole to the proteoliposomes in the presence of DTE. Under this condition, the pharmacological agent could not covalently bind the transporter (see Section 3.1). The inhibition was less pronounced, with an IC_{50} of $20.4 \pm 4.0 \mu\text{M}$. On the contrary, the pharmacological agent had a very low if any effect when added to the proteoliposomes without activation by acid treatment (not shown and see Fig. 1). To gain further insights into the mechanism of inhibition of the carnitine transport, inhibition kinetic studies were performed. The dependence of the antiport rate on the extraliposomal carnitine concentration in the absence or presence of two different concentrations of omeprazole was studied. The data, analysed in double reciprocal (Lineweaver-Burk) plot (Fig. 7A), were interpolated by three straight lines which showed a common intersection point close to the abscissa. This behaviour is typical of non-competitive inhibition. The half saturation constant of the transporter for the inhibitor (K_i) was derived from the plot. The average value of the K_i from three different experiments was $5.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$. A similar experiment was performed in the presence of DTE. The data, analysed in double reciprocal plot (Fig. 7B), were interpolated by three straight lines that, differently from the previous experiment, showed a common intersection close to the ordinate, indicating a competitive type of inhibition. The half saturation constant of the transporter for the inhibitor (K_i) was derived from the plot. The average value calculated from three different experiments was $14.6 \pm 1.9 \mu\text{M}$. The experimental data of Fig. 7B plotted according to the method of Dixon [32] (not shown) confirmed a complete competitive inhibition, which differs from partially competitive inhibition and gives linear dependence in Dixon plot [22,23,31,32]. The effect of the presence of carnitine (protection) during the incubation with the inhibitor in the absence of DTE was investigated. The incubation of the proteoliposomes with 20 μM omeprazole in the absence of carnitine led to inhibition of about 30%. If 1 mM or 15 mM carnitine was present during the incubation, surprisingly, the inhibition increased to about 50 and 70%, indicating that the carnitine binding facilitated the covalent reaction of omeprazole with the transporter (Fig. 8).

The effect of omeprazole on the carnitine antiport on the internal side of the transporter could not be investigated in the absence of DTE because in these experiments the pharmacological agent had to be added to the reconstitution mixture. In this condition

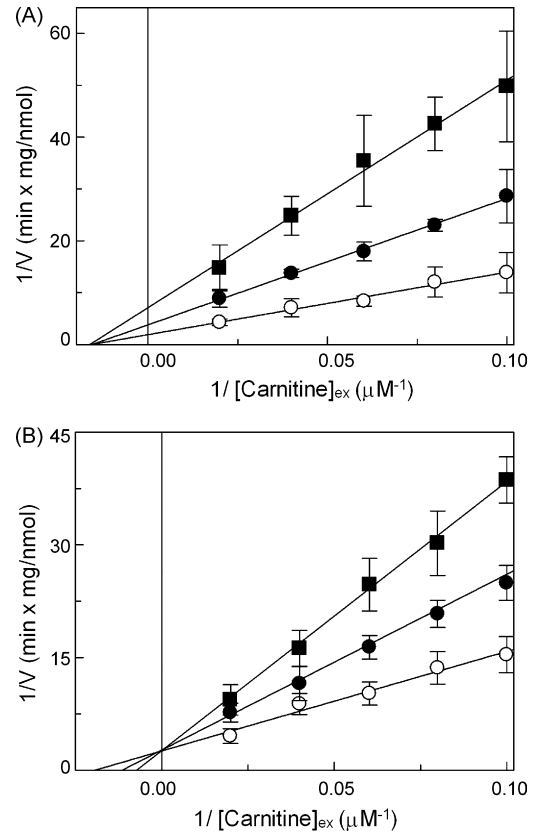


Fig. 7. Kinetic analysis of the inhibition of the reconstituted transporter by omeprazole. Transport was measured as described in Section 2 adding [^3H]carnitine at the indicated concentrations and 50 mM NaCl at time zero to proteoliposomes containing 10 mM carnitine in the absence (A) or in the presence (B) of 5 mM DTE. The experimental data were plotted according to Lineweaver-Burk as reciprocal transport rate vs reciprocal carnitine concentrations in the absence (○) or in the presence of (A) 6 μM (●) and 12 μM (■) activated omeprazole, (B) 12 μM (●) and 24 μM (■) activated omeprazole. The transport reaction was stopped at 15 min, as described in Section 2. The values are means \pm S.D. from three experiments.

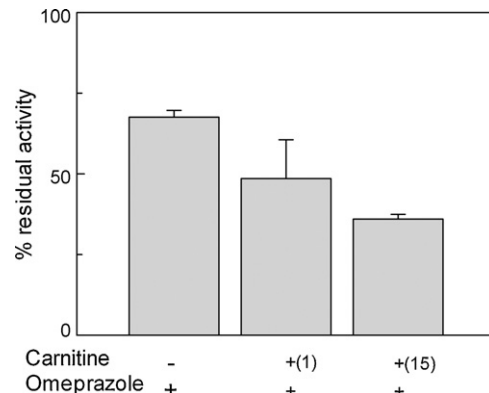


Fig. 8. Influence of substrate on the inhibition of the reconstituted transporter by omeprazole. Reconstituted proteoliposomes were treated as described in the figure before the transport assay: carnitine at the concentrations (mM) in brackets and/or activated omeprazole (20 μM) were added to proteoliposome samples where indicated by (+). All samples were then passed through Sephadex G-75 columns to remove the unreacted inhibitor and substrate; transport was measured as described in Section 2 adding 10 mM carnitine and 50 mM NaCl to proteoliposomes containing 10 mM carnitine. The transport reaction was stopped at 15 min, as described in Section 2. Percent residual activity with respect to the control is reported. The values are means \pm S.D. from three experiments.

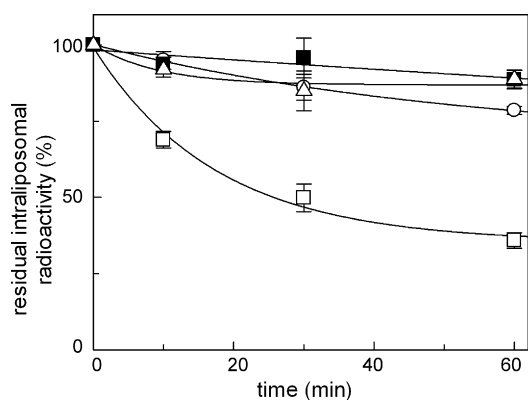


Fig. 9. Time course of [^3H]carnitine efflux from proteoliposomes mediated by the reconstituted transporter in the presence of external omeprazole. Proteoliposomes were prelabelled by transporter-mediated exchange equilibration (see Section 2). After the second passage through Sephadex G-75 columns transport was measured as described in Section 2 in the presence of external 50 mM NaCl adding 0.5 mM carnitine (\square), 0.5 mM activated omeprazole (\blacksquare), 0.5 mM activated omeprazole plus 5 mM DTE (added 2 min before the transport start) (\triangle) or buffer alone (\circ). The transport reaction was stopped at the indicated times, as described in Section 2. The values are means \pm S.D. from three experiments.

the activated omeprazole could react with any of the Cys residues of the transporter before the reconstitution, i.e., before the insertion of the protein in the membrane. Thus the effect of omeprazole on the internal side was investigated in the presence of DTE, i.e., under condition in which omeprazole could not react covalently with the transporter. In this experiments the compound was added in the reconstitution mixture together with DTE and then removed from outside by Sephadex G-75 chromatography (see Section 2). The antiport rate was measured in the presence of various concentration of internal omeprazole. No significant effect was observed in the concentration range from 1 μM to 1 mM internal omeprazole (not shown).

3.3. Investigation of omeprazole transport

According with the interaction of the omeprazole with the substrate binding site, the carnitine transporter might mediate the transport of omeprazole. Since this transporter works by an antiport mode, the transport of the pharmacological agent can be evaluated using it as countersubstrate of [^3H]carnitine. This strategy has been previously adopted to study the transport of carnitine analogues by the reconstituted OCTN2 transporter [21,24]. To this aim, proteoliposomes were loaded with [^3H]carnitine by transporter-mediated exchange equilibration (see Section 2). After this procedure the proteoliposomes contained internal 10 mM [^3H]carnitine. Then, 0.5 mM carnitine, or 0.5 mM omeprazole was externally added to the preloaded proteoliposomes, in the presence of 50 mM NaCl. The addition of unlabelled carnitine caused efflux of the internal radioactivity due to the [^3H]carnitine_{in}/carnitine_{out} antiport; on the contrary nearly no variations of internal radioactivity were observed after the addition of external omeprazole both in the presence or absence of DTE (Fig. 9). The small decrease of intraliposomal radioactivity was comparable to that found in the absence of external substrate. These data indicated that the pharmacological agent could not be transported from outside to inside the proteoliposomes in exchange for internal [^3H]carnitine. In another experiment the uptake of [^3H]carnitine into proteoliposomes containing 1.5 mM omeprazole was studied in comparison with proteoliposomes containing 1.5 mM internal carnitine. In this experiment carnitine was used a lower concentration respect to the other experiments for comparison with since omeprazole, which

could not be included in the proteoliposomes at concentrations above 1.5 mM. The radioactivity accumulation in the proteoliposomes containing omeprazole was comparable to that found in the absence of intraliposomal substrate and much lower than the radioactivity accumulated in the proteoliposomes containing internal carnitine, indicating that the omeprazole was not transported from inside to outside (not shown).

4. Discussion

In the present study, the proteoliposome system reconstituted with the carnitine transporter of kidney apical plasma membrane has been used as a model for the investigation, at the molecular level, of the interaction of omeprazole with the OCTN2 transporter. The reconstituted transport system was previously functionally identified with OCTN2. In proteoliposomes it was shown that the carnitine transporter contains thiol groups of Cys which are exposed towards the extracellular environment [21], in agreement with the secondary structure prediction of OCTN2 [9]. Thus, omeprazole could interact with the exposed Cys residue(s) of the reconstituted carnitine transporter. Indeed, the experimental data described in this work showed for the first time that omeprazole interacts with the carnitine (OCTN2) transporter leading to strong inhibition of its transport function. This inhibition was observed also in intact brush border vesicles, supporting the previously reported observation [21], that the transporter is inserted in the proteoliposomes with the same orientation of the native membrane. The finding that the orientation of the transporter in proteoliposomes is only right side-out [21], may be explained by the formation of mixed micelles of protein, detergent and phospholipids, as the starting step in the reconstitution procedure used. The relatively small radius of the micelles may force all the transporter molecules, which are asymmetrical, to assume the same orientation [21,26,27]. After more detailed functional and kinetic analyses it was found that omeprazole interacts with the carnitine transporter with a double action mechanism. The pharmacological agent reacts covalently with Cys residues, as it was previously found in the case of other membrane proteins [1–4,7,8], with a relatively high affinity. The inhibition, when kinetically analyzed, gave a non-competitive pattern of straight lines in Lineweaver-Burk plot, according to a covalent mechanism of inhibition. The IC_{50} (5.7 μM) and the K_i (5.2 μM) values were very similar, as it occurs in the case of non-competitive inhibition. In addition, omeprazole inhibited the transporter with a different type of interaction that did not involve covalent binding. This was evidenced in experiments performed in the presence of DTE, an S–S reducing agent. The inhibition caused by non-covalent interaction accounted for about 50% of that given by covalent interaction (see Fig. 5). This inhibition has also been kinetically analysed. The competitive pattern found in this case, indicated that the pharmacological agent interacted with the substrate binding site. The affinity of the transporter for omeprazole in this type of interaction was much lower than that observed in the case of covalent interaction. Thus, under experimental condition in which the covalent interaction was favored, the kinetic analysis led to purely non-competitive patterns. The IC_{50} and K_i were both higher than those observed for the non-competitive type of inhibition. The interaction via non-covalent binding with the active site of the transporter can be interpreted in the light of the comparison of the structure of activated omeprazole with that of carnitine (Fig. 2) and taking into account the functional groups which have been found to be essential for the interaction of the transporter with ligands i.e., a tri-substituted charged amino group (ammonium) and a carboxylic group [20,21,33,34]. In addition, using the reconstituted system, it was found that the distance between the two essential groups is not important and that molecules which lack

one or more methyl-amino groups or one of the carboxyl oxygen, can interact and inhibit the transporter but cannot be transported [21]. The activated (but not the non-activated) forms of omeprazole possess a charged pyridine group and a methoxyl oxygen at a reciprocal distance of three carbon atoms which fulfill the requirement for interaction with the active site and inhibition but not for transport. Indeed omeprazole inhibits but is not transported. The competitive inhibition is less efficient than the inhibition caused by the covalent binding; however, the K_i of about 16 μM , is lower than the K_m of the reconstituted transporter for carnitine (see Fig. 7 and ref. [21]), indicating a comparable or higher affinity of the transporter for omeprazole than for the physiological substrate. This could be explained by the presence in the protein of a site for the substrate binding, which is larger than the size of carnitine. Amino acid residues of hydrophobic or hydrophilic nature in this binding site could interact with functional groups of omeprazole which are not present in the carnitine molecule. The interactions stabilize the binding of omeprazole with the transporter leading to a comparable or increased affinity respect to carnitine. These interactions, however, force the transporter in a rigid conformation which could not undergo the structural changes necessary for the exposition of the active site towards the opposite side of the membrane. In agreement with this interpretation omeprazole did not inhibit when added to the internal proteoliposome compartment, i.e., to the internal side of the transporter. This is also in agreement with the functional asymmetry of the carnitine transporter [21]. As previously described, the K_m for internal carnitine was one order of magnitude higher than the external one. Furthermore, a structural asymmetry was also hypothesized on the basis of the hydrophathy analysis of the OCTN2 transport protein, which predicted the existence of a large hydrophilic loop only on the external side of the protein [9]. It has to be stressed that the internal proteoliposome side of the transporter corresponds to the intracellular side [21].

The finding of non-competitive inhibition is typical of inhibition given by covalent reaction of the inhibitor with the protein even in the case of interaction of the inhibitor with the substrate binding site [35,36]. Indeed, the presence of the competitive inhibition demonstrates that the inhibitor interacts with the substrate binding site. In the light of these considerations, the SH group(s) responsible for the inhibition may be located either far or close to the substrate binding site. In this last case protection by the substrate of the omeprazole covalent reaction should be expected. On the contrary, carnitine facilitates the binding of the inhibitor. Very probably the SH group responsible for the inhibition is not located in the active site, but is in its proximity. The binding of carnitine to the active site induces conformational changes leading to an increase of exposition of the SH group which is facilitated to react with omeprazole.

The implication of the two mechanisms of inhibition of the carnitine transporter in physiopathology may be relevant in the light of the omeprazole concentration of about 8 μM reached in the blood 30 min after the oral administration of the pharmacological compound [37]. This concentration is higher than the IC_{50} of the transporter for omeprazole under the non-competitive conditions of reaction and is not very far from the IC_{50} of the competitive interaction. Furthermore, higher concentrations may be reached by the pharmacological compounds in some tissues and especially in the lumen of the gastro-intestine tract. As known, the OCTN2 transporter is expressed in several tissues like the intestine and the liver besides the kidney. Its function is essential in the carnitine homeostasis, as demonstrated by the derangement of the homeostasis caused by defects of the OCTN2 gene. These defects known as primary carnitine deficiencies are characterized by encephalopathy, respiratory distress due to cardiomyopa-

thy, cardiomegaly, metabolic derangement, hyperammonemia, hypoglycemia, mild lipidemia, mild hypercholesterolemia, muscle weakness and myopathy, vomiting [38–40]. The inhibition by omeprazole following the pharmacological administration may lead to a deficiency-like syndrome more or less evident, depending on the dose of administration and on the individual capacity of metabolizing the drug, as observed in the case of other drugs [19]. Indeed, symptoms like stomach pain, dizziness, difficult breathing, muscle spasm, tightening and cramping are described as side effects of omeprazole [see on the WEB: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=4761>]. These symptoms mimic, in a milder form, those described for the primary carnitine deficiency, as found also for other pharmacological interactions [41,42].

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This work has been supported by local funds “ex 60%” from University of Calabria.

References

- [1] P. Lorentzon, B. Eklundh, A. Brandstrom, B. Wallmark, The mechanism for inhibition of gastric (H^+/K^+)-ATPase by omeprazole, *Biochim. Biophys. Acta* 817 (1985) 25–32.
- [2] N. Lambrecht, Z. Corbett, D. Bayle, S.J.D. Karlsh, G. Sachs, Identification of the site of inhibition by omeprazole of a fusion protein of the H,K-ATPase using site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13719–13728.
- [3] W. Bin Im, J.C. Sih, D.P. Blakeman, J.P. McGrath, Omeprazole, a specific inhibitor of gastric (H^+/K^+)-ATPase, is a H^+ -activated oxidizing agent of sulfhydryl groups, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4591–4597.
- [4] M. Besancon, A. Simon, G. Sachs, J.M. Shin, Sites of reaction of the gastric H,K-ATPase with extracytoplasmic thiol reagents, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22438–22446.
- [5] J.M. Shin, Y.M. Cho, G. Sachs, Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H^+/K^+)-ATPase by proton pump inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 7800–7811.
- [6] A. Tari, V. Wu, M. Sumii, G. Sachs, J.H. Walsh, Regulation of rat gastric H^+/K^+ -ATPase alpha subunit mRNA by omeprazole, *Biochim. Biophys. Acta* 1129 (1991) 49–56.
- [7] C. Pauli-Magnus, S. Rekersbrink, U. Klotz, M.F. Fromm, Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364 (2001) 551–557.
- [8] K. Nishioka, T. Nagao, T. Urushidani, Correlation between acid secretion and proton pump activity during inhibition by the proton pump inhibitors omeprazole and pantoprazole, *Biochem. Pharmacol.* 58 (1999) 1349–1359.
- [9] I. Tamai, R. Ohashi, J. Nezu, H. Yabuuchi, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, A. Tsuji, Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20378–20382.
- [10] B. Steiger, B. O'Neill, S. Krahenbuhl, Characterization of L-carnitine transport by rat kidney brush-border-membrane vesicles, *Biochem. J.* 309 (1995) 643–647.
- [11] I. Tamai, R. Ohashi, J. Nezu, Y. Sai, D. Kobayashi, A. Oku, M. Shimane, A. Tsuji, Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40064–40072.
- [12] X. Wu, W. Huang, P.D. Prasad, P. Seth, D.P. Rajan, F. Leibach, J. Chen, S.J. Conway, V. Ganapathy, Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 1482–1492.
- [13] A. Friedrich, P.D. Prasad, D. Freyer, V. Ganapathy, P. Brust, Molecular cloning and functional characterization of the OCTN2 transporter at the RBE4 cells, an in vitro model of the blood-brain barrier, *Brain Res.* 968 (2003) 69–79.
- [14] Y. Kato, M. Sugiura, T. Sugiura, T. Wakayama, Y. Kubo, D. Kobayashi, Y. Sai, I. Tamai, S. Iseki, A. Tsuji, Organic cation/carnitine transporter OCTN2 (Slc22a5) is responsible for carnitine transport across apical membranes of small intestinal epithelial cells in mouse, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 829–837.
- [15] I. Elimrani, K. Lahjouji, E. Seidman, M.J. Roy, G.A. Mitchell, I. Qureshi, Expression and localization of organic cation/carnitine transporter OCTN2 in Caco-2 cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (2003) G863–G871.
- [16] C.A. Wagner, U. Lükewille, S. Kaltenbach, I. Moschen, A. Bröer, T. Rislér, S. Bröer, F. Lang, Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279 (2000) F584–F591.
- [17] I. Tamai, K. China, Y. Sai, D. Kobayashi, J. Nezu, E. Kawahara, A. Tsuji, Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2

- and its subcellular localization in kidney, *Biochim. Biophys. Acta* 1512 (2001) 273–284.
- [18] X. Wu, P.D. Prasad, F.H. Leibach, V. Ganapathy, cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 589–595.
- [19] R. Ohashi, I. Tamai, H. Yabuuchi, J. Nezu, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane, A. Tsuji, Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291 (1999) 778–784.
- [20] R. Ohashi, I. Tamai, J. Nezu, H. Nikaido, N. Hashimoto, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane, A. Tsuji, Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 358–366.
- [21] L. Pochini, F. Oppedisano, C. Indiveri, Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 (2004) 78–86.
- [22] L. Pochini, M. Galluccio, D. Scumaci, N. Giangregorio, A. Tonazzi, F. Palmieri, C. Indiveri, Interaction of beta-lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter, *Chem. Biol. Interact.* 173 (2008) 187–194.
- [23] F. Oppedisano, D. Fanello, M. Calvani, C. Indiveri, Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22 (2008) 8–14.
- [24] O. Piermatti, F. Fringuelli, L. Pochini, C. Indiveri, C.A. Palmerini, Synthesis and characterization of carnitine nitro-derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 1444–1451.
- [25] J. Biber, B. Stieger, W. Haase, H. Murer, A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers, *Biochim. Biophys. Acta* 647 (1981) 169–176.
- [26] R. Krämer, C. Heberger, Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column, *Biochim. Biophys. Acta* 863 (1986) 289–296.
- [27] F. Palmieri, C. Indiveri, F. Bisaccia, V. Iacobazzi, Mitochondrial metabolite carrier proteins: purification, reconstitution, and transport studies, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 349–369.
- [28] F. Palmieri, M. Klingenberg, Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria, *Methods Enzymol.* 56 (1979) 279–301.
- [29] S. Ohnishi, H. Saito, A. Fukada, K. Inui, Distinct transport activity of tetraethylammonium from L-carnitine in rat renal brush-border membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1609 (2003) 218–224.
- [30] J.R. Duley, P.A. Grieve, A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination, *Anal. Biochem.* 64 (1975) 136–141.
- [31] A. Tonazzi, N. Giangregorio, F. Palmieri, C. Indiveri, Relationships of Cysteine and Lysine residues with the substrate binding site of the mitochondrial ornithine/citrulline carrier: an inhibition kinetic approach combined with the analysis of the homology structural model, *Biochim. Biophys. Acta* 1718 (2005) 53–60.
- [32] M. Dixon, The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.* 55 (1953) 170–171.
- [33] R. Ohashi, I. Tamai, A. Inano, M. Katsura, Y. Sai, J. Nezu, A. Tsuji, Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 1286–1294.
- [34] L. Todesco, D. Bur, H. Brooks, M. Török, L. Landmann, B. Stieger, S. Krähenbühl, Pharmacological manipulation of L-carnitine transport into L6 cells with stable overexpression of human OCTN2, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 1596–1608.
- [35] C. Indiveri, A. Tonazzi, N. Giangregorio, F. Palmieri, Probing the active site of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria with sulfhydryl reagents. A cysteine residue is localized in or near the substrate binding site, *Eur. J. Biochem.* 228 (1995) 271–278.
- [36] J.L. Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. II, Academic Press, New York/London, 1966, p. 771 (Chapter 7).
- [37] M. Hassan-Alin, T. Andersson, M. Niazi, K. Röhss, A pharmacokinetic study comparing single and repeated oral doses of 20 mg and 40 mg omeprazole and its two optical isomers, S-omeprazole (esomeprazole) an R-omeprazole, in healthy subjects, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60 (2005) 779–784.
- [38] Y. Wang, J. Ye, V. Ganapathy, N. Longo, Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 2356–2360.
- [39] K. Lahjouji, G.A. Mitchell, I.A. Qureshi, Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 73 (2001) 287–297.
- [40] J. Nezu, I. Tamai, A. Oku, R. Ohashi, H. Yabuuchi, N. Hashimoto, H. Nikaido, Y. Sai, A. Koizumi, Y. Shoji, G. Takada, T. Matsuishi, M. Yoshino, H. Kato, T. Ohura, G. Tsujimoto, J. Hayakawa, M. Shimane, A. Tsuji, Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter, *Nat. Genet.* 21 (1999) 91–94.
- [41] I. Tein, S. DiMauro, Z.W. Xie, D.C. De Vivo, Valproic acid impairs carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts. An in vitro model for the pathogenesis of valproic acid-associated carnitine deficiency, *Pediatr. Res.* 34 (1993) 281–287.
- [42] I. Tein, Z.W. Xie, Reversal of valproic acid-associated impairment of carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 (1994) 753–758.

Editorial Manager(tm) for Molecular Biotechnology
Manuscript Draft

Manuscript Number: MOBI-D-10-00267

Title: Over-expression in E. coli and purification of the human OCTN2 transport protein.

Article Type: Research Papers

Keywords: OCTN2

E. coli

Over-expression

Purification

Codon Bias

Corresponding Author: Cesare Indiveri

Corresponding Author's Institution:

First Author: Michele Galluccio

Order of Authors: Michele Galluccio;Linda Amelio;Mariafrancesca Scalise;Lorena Pochini;Eckhard Boles;Cesare Indiveri

Abstract: The OCTN2 cDNA amplified from human skin fibroblast was cloned in pET-41a(+) carrying the glutathione S-transferase (GST) gene. The construct pET-41a(+)-hOCTN2 was used to express the GST-hOCTN2 fusion protein in E. coli Rosetta(DE3)pLysS. The best over-expression was obtained after 6 h of induction with IPTG at 28°C. The GST-hOCTN2 polipeptide was collected in the insoluble fraction of the cell lysate and showed an apparent molecular mass on SDS-PAGE of 85 kDa. After solubilization with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl and 3 M urea the fusion protein was applied onto a Ni²⁺-chelating chromatography column. The purified GST-hOCTN2 was treated with thrombin and the hOCTN2 was separated from the GST by size exclusion chromatography. After the whole procedure a yield of about 0.02 mg purified protein per litre of cell culture was obtained. To improve the protein yield, hOCTN2 cDNA was subjected to codon bias. The second codon CGG was substituted with AAA; the substitution led to the mutation R2K in the hOCTN2 protein. hOCTN2(R2K) cDNA was cloned in pET-21a(+) carrying a C-terminal 6His tag. The resulting protein was expressed in E. coli Rosetta(DE3)pLysS and purified by Ni²⁺-chelating chromatography. A yield of about 3.5 mg purified protein per litre of cell culture was obtained with this procedure.

Suggested Reviewers: Celia Goulding
celia.goulding@uci.edu

Hartmut Wohlrab
wohlab@bbri.org

Tiziano Verri
tiziano.verri@unisalento.it

Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein.

Michele Galluccio^a, Linda Amelio^a, Mariafrancesca Scalise^a, Lorena Pochini^a, Eckhard Boles^b,
Cesare Indiveri^a

^a Department of Cell Biology, University of Calabria, Via P. Bucci 4c 87036 Arcavacata di Rende,
Italy

^b Institute of Molecular Biosciences, Goethe-University Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Str. 9,
60438 Frankfurt am Main, Germany

Correspondence to:

Cesare Indiveri,

Dipartimento di Biologia Cellulare

Università della Calabria

Via P.Bucci cubo 4c

87036 Arcavacata di Rende (CS)

Italy.

Tel.: +39-0984-492939

Fax: +39-0984-492911

e-mail: indiveri@unical.it

Michele Galluccio e-mail: mgalluccio@unical.it

Linda Amelio e-mail: linda.amelio@unical.it

Mariafrancesca Scalise e-mail: mariafrancesca.scalise@unical.it

Lorena Pochini e-mail: pochini@unical.it

Eckhard Boles e-mail: e.boles@bio.uni-frankfurt.de

Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN2 transport protein.

Abstract

The OCTN2 cDNA amplified from human skin fibroblast was cloned in pET-41a(+) carrying the glutathione S-transferase (GST) gene. The construct pET-41a(+)-hOCTN2 was used to express the GST-hOCTN2 fusion protein in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The best over-expression was obtained after 6 h of induction with IPTG at 28°C. The GST-hOCTN2 polypeptide was collected in the insoluble fraction of the cell lysate and showed an apparent molecular mass on SDS-PAGE of 85 kDa. After solubilization with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl and 3 M urea the fusion protein was applied onto a Ni²⁺-chelating chromatography column. The purified GST-hOCTN2 was treated with thrombin and the hOCTN2 was separated from the GST by size exclusion chromatography. After the whole procedure a yield of about 0.2 mg purified protein per litre of cell culture was obtained. To improve the protein yield, hOCTN2 cDNA was subjected to codon bias. The second codon CGG was substituted with AAA; the substitution led to the mutation R2K in the hOCTN2 protein. hOCTN2(R2K) cDNA was cloned in pET-21a(+) carrying a C-terminal 6His tag. The resulting protein was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS and purified by Ni²⁺-chelating chromatography. A yield of about 3.5 mg purified protein per litre of cell culture was obtained with this procedure.

1. Introduction

Membrane proteins represent a significant fraction of proteomes of all organisms (1). Among the membrane proteins, transporters play essential roles in living organisms since they are involved in nutrient uptake, elimination of catabolites and regulation of the homeostasis of several cofactors and metabolites. That transport systems are essential for life is demonstrated by the occurrence of severe pathologies, which are caused by defects of transporter coding genes (2-7). The chemico-physical properties of membrane proteins, like insolubility in water and propensity to aggregate, make them

difficult to handle. These properties limit both functional and structural studies of transporters and, in general, of membrane proteins. One of the main challenge of the study of membrane proteins from mammals, is the difficulty in heterologous expression. This problem is more evident in bacterial hosts which, indeed, are the most suitable to obtain large scale preparations of proteins for structural studies (8). Recently, the over-expression in *E. coli* of the human OCTN1 transporter was obtained (9) with a yield of 3 mg purified protein per litre of cell culture. This transporter belongs to a small protein subfamily whose members, OCTN1, OCTN2 and OCTN3 have been identified only in higher mammals (10); OCTN3 has still not been identified in *H. sapiens*. The OCTN2 member of the subfamily is the most widely characterized at the functional level. After studies in brush-border vesicles (11), this transport system has been cloned and functionally characterized in intact cell systems expressing the transport protein in minute amount (10, 12). It catalyses a sodium-dependent carnitine transport which is inhibited by acylcarnitines, betaine, choline and tetraethylammonium. The carnitine OCTN2 transporter extracted from rat kidney has also been studied in proteoliposomes, in which the functional aspects found in cells have been confirmed and novel properties have been revealed (13). Using SH specific chemical reagents in the reconstituted system, it has been found that the OCTN2 transporter possesses extra cytoplasmic Cys residues. One or more of these residues represent the target of omeprazole which inactivates the transporter; this finding explains some of the side effects of the drug (14). OCTN2 is widely expressed in several tissues and, hence, it is involved in the regulation of the homeostasis of carnitine in mammals. Defects of the OCTN2 gene have been reported to be the cause of primary carnitine deficiency, a syndrome characterized by several symptoms including cardiomyopathy, progressive muscle weakness and non ketotic hypoglycemia (3). It is of great interest to obtain the over-expression of the human orthologue of OCTN2 and its large scale purification to allow structural studies and further functional analysis of the protein to define its role in metabolism and

relationships with pathologies. To express the transport protein in large scale, different strategies were employed, which are described in this work.

2. Materials and Methods

2.1. Materials.

All chemicals, HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel (P6611) and the Anti-His antibody ("Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody produced in mouse" A7058) were from Sigma–Aldrich, pET vectors, *E. coli* Rosetta(DE3) and RosettaGami2(DE3)pLysS and other strains from Novagen, *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21(DE3) from Lucigen, restriction endonucleases, other cloning reagents from Fermentas, Profinity IMAC resin Ni²⁺ charged resin from BioRad.

2.2. Cloning of cDNA coding for hOCTN2.

Total RNA was isolated from primary human fibroblasts and reverse-transcribed. The 1674 bp cDNA corresponding to the encoding sequence for hOCTN2 (GenBank NM_003060) was amplified using the forward and reverse primers 5'- ATGCGGGACTACGACGAGGTGACCG-3' and 5'- TTAGAAGGCTGTGCTTTTAAGGATT-3', respectively. The amplified cDNA sequence was verified. Sequencing was performed three times by ABI 310 automated sequencer Applied Biosystems. The full length cDNA coding for hOCTN2 was amplified using the forward and reverse primers 5'- GCGGATCCATGCGGGACTACGACGAG-3' and 5'- CCCAAGCTTTTAGAAGGCTGTGCTTTT-3', containing the BamHI and HindIII sites, respectively and cloned in the BamHI/HindIII sites of the pET-41a(+) expression vector. The resulting recombinant plasmid, defined as pET-41a(+)-hOCTN2, encoded a fusion protein corresponding to the hOCTN2 carrying the extra N-terminal sequence containing the GST tag, 6His tag and a S tag.

2.3. Expression of recombinant GST-hOCTN2 protein in E. coli and purification.

To obtain the recombinant hOCTN2 protein, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS was transformed with the pET-41a(+)-hOCTN2 construct by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of 2x YT medium (1.6% Bacto peptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol, 1M sorbitol, 2.5 mM betaine and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~ 200 rpm). 50 mL aliquot of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh 2x YT medium supplemented with 30 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol, 1M sorbitol, 2.5 mM betaine and in the middle of the logarithmic phase (0.5-0.7 O.D. at 600 nm wavelength), 0.4 mM IPTG was added to induce the expression of the recombinant protein and the temperature was lowered to 28 °C. In all the cases, after the induction two aliquots of 0.25 L each of cells were grown at 28 °C and 37 °C, respectively. Every two hours, fractions of 50 ml were harvested by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4 °C and the pellet stored at -20 °C. The bacterial pellet (about 0.4 g wet weight) was thawed on ice for 15 min and resuspended in 5 mL 20 mM Hepes/Tris pH 7.5 supplemented with 20 µL of protease inhibitor cocktail (P8849, Sigma–Aldrich) and 0.5mM PMSF. Cells were disrupted by mild sonication at 4 °C (10 min in pulses of 1 s sonication, 1 s intermission). The soluble and the insoluble cell fractions were separated by centrifugation of the cell lysate at 12,000g for 30 min at 4 °C. The protein patterns of the cell lysate fractions were analyzed by SDS-PAGE. The insoluble fraction obtained as described above, was incubated for 15 min at 20 °C and 1000 rpm in Eppendorf thermomixer in 100 mM DTE and then solubilized with a buffer containing 3 M urea, 0.8 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0 and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was applied onto a column filled with Profinity IMAC Ni²⁺ charged resin (0.5 cm diameter, 2.5 cm height) pre-conditioned with 5 ml of a buffer containing 0.1 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10%

glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.4. The elution was performed with 3 ml of a buffer containing 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.4 and then 3 ml of the same buffer containing 50 mM imidazole. 12 fractions of 1 ml were collected. The purified protein was eluted in the fraction 10. 1 ml of 10th fraction containing about 120 µg of the purified hOCTN2-GST protein was incubated with 0.1 U thrombin at 25°C for 4 h at 1000 rpm in Eppendorf thermomixer.

2.4. Expression of recombinant hOCTN2(R2K) protein in *E. coli* and purification.

To clone the full length hOCTN2 cDNA in the NdeI/XhoI sites of the pET-21a(+) expression vector, the NdeI restriction site of hOCTN2 at 1159 position we firstly removed by site-directed mutagenesis using the following forward and reverse primers 5'-TTGAAGTCCCAGCATAACGTGTTGGCCT-3', 5'-AGGCCAACACGTATGCTGGGACTTCAA-3', respectively which do not carry any amino acid mutation. Then, the cDNA was amplified with the forward and reverse primers 5'-GGGAATTCCATATGAAAGACTACGACGAGGTG-3' and 5'-CCGCTCGAGGAAGGCTGTGCTTTTAAGGAT-3', containing the NdeI and XhoI respectively. The resulting recombinant construct, pET-21a(+)-hOCTN2(R2K), encoded a fusion protein corresponding to the hOCTN2 carrying the mutation R2K and the extra C-terminal sequence 6-His tag. To obtain the recombinant hOCTN2 protein, the expression host *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS was transformed with the pET-21a(+)-hOCTN2(R2K) plasmid by calcium chloride treatment. Selection of transformed colonies was performed on LB-agar plates containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. Cells carrying the recombinant plasmid were inoculated in 100 mL of 2x YT medium (1.6% Bacto peptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol, and cultured overnight at 37 °C with rotary shaking (~ 200 rpm). 50 mL aliquot of the cell culture was transferred to 0.5 L of fresh 2x YT medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol and

in the middle of the logarithmic phase (0.5-0.7 O.D. at 600 nm wavelength), 0.1 mM IPTG was added to induce the expression of the recombinant protein and the temperature was lowered to 28°C. Every two hours, fractions of 50 ml were harvested by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4°C and the pellet stored at -20 °C. The bacterial pellet (about 0.4 g wet weight) was thawed on ice for 15 min and resuspended in 5 mL 20 mM Hepes/Tris pH 7.5 supplemented with 20 µL of protease inhibitor cocktail (P8849, Sigma–Aldrich) and 0.5mM PMSF. Cells were disrupted by mild sonication at 4 °C (10 min in pulses of 1 s sonication, 1 s intermission). The soluble and the insoluble cell fractions were separated by centrifugation of the cell lysate at 12,000g for 30 min at 4 °C. The protein patterns of the cell lysate fractions were analyzed by SDS-PAGE. The insoluble fraction obtained as described above, was incubated for 15 min at 20 °C and 1000 rpm in Eppendorf thermomixer with 100 mM DTE and then solubilized with a buffer containing 3 M urea, 0.8 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10 % glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. The sample was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was applied onto a column filled with His-select Ni²⁺-chelating affinity gel (0.5 cm diameter, 2.5 cm height) pre-conditioned with 5 ml of a buffer containing 0.1 % Sarkosyl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Tris/HCl pH 8.0. The elution was performed with 3 ml of a buffer containing 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTE, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, then 3 ml containing 100 mM imidazole of the same buffer. 15 fractions of 1 ml were collected. The purified protein was eluted in the fraction 14.

2.5. Other methods.

Protein concentration was measured by the method of Lowry, modified for the presence of detergents (*16*). Proteins were separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels performed according to Laemmli (*17*), using the Hoefer SE260 mini-vertical unit and stained by Coomassie-brilliant blue. Quantitative evaluation of Coomassie-stained protein bands was carried out using the Chemidoc imaging system equipped with Quantity One software (Bio-Rad).

3. Results.

3.1. Expression of the GST-hOCTN2 construct.

The 1674 bp hOCTN2 cDNA was amplified from total human skin fibroblast RNA using forward and reverse primers constructed on the 5' and 3' ends of the hOCTN2 cDNA (GenBank NM_003060). The amplified cDNA showed an electrophoretic mobility on agarose gel corresponding to about 1700 bp, very close to its theoretical size. Upon sequencing, no mutations were found in the cDNA as compared to the deposited hOCTN2 sequence (not shown). To determine whether hOCTN2 could be expressed in *E. coli*, different vectors and host bacterial strains were used and the experimental conditions were varied. The isolated cDNA was amplified and cloned in the vectors pET-28a(+), pMWT7, pH6EX3 and pET-22b(+). However, the recombinant plasmids containing the hOCTN2 did not lead to any detectable expression of the protein in the *E. coli* strains: Rosetta(DE3)pLysS, RosettaGami2(DE3)pLysS, C41(DE3), C43(DE3) and BL21(DE3). Thus, a different strategy was employed. The hOCTN2 was inserted in the pGEX-4T1 plasmid carrying the glutathione S-transferase (GST) gene to obtain a construct GST-hOCTN2 with improved solubility which could be purified under native condition on glutathione-agarose affinity resin. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3). The cell lysates obtained under different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. However, the presence of an expression product analyzed on SDS-PAGE, was observed only in the insoluble fractions (not shown). The protein in the insoluble state needed to be solubilized with denaturing detergents such as Sarkosyl or SDS which would denature also the GST tag impeding the purification. Thus, a similar strategy was adopted using the pET-41a(+) vector which allowed us to insert also a 6His tag between the GST and hOCTN2 to perform the purification on Ni²⁺-chelating resin under denaturing conditions (9). The construct pET-41a(+)-GST-hOCTN2 was used to transform Rosetta(DE3)pLysS strain. To optimize the expression of

GST-hOCTN2, the time after induction by IPTG and the growth temperature were varied. The cell lysates obtained under the different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. On SDS-PAGE, A heavily stained protein band was observed after induction by IPTG, in the insoluble fraction (inclusion bodies) which was absent in the uninduced lysate (Fig. 1). The amount of protein increased with the time up to 6 h of induction. The best enrichment of the expressed protein with respect to the bacterial ones was obtained at 28 °C and 0.4 mM IPTG after 6 h; no further increase of expression was observed at longer times of induction (not shown). The apparent molecular mass was 85 kDa, lower than the theoretical molecular mass of the construct GST-hOCTN2, 95043 Da calculated on the basis of the amino acid composition (see section 2.5). The over-expressed protein was identified as GST-hOCTN2 (see Fig. 2 lane 5).

3.2. Purification of the expressed GST-hOCTN2.

The GST-hOCTN2 expressed protein was solubilized with Sarkosyl as previously done for hOCTN1 (9). The minimal concentration of Sarkosyl which was still effective in solubilizing the expressed protein was 0.8 %. Whereas the protein was not soluble in non ionic detergents like Triton X-100 and C₁₂E₈ (not shown). The protein pellet (Fig. 1 lane 4) was solubilized with a buffer containing 0.8 % Sarkosyl, 3 M urea, 8 mM DTE (see Materials and Methods). The solubilized protein was loaded onto a Ni²⁺-chelating column. After washing with a buffer containing 20 mM Tris/HCl pH 8.5, 0.1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 5 mM DTE virtually all the proteins of bacterial origin were removed. Then the GST-hOCTN2 was eluted with the same buffer added with 50 mM imidazole; it resulted as a single protein band on SDS-PAGE (Fig. 2, lane 1), which was identified by immunodecoration with anti-His antibody (Fig. 2, lane 5). The GST-hOCTN2 in the purified fraction was enriched about 10 folds with respect to the cell lysate.

3.3. Thrombin treatment and separation of hOCTN2.

The purified GST-hOCTN2 fusion protein was subjected to thrombin treatment. The time of digestion was optimized to obtain the complete cleavage of the fusion protein. As shown in Fig. 2, after 3 h most of the OCTN2 had been cleaved and after 4 h the cleavage was complete (Fig. 2 lane 4). To separate the OCTN2 protein from the GST polypeptide the cleaved fraction was applied on a size exclusion chromatography resin. As shown in Fig. 3 the two proteins were separated by this procedure. After the entire procedure the yield of purified OCTN2 was 0.2 mg per litre of cell culture (3.5 g of wet weight cells).

3.4. Expression and purification of hOCTN2(R2K).

To express the hOCTN2 without GST tag, a different strategy was employed. It was known that the codon usage of *E. coli* is different from eukaryotic organisms (18). In particular, we have optimized the second codon of the OCTN2 cDNA according to the most frequently occurring in *E. coli* genes. The best compromise between a second codon frequently used by *E. coli* and the consequent amino acid mutation was the substitution of the second codon of WT hOCTN2, CGG with AAA. By this substitution the second amino acid was conservatively changed from Arg to Lys, which should not lead to structure/function variation of the protein. The 1674 bp hOCTN2(R2K) cDNA was amplified and cloned in the vector pET-21a(+) which inserted a 6His tag at the C-terminus of the protein. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The cell lysates obtained under different conditions were separated in the soluble and the insoluble fractions by centrifugation. An heavy stained protein band on SDS-PAGE, was observed in the insoluble fractions from IPTG induced cells, which was not present in non induced cell lysate (Fig. 4). The best condition for expression was obtained after 4 h induction with 0.1 mM IPTG at 28°C. The increase of IPTG to 0.4 or 1 mM and the increase of temperature led to reduction of expression (not shown). The protein was solubilized from the insoluble fraction with Sarkosyl and Urea essentially

as previously done for the GST-hOCTN2 construct, with the exception that the pH of the buffers was pH 8.0. The solubilized protein was then purified on Ni²⁺-chelating with a procedure similar to that used for the GST-hOCTN2 construct, except that 100 mM imidazole was used instead of 50 mM to achieve the elution of the protein. As shown in Fig. 5 the apparent molecular mass of the purified protein was 54 kDa i.e., coincident with that of the protein obtained with the GST-hOCTN2 construct after thrombin digestion. The hOCTN2 was identified by immunodecoration with anti-His antibody both in the insoluble cell lysate and in the purified fraction. The protein yield after the purification procedure was about 3.5 mg per liter of cell culture (3.5 g of wet weight cells).

4. Discussion

The reported results represent, to our knowledge, the first report of over-expression of the human OCTN2 transport protein in bacteria. To obtain this goal the procedure previously used for the over-expression of hOCTN1 was firstly attempted. Unfortunately, this procedure revealed not suitable for hOCTN2, in spite of the high identity between the two proteins. Thus, several different plasmids and *E. coli* strains for cloning and expressing the hOCTN2 were also checked, but without any success. Only the introduction of a GST tag at the N-terminal end of the hOCTN2 led to expression of the protein. The construct GST-hOCTN2 could potentially be purified using glutathione-agarose resin. However, such procedure could be performed only with native GST. But, the over-expressed GST-hOCTN2 was recovered in the insoluble cell fraction which was solubilized only by denaturing detergents. Thus, the purification procedure with glutathione-agarose resin could not be performed with denatured GST. However, since the introduction of GST had revealed useful for the expression of hOCTN2 a second construct was assembled which, besides GST, contained also a 6His tag which would be useful to purify the protein construct starting from a denatured state. The new construct, which was over-expressed as well, could be purified also in the denatured state using a Ni²⁺-chelating resin. Indeed the over-expressed GST-hOCTN2 was successfully purified and,

then, the hOCTN2 was separated from the GST by thrombin treatment and size exclusion chromatography. Interestingly, the hOCTN2, which could be solubilized only with ionic detergents from the cell lysate, became soluble in 0.1 % Triton X-100 after purification. This was most probably due to the refolding of the protein, as previously described for the over-expressed hOCTN1. The overall yield of this procedure was, however, not very high. The scarce recovery was due, among other things, to the several steps required to obtain the hOCTN2. A completely different strategy employing codon optimization was used to obtain the over-expressed protein without any N-terminus tags. It was known that *E. coli* statistically uses selected second codons (18). Starting from this observation we designed the mutation of the hOCTN2 cDNA to substitute the second codon CGG with a triplet which is more frequent at second position of *E. coli* genes. The triplet chosen was AAA resulting in a conservative substitution of the second amino acid of hOCTN2(R2K). The mutated cDNA was highly expressed by *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. The protein was then purified using the same procedure described for the construct GST-hOCTN2. The yield of this procedure was much higher than that obtained with the previous construct. Also in this case the purified hOCTN2 became soluble in 0.1 % Triton X-100.

5. References

1. Wallin, E., von Heijne, G., (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029-1038.
2. Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano A., (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969-1054.
3. Lahjouji, K., Mitchell, G.A., Qureshi., (2001) Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 73, 287-297.
4. Daniel, H., Kottra, G., (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 447, 610-618.

5. Wright, E.M., Turk, E., (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447, 510-518.
6. Bröer, A., Cavanaugh, J.A., Rasko, J.E., Bröer, S., (2006) The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch.* 451, 511-517.
7. Palmieri, F., (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 564-578.
8. Tate, C.G., (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* 504, 94-98.
9. Galluccio, M., Pochini, L., Amelio, L., Accardi, R., Tommasino, M., Indiveri, C., (2009) Over-expression in *E. coli* and purification of the human OCTN1 transport protein. *Protein. Expr. Purif.* 68, 215-220.
10. Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J.I., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., Tsuji A., (2000) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.* 275, 40064-40072.
11. Lahjouji, K., Malo, C.K., Mitchell, G.A., Qureshi, I.A., (2002) L-Carnitine transport in mouse renal and intestinal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 82– 93.
12. Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, Y., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A., (1998) Molecular and functional identification of sodium iondependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273, 20378– 20382.
13. Pochini, L., Oppedisano, F., Indiveri, C., (2004) Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1661, 78-86.

14. Pochini, L., Scalise, M., Indiveri, C., (2009) Inactivation by omeprazole of the carnitine transporter (OCTN2) reconstituted in liposomes. *Chem. Biol. Interact.* 179, 394-401.
15. Wu, X., Huang, W., Prasad, P.D., Seth, P., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., Ganapathy, V., (1999) Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1482-1492.
16. Dulley, J.R., Grieve P.A., (1975) A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.* 64, 136-141.
17. Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
18. Niimura, Y., Terabe, M., Gojobori, T., Miura, K., (2003) Comparative analysis of the base biases at the gene terminal portions in seven eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31, 5195-5201.

Legends to Figures.

Fig. 1. Expression of recombinant pET-41a(+)-hOCTN2 in *E. coli* Rosetta(DE3). Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers: β -galactosidase (116 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), REase BSP98I (25 kDa); lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2-4: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g), after 2 h, 4 h and 6 h of IPTG-induction, respectively.

Fig. 2. Purification and cleavage of the GST-hOCTN2 fusion protein. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1. Lane 1: purified GST-hOCTN2 fusion protein (8 μ g); lane 2-4: protein fractions of lane 1 after incubation with thrombin for 1, 3 or 4 h, respectively. Lane 5 3,3'-diaminobenzidine

immunodetection by anti-His antiserum (1:1000) of PVDF membrane after Western Blotting of the same protein fraction of lane 1.

Fig. 3. Purification of the expressed hOCTN2. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1. Lane 1: hOCTN2 protein (10 μ g); lane 2 GST protein.

Fig. 4. Expression of recombinant pET-21a(+)-hOCTN2(R2K) in *E. coli*. Rosetta (DE3)pLysS. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. Lane M: molecular mass markers as in Fig. 1; lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2-4: pellets of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g), after 1 h, 2 h and 4 h of IPTG-induction, respectively.

Fig. 5. Purification of the hOCTN2(R2K) protein. Proteins were separated by SDS-PAGE and stained as described in Materials and Methods. (A) lane M: molecular mass markers: BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa); lane 1, uninduced cell lysate (80 μ g), lanes 2: pellet of the insoluble fraction of cell lysate (80 μ g) corresponding to lane 4 of Fig. 4; lane 3, purified OCTN2 (8 μ g). (B) 3,3'-diaminobenzidine immunodetection by anti-His antiserum (1:1000) of PVDF membrane after Western Blotting of the same protein fractions of lanes 1-3.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

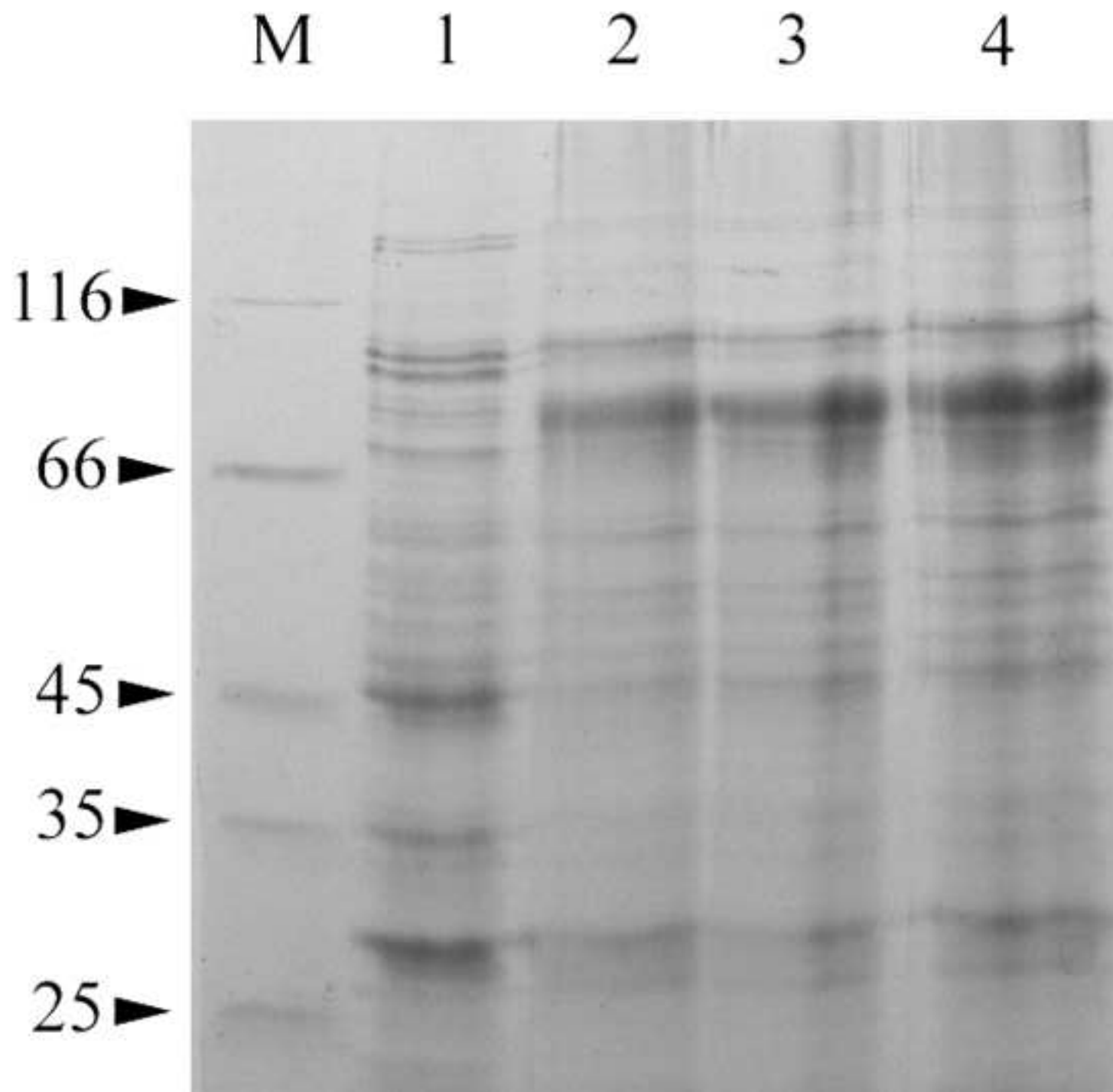


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

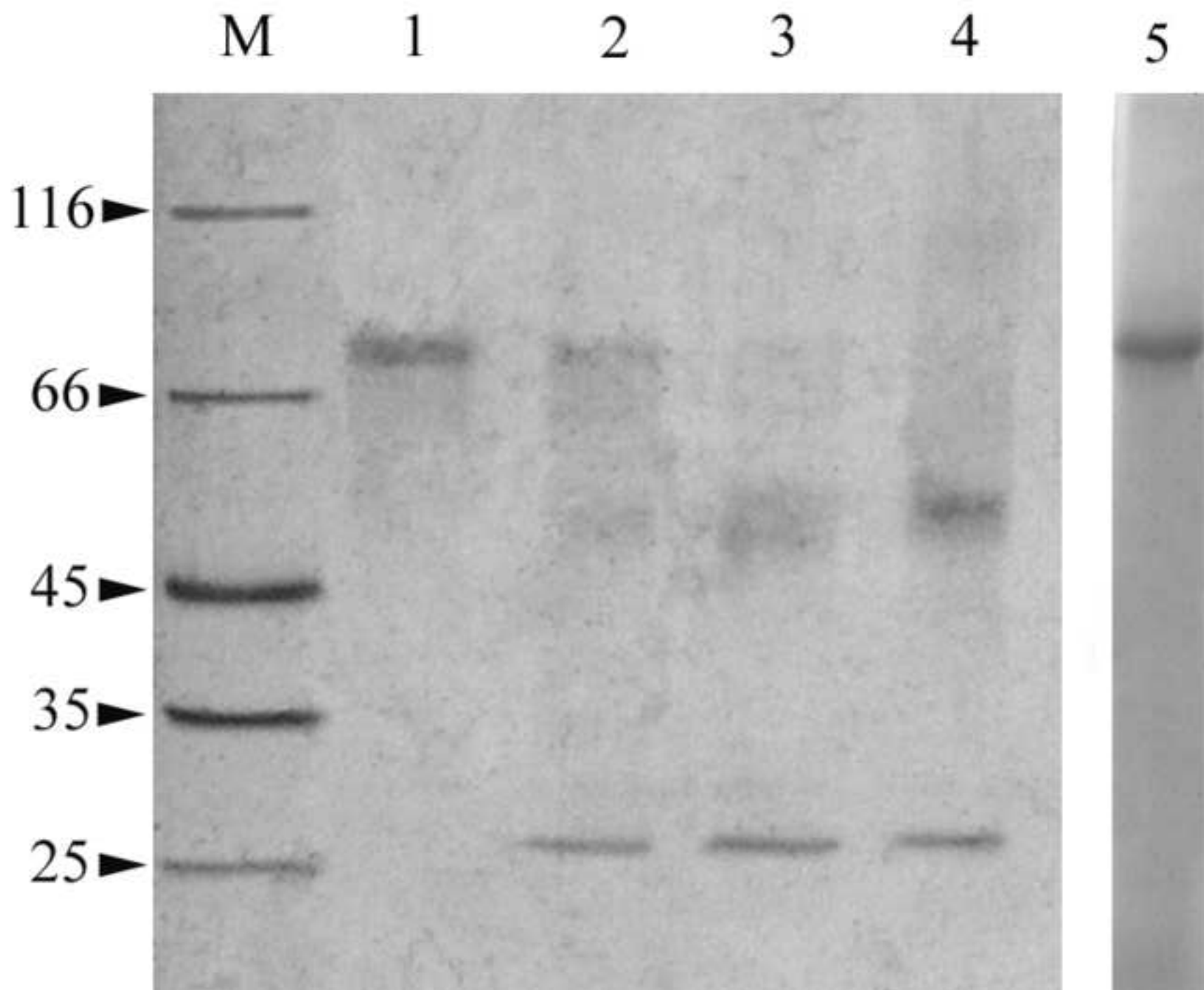


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

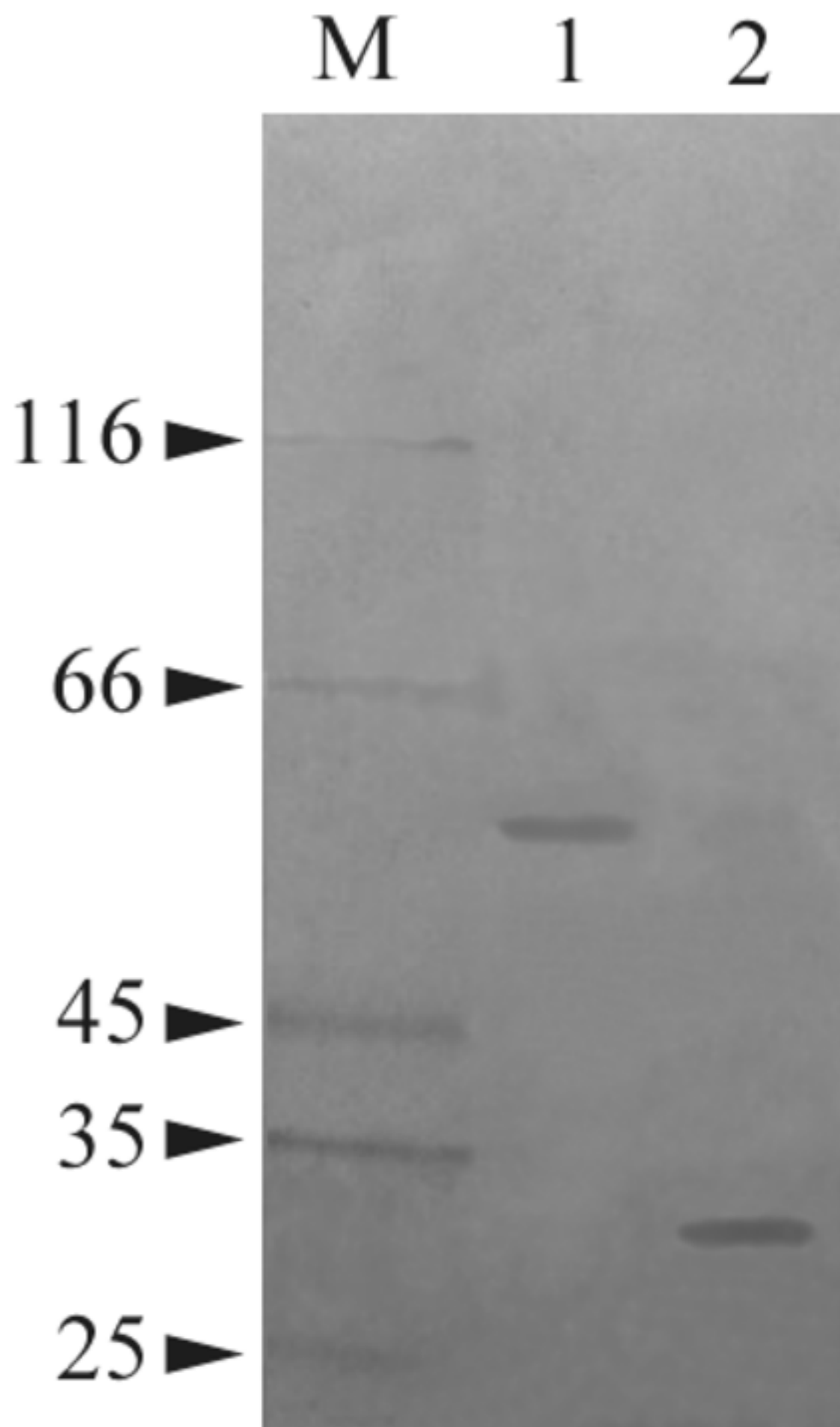


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

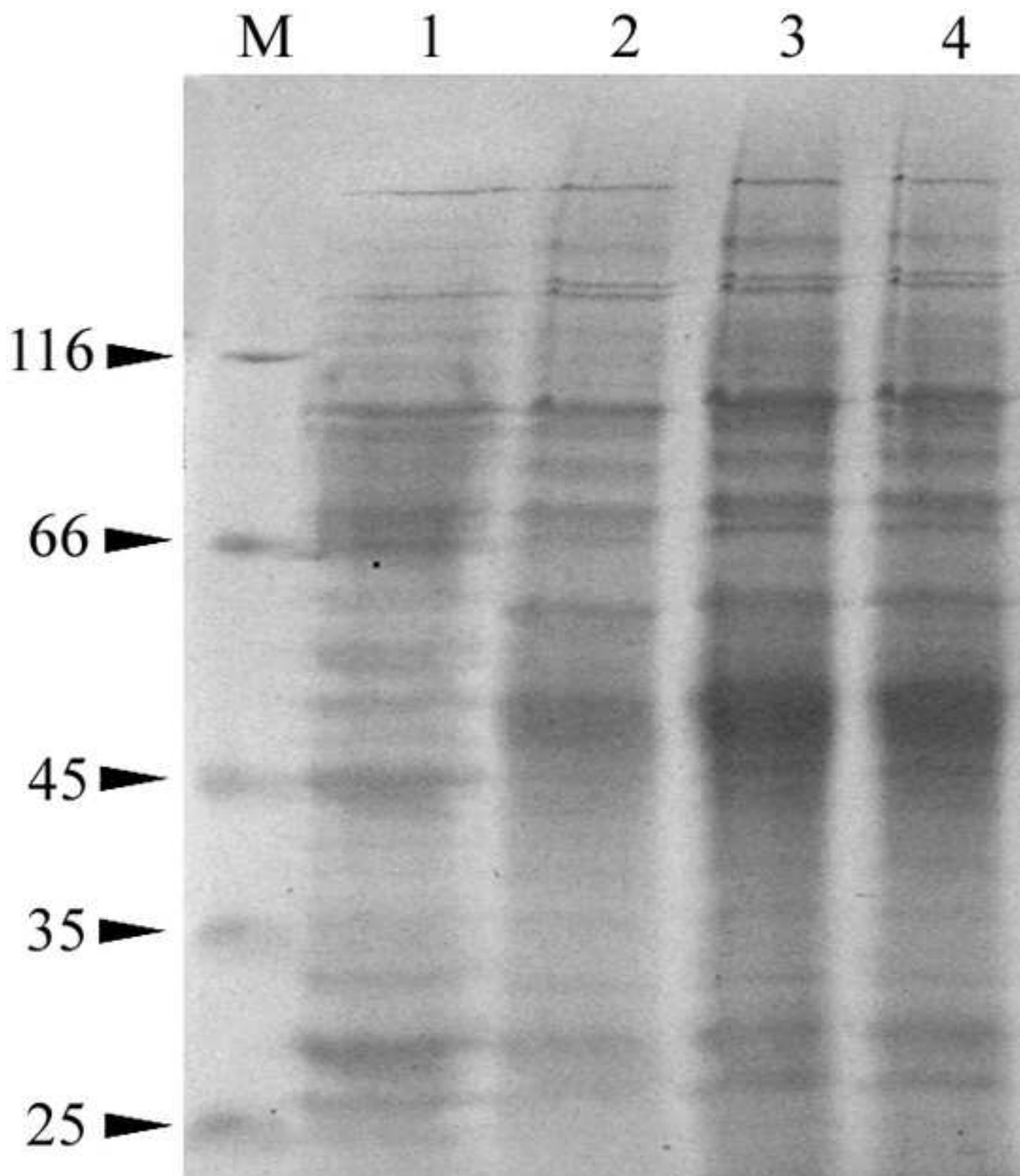


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

