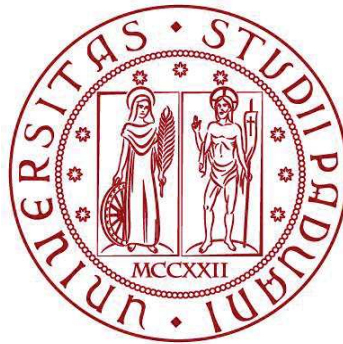


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**COLTURE CELLULARI COME MODELLO SPERIMENTALE IN
VITRO DELLA MIOPATIA DI BRODY**

**Tutor: Prof.ssa Roberta Sacchetto
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

**Co-tutor: Dott.ssa Eylem Emek Akyürek
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Laureanda: Jessica Cavedon

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	3
1. STATO DELL'ARTE	5
1.1 Anatomia del muscolo scheletrico	5
1.2 Fisiologia del muscolo	6
1.3 SERCA	6
1.4 Pseudomiopia congenita in bovini Chianina (PMT)	7
1.5 Pseudomiopia congenita in bovini Romagnola	8
1.6 Miopatia di Brody	8
2. METODI	9
2.1 Amplificazione di plasmidi che contengono il cDNA che esprime la proteina, sia di coniglio che di bovino.	9
2.2 Colture cellulari utilizzate	11
2.3 Trasfezione	11
2.4 Estrazione e quantificazione di proteine	12
2.5 Gel elettroforesi e western blot	12
2.6 Western blotting	14
2.7 Immunofluorescenza	15
3. RISULTATI	17
3.1 Espressione delle varianti Ser766Phe e Gly211Val di SERCA nelle cellule HEK-293	18
3.2 Analisi di immunofluorescenza dei livelli di espressione delle proteine SERCA1 wild-type e mutanti nelle cellule HEK-293	19
4. DISCUSSIONE	21
BIBLIOGRAFIA	25

ABSTRACT

La miopatia di Brody è una rara malattia ereditaria, autosomica recessiva, caratterizzata da rigidità muscolare, in particolare da una compromissione del rilassamento muscolare durante l'esercizio fisico. Si verifica principalmente a livello degli arti e spesso delle palpebre. È causata dalla mutazione del gene ATP2A1, che determina una minor espressione della proteina codificata, ossia SERCA1. Si tratta di una pompa intracellulare situata nel reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari che catalizza l'idrolisi di ATP unita alla traslocazione del Ca^{2+} dal citosol al lumen del reticolo sarcoplasmatico stesso. Recentemente è stato descritto in due razze bovine, Chianina e Romagnola, un disturbo chiamato "pseudomioponia congenita", caratterizzato da sintomi molto simili alla miopatia di Brody. Si tratta di una compromissione del rilassamento muscolare che impedisce agli animali di eseguire movimenti rapidi. In entrambi i casi, grazie all'utilizzo di tecniche di elettroforesi, western blotting e immunofluorescenza, è stata osservata una ridotta espressione della proteina SERCA1, causata da mutazioni missenso del gene codificante ATP2A1. Sembra che la mutazione porti alla formazione di SERCA1 mal ripiegata la quale viene eliminata dal sistema ubiquitina-proteasoma. Ecco, dunque, che queste analisi forniscono un modello animale adatto per lo studio del meccanismo molecolare alla base della miopatia di Brody umana.

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Anatomia del muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è formato da fasci regolari costituiti da migliaia di fibre muscolari disposte in parallelo tra loro, che costituiscono l'unità muscolare. Tagliando trasversalmente si può osservare che ciascuna fibra muscolare è formata, in tutta la sua lunghezza, da migliaia di miofibrille a struttura cilindrica che a loro volta sono costituite da numerosi miofilamenti di actina e miosina. Si tratta di un elemento sinciziale, ossia di un insieme di cellule, dette fibrocellule muscolari, unite tra di loro in un'unica struttura, allungate e multinucleate, date dalla fusione dei mioblasti embrionali. All'interno delle fibre muscolari i nuclei sono disposti in periferia, sotto la membrana plasmatica chiamata sarcolemma, mentre il centro è occupato quasi prevalentemente dalle miofibrille. Queste ultime sono responsabili della colorazione striata del muscolo, data dalla posizione dei filamenti spessi di miosina e sottili di actina, a generare il sarcomero, ossia l'unità contrattile del muscolo striato. I filamenti di actina sono costituiti da monomeri di G-actina che si uniscono a formare un filamento a doppia elica, detto F-actina, a sua volta circondato da altre due proteine, la troponina e la tropomiosina. Ogni filamento di miosina è composto da molte molecole di quest'ultima, costituite da una coda allungata e da delle teste che sono in grado di legarsi all'actina e scorrere su di essa durante la contrazione. Ciascun sarcomero è delimitato da due linee Z o Z-disc, a cui sono ancorati i filamenti sottili di actina, e presenta nella parte centrale la linea M, a cui sono ancorate le porzioni centrali dei filamenti di miosina, le cui estremità sono sovrapposte ai filamenti di actina. All'interno del sarcomero si individua una banda A centrale più scura, dove c'è sovrapposizione tra filamenti di actina e miosina, e due bande I alle estremità più chiare, con solo filamenti di actina.

Il reticolo sarcoplasmatico (SR), che corrisponde al reticolo endoplasmatico liscio delle altre cellule, ha la funzione di accumulare, immagazzinare e all'occorrenza rilasciare ioni Ca^{2+} . È costituito da tubuli longitudinali paralleli tra loro che avvolgono i fasci di miofibrille e confluiscono, nella linea Z, in una cisterna terminale disposta trasversalmente rispetto alla miofibrilla stessa. Sui due lati di ciascuna linea Z ci sono, dunque, due cisterne terminali, fra le quali si interpone il tubulo T, ossia un'invaginazione del sarcolemma. Le cisterne fungono da serbatoio per gli ioni Ca^{2+} . La struttura formata dai tubuli T e dalle cisterne

terminali del reticolo costituisce la cosiddetta triade, la quale rende possibile una rapida diffusione del segnale nervoso all'interno della fibra.

1.2 Fisiologia del muscolo

La contrazione delle fibre muscolari scheletriche è provocata da impulsi nervosi che partono da fibre nervose motorie e giungono al muscolo. Un potenziale d'azione determina il rilascio di acetilcolina nella fessura sinaptica, che poi si lega ai rispettivi recettori del sarcolemma creando una depolarizzazione della membrana. Questa depolarizzazione si propaga lungo i tubuli T e a livello della triade il segnale viene trasferito fino alle cisterne terminali, dove determina l'apertura dei canali Ca^{2+} . Il calcio viene liberato nel sarcoplasma dando inizio alla contrazione. L'onda di depolarizzazione determina un cambiamento conformazionale dei recettori della diidropiridina (DHPR) a voltaggio dipendenti posti sulla membrana dei tubuli T, che a loro volta causano l'apertura dei recettori della rianodina (RyRs), situati sulle cisterne terminali del SR, con i quali sono accoppiati meccanicamente. Questo determina un aumento di Ca^{2+} nel sarcoplasma che permette alle teste di miosina di legarsi all'actina e scorrere su di essa generando un accorciamento dei sarcomeri e dunque la contrazione. Quando cessa la stimolazione i canali DHPR tornano alla conformazione di riposo e i RyRs si chiudono. Il Ca^{2+} citosolico viene riportato all'interno del SR contro gradiente attraverso l'azione della pompa SERCA (Ca^{2+} - ATPasi). Questo consente l'allungamento dei sarcomeri e dunque il rilassamento muscolare.

1.3 SERCA

È una proteina di membrana di 110 kDa che si trova nel SR e trasporta 2 ioni Ca^{2+} dal citoplasma al lume del reticolo sarcoplasmatico a spese dell'idrolisi di 1 molecola di ATP. Il suo funzionamento dipende dai due stati conformazionali E1 ed E2. La conformazione E1 è caratterizzata da un'elevata affinità per Ca^{2+} , quindi lega due ioni nel citosol e una molecola di ATP che viene idrolizzata ad ADP. A questo punto la proteina cambia la sua conformazione ad E2, che ha minore affinità per il calcio, dunque, rilascia i due ioni nel lume del SR e poi torna nella conformazione E1 per riiniziare il ciclo. La proteina è costituita da tre domini globulari citosolici, P, N ed A responsabili della trasmissione dei principali cambiamenti conformazionali, e un dominio M che include dieci eliche transmembrana (da M1 a M10) le quali formano il passaggio per il Ca^{2+} . Quella presente nel muscolo scheletrico è SERCA1, che a sua volta si può trovare in due

isoforme diverse, SERCA1a espresso nelle fibre muscolari a contrazione rapida e SERCA2b espressa nelle fibre lente. È una proteina estremamente conservata e questo permette di confrontare la sua attività in specie diverse.

1.4 Pseudomiopia congenita in bovini Chianina (PMT)

Nel 2008 è stato descritto un disturbo muscolare congenito nei bovini di razza Chianina, importanti in Italia per la qualità della carne. Clinicamente questo disturbo è caratterizzato da contrattura muscolare che si verifica solo nel momento in cui gli animali sono portati a muoversi velocemente, in seguito a stress da trasporto oppure dopo uno spavento. In questi casi si osserva nell'animale un'andatura rigida e scoordinata dovuta ad un irrigidimento e blocco temporaneo del muscolo, che termina nel momento in cui l'esercizio cessa. Se l'esercizio ad elevata intensità viene eseguito in maniera prolungata la contrazione causa la caduta dell'animale a terra, ma dopo pochi secondi di inattività le capacità motorie vengono riacquisite. Sono colpiti soprattutto gli arti, e in particolare quelli pelvici. Questo fenomeno non si verifica invece nel momento in cui l'animale svolge attività a bassa intensità, anche se per un tempo prolungato. Sulla base dei sintomi, si è supposto che questo ritardo del rilassamento muscolare potesse essere dovuto ad un prolungamento eccessivo del tempo di permanenza di Ca^{2+} libero all'interno del citoplasma delle cellule dei muscoli scheletrici a contrazione rapida, a causa di un difetto genetico della pompa SERCA1. Quest'ipotesi è stata confermata dal sequenziamento del DNA di vitelli affetti, che ha mostrato la presenza di una mutazione missenso nell'esone 6 del gene ATP2A1, che codifica appunto per SERCA1. La mutazione porta alla sostituzione di una sola coppia di basi (G>A in posizione 491) che determina la sostituzione dell'amminoacido arginina con l'istidina in posizione 164, una regione conservata della proteina. Tutta la popolazione di animali affetti presa in esame è risultata omozigote per la mutazione. Questo porta ad un deficit dell'espressione di SERCA1 nelle membrane del reticolo sarcoplasmatico e gli ioni Ca^{2+} rimangono liberi nel citoplasma più a lungo, il che comporta un legame actina-miosina prolungato che impedisce il rilassamento muscolare. L'analisi del pedigree degli animali affetti riscontrati fino ad ora ha permesso di affermare che si tratta di una malattia ereditaria autosomica recessiva.

1.5 Pseudomiopia congenita in bovini Romagnola

Recentemente gli stessi sintomi di pseudomiopia congenita che colpiscono i bovini Chianina sono stati osservati in un'altra razza italiana a pelo bianco famosa per la carne, ossia i bovini di razza Romagnola. Test funzionali hanno mostrato un'attività ridotta dei muscoli scheletrici a contrazione rapida del 4 – 14% nei bovini affetti. Anche in questo caso è stato ipotizzato che la patologia fosse dovuta ad un difetto genetico della pompa SERCA1. Il sequenziamento del DNA di questa razza bovina ha dimostrato che 3 casi esaminati su 4 portavano la stessa mutazione dei bovini Chianina nell'esone 6 del gene ATP2A1, con conseguentemente la stessa sostituzione amminoacidica. In aggiunta sono state osservate altre due mutazioni missenso nell'esone 8, specifiche della razza Romagnola, che hanno portato alla sostituzione dell'amminoacido glicina in valina in due siti diversi, ossia in posizione 211 e 286 della sequenza proteica SERCA1. Queste due mutazioni possono essere presenti sia in una situazione di eterozigosi, insieme alla mutazione dell'esone 6, sia in una situazione di omozigosi. La mutazione Gly211Val è situata nel dominio A di SERCA1 e sembra essere quella più grave, per questo motivo è la mutazione che viene presa in esame in questo studio.

1.6 Miopia di Brody

Sulla base dei sintomi clinici la pseudomiopia congenita sia di bovini Chianina che Romagnola è molto simile alla miopia di Brody umana, descritta per la prima volta nel 1969 come una "compromissione del rilassamento muscolare". Si manifesta con modalità autosomica recessiva e finora è stato identificato un unico gene coinvolto, ossia il gene ATP2A1, la cui mutazione comporta una diminuzione dell'attività Ca^{2+} -ATPasica. Nelle famiglie dei membri affetti da miopia di Brody sono state riportate mutazioni nel gene ATP2A1 che determinano mutazioni missenso o la formazione di codoni di stop prematuri. Non tutti i pazienti, però, hanno mostrato mutazioni in ATP2A1, suggerendo che sono probabilmente coinvolti altri geni ancora sconosciuti, e che si tratta di una malattia eterogenea. In questi casi la malattia è stata chiamata "sindrome di Brody". Una ridotta attività SR Ca^{2+} -ATPasica è stata riportata in tutti i casi descritti, indipendentemente dall'associazione con mutazioni di ATP2A1. La miopia di Brody si manifesta in genere durante l'infanzia, con un ritardo dello sviluppo motorio e la difficoltà a svolgere attività di tipo fisico a causa della rigidità muscolare che è più pronunciata nei muscoli degli arti, del viso e delle mascelle.

2. METODI

2.1 Amplificazione di plasmidi che contengono il cDNA che esprime la proteina, sia di coniglio che di bovino.

Lo studio è stato condotto a partire dai cDNA full-length che esprimono le proteine SERCA1 wild-type sia di coniglio che di bovino, che erano stati clonati nei pcDNA3. Le forme mutanti di SERCA1 contenenti la mutazione 766 introdotta nella sequenza di coniglio e la mutazione 211 introdotta nel cDNA di bovino, erano state ottenute mediante la tecnica di site directed mutagenesis, seguendo le indicazioni del QuikChange II site directed mutagenesis kit (Agilent Technology). Sono state utilizzate cellule batteriche per determinare l'amplificazione dei costrutti in modo tale da ottenerne una quantità sufficiente per gli esperimenti da eseguire. I batteri utilizzati sono un ceppo di *E. coli* (XL1 blue super competent cells, Stratagene). Questi vengono inizialmente trattati con il metodo calcio cloruro per essere resi competenti e successivamente sottoposti a shock termico. Si preparano inizialmente le soluzioni con i plasmidi. I plasmidi contenenti il cDNA di coniglio e di bovino, sia wild-type che mutato, vengono diluiti ad una concentrazione 1mg/mL con acqua. Dopo aver eseguito queste diluizioni si prendono altre quattro eppendorf più grandi e si inseriscono, in ciascuna, 100 μ L di cellule batteriche e 2 μ L di una delle soluzioni plasmidiche preparate precedentemente. A questo punto vengono mescolate al vortex e successivamente incubate in ghiaccio per 20 minuti e poi in un bagno ad acqua calda per 60 secondi a 42°C. Le cellule batteriche devono essere nella fase di crescita media-esponenziale per resistere allo shock termico. Questo genera dei piccoli pori sulla parete cellulare delle cellule batteriche che permette loro di inglobare i plasmidi contenenti i cDNA di nostro interesse. In ciascuna eppendorf vengono aggiunti 200 μ L di terreno liquido privo di antibiotico (SOC) e vengono mantenute in agitazione per 1 ora alla temperatura di 37°C, ottimale per la riproduzione delle cellule batteriche. Prima di aggiungere il terreno liquido, nel caso questo fosse già stato aperto, bisogna controllare che sia limpido e non torbido. Quest'ultimo caso, infatti, sarebbe indice di crescita di batteri indesiderati nel terreno. Con l'utilizzo di un'ansa precedentemente sterilizzata al bunsen si preleva un piccolo inoculo dalla provetta con terreno liquido e si piastrano i batteri su piastre Petri in un terreno Agar solido contenente kanamicina, l'antibiotico a cui il plasmide conferisce resistenza. Questo serve per selezionare solo le cellule batteriche che hanno inglobato il plasmide, perché solo queste saranno in

grado di crescere sul terreno. Con il materiale contenuto in ciascuna eppendorf vengono piastrate 3 piastre Petri utilizzando 3 diverse concentrazioni della soluzione batterica, una viene piastrata con 50 μ L di soluzione, una con 75 μ L e l'ultima con 150 μ L. Si mettono in incubazione le piastre Petri overnight a 37°C. Il giorno successivo si osservano le colonie batteriche cresciute e si preleva con dei puntali una piccola aliquota dalle colonie ben definite ed isolate dalle altre, evitando di prelevare materiale dalle patine batteriche che si creano. I quattro puntali utilizzati per prelevare colonie batteriche con i 4 plasmidi diversi vengono immersi in tubi Falcon contenenti ciascuno 25 mL di terreno liquido con kanamicina. Vengono tenute in agitazione per una notte a 37°C e con il tappo leggermente aperto, in modo da permettere l'entrata di ossigeno e la crescita delle cellule. Si raccolgono i batteri applicando una centrifugazione a 6000 g per 15 minuti a 4°C. Si utilizza il kit QIAGEN per lisare le cellule batteriche e purificare il plasmide, effettuando una serie di passaggi di seguito elencati. Il pellet batterico ottenuto mediante centrifugazione viene risospeso in 4 mL di buffer P1. Vengono successivamente aggiunti 4 mL di buffer P2 e la soluzione viene mescolata e incubata a 15-25°C per 5 minuti. Vengono aggiunti 4 mL di buffer P3, la soluzione viene mescolata e incubata in ghiaccio per 15 minuti. Si centrifuga a 20,000 g per 30 minuti a 4°C per ottenere un supernatante limpido, se così non fosse si ripete la centrifuga. Nel frattempo, viene equilibrata una colonna QIAGEN inserendo 4 mL di buffer QBT e lasciando che si svuoti per gravità. Quando la colonna è pronta vi si inserisce il surnatante ottenuto con l'ultima centrifugazione e lo si lascia scorrere al suo interno in modo che possa percolare attraverso la resina impaccata all'interno della colonna stessa. Si lava la colonna per 2 volte con 10 mL di buffer QC. A questo punto si eluisce il DNA plasmidico utilizzando 5 mL di buffer QF e si raccoglie in un contenitore da 15 mL. All'interno di questo contenitore vengono aggiunti 3,5 mL di isopropanolo a temperatura ambiente per permettere la precipitazione del DNA plasmidico, ed infine si centrifuga a 15,000 g per 30 minuti a 4°C. Si preleva il supernatante con una pipetta e si getta, facendo attenzione a non toccare il pellet con la punta. Quest'ultimo viene lavato con 2 mL di etanolo al 70% e centrifugato a 15,000 g per 10 minuti, in modo da concentrare ulteriormente il DNA, il supernatante viene nuovamente estratto. Si lascia asciugare il pellet per circa 5 - 10 minuti e si risospende alla concentrazione desiderata con buffer TE. In questo modo vengono

isolati i plasmidi contenenti i quattro diversi cDNA esprimenti le proteine di nostro interesse, che sono pronti per essere trasfettati nelle cellule.

2.2 Colture cellulari utilizzate

Sono state utilizzate cellule HEK-293, che appartengono ad una linea cellulare derivata da rene embrionale umano. Dopo essere state isolate negli anni '70, sono state trasformate mediante un adenovirus e questo le ha rese cellule facili da coltivare e trasfettare. HEK- 293 sono coltivate in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), integrato con siero fetale di bovino inattivato al calore e mantenute in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂, a 37°C. Le cellule vengono raccolte e seminate in piastra circa ogni due giorni, quando la confluenza raggiunge l'80%, in quanto una densità maggiore potrebbe limitare la crescita cellulare. Per fare questo viene aspirato il terreno di coltura e viene aggiunto PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) senza ioni bivalenti, viene incubato per 5-10 minuti a 37°C e successivamente aspirato il PBS e aggiunta tripsina, la quale serve per permettere il distacco delle cellule. Il materiale viene nuovamente incubato a 37°C per 5- 10 minuti. A questo punto le cellule vengono raccolte in 10 mL di PBS e 5 mL di terreno DMEM integrato con siero al 10% e vengono risospese. Dopo una crescita adeguata le cellule vengono centrifugate a 800 g per 5 minuti, il pellet cellulare così ottenuto è risospeso in un mezzo di volume appropriato e poi seminato alla diluizione richiesta. Per determinare la concentrazione cellulare è stata utilizzata la camera di conteggio Burker. Le cellule così ottenute sono state poste in fiale di congelamento e conservate a – 80°C in azoto liquido.

2.3 Trasfezione

Le cellule vengono trasfettate utilizzando il protocollo TransIT-293 di Mirus Bio, i cui passaggi sono elencati di seguito. Si scalda il reagente TranIT-293 a temperatura ambiente e si agita su vortex. Vengono aggiunti 4 µL di TransIT-293 a 200 µL di DMEM, miscelati ed incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente vengono aggiunti 2 µg di DNA plasmidico, agitati in vortex e incubati per 30 minuti. Le cellule precedentemente coltivate vengono distribuite in una piastra da 6 pozzetti, in cui viene aggiunto, goccia a goccia, il reagente TransIT-293 preparato come appena descritto. Il recipiente di coltura viene agitato delicatamente per distribuire uniformemente il reagente TransIT-293. Infine, viene incubato per 24 - 72 ore.

2.4 Estrazione e quantificazione di proteine

Dopo almeno 24 o 48 ore dalla trasfezione le cellule vengono lavate due volte con PBS e raschiate in modo tale da rilasciare il lisato che viene recuperato in una provetta. Le cellule sono state lisate con acido desossicolico al 5%, ossia un detergente forte in grado di distruggere tutte le membrane cellulari, comprese quelle nucleari. Per quantificare le proteine contenute nel lisato cellulare viene utilizzato il kit di analisi BCA di Thermo Scientific, che combina la riduzione di Cu^{2+} a Cu^+ da parte delle proteine in un mezzo alcalino con la rilevazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione rameoso (Cu^+) da parte dell'acido bicinconico (BCA). Questo kit prevede l'utilizzo di due componenti, un tampone carbonato contenente il reagente BCA e una soluzione di solfato rameico, che vengono combinato a formare una soluzione di colore verde. Questa soluzione vira al porpora dopo essere stata incubata per 30 minuti a 37°C . Il colore viola può essere misurato a qualsiasi lunghezza d'onda tra 550 e 570 nm, e l'intensità del colore è direttamente proporzionale al numero di legami peptidici che partecipano alla reazione. Permette di confrontare la concentrazione del campione d'interesse con una quantità crescente di albumina di siero bovino in una curva standard.

Successivamente viene aggiunto TCA, acido tricloroacetico, al 100% in rapporto 1:10 v/v per determinare la precipitazione delle proteine, condotta a -20°C . Dopo l'incubazione il campione viene centrifugato a 14,000 g per 15 min a 4°C e il surnatante rimosso. Il pellet viene risospeso in 10 mL di acetone freddo e posto a -20°C per 1 h. Dopo un'ulteriore centrifuga nelle medesime condizioni della precedente si effettua un ulteriore lavaggio in 1 mL di acetone freddo. Il campione viene trasferito in eppendorf, centrifugato a 14,000 g per 15 min a 4°C ed infine il pellet viene risospeso in 30 μL di sample buffer per SDS-PAGE.

2.5 Gel elettroforesi e western blot

Viene eseguita un' SDS-PAGE per separare le proteine in base al loro peso molecolare. Per eseguire l' SDS-PAGE si utilizza una cella elettroforetica posizionata in verticale. Per la costruzione fisica della cella elettroforetica si prendono due appositi vetrini che vengono lavati adeguatamente, fissati insieme con del silicone e posizionati in un supporto di plastica per la colata de gel. Si esegue una prima prova versando dell'acqua all'interno della cella elettroforetica costruita per controllare che non ci siano perdite. A questo punto si prepara il gel di poliaccrilamide 10% utilizzando 4 mL di acrilamide / bisacrilamide al 30%,

3,4 mL di acqua distillata, 2,5 mL di Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8, 0,1 mL di SDS al 10%, 50 μ L di APS al 10% e 5 μ L di TEMED (tetrametiletilendiammina). Si versa il gel all'interno della cella elettroforetica e alla fine si aggiunge un po' d'acqua sulla parte superiore, necessaria per bloccare l'ossigeno e per permettere la polimerizzazione del gel. Si aspetta circa 40 minuti / 1 ora, tempo necessario perché il gel di poliacrilamide polimerizzi e si getta l'acqua versata sopra. A questo punto si prepara il gel di impilamento, o stacking gel, utilizzando 1,3 mL di acrilamide / bisacrilamide al 30%, 6,1 mL di acqua distillata, 2,5 mL di Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, 0,1 mL di SDS al 10%, 50 μ L di APS (persolfato di ammonio) al 10% e 10 μ L di TEMED. Si versa anche questo gel all'interno della cella elettroforetica cercando di non creare bolle e si inserisce il pettine che serve per creare i pozzetti di caricamento delle proteine. Si aspettano altri 40 minuti / 1 ore che il gel polimerizzi. I vetrini così ottenuti vengono inseriti in un apposito contenitore in cui viene versato il buffer di corsa costituito da 3,02 g/L di TRIS, 14,42 g/L di glicina e 1,0 g/L di SDS. Si toglie il pettine dal gel di impilamento e si puliscono i pozzetti togliendo il buffer di corsa con una micropipetta. I campioni proteici sono integrati con la soluzione di caricamento costituita da TRIS 0,3 M a pH 6,8, β -mercaptoetanololo, SDS, glicerolo e il colorante blu di bromofenolo che serve per individuare le proteine all'interno del gel, e caricati all'interno dei pozzetti. L'SDS (sodio-dodecil-solfato) serve per denaturare le proteine e per caricarle negativamente, in modo che possano essere separate in maniera uniforme solamente in base al loro peso molecolare e non in base alla carica. Viene caricato in un pozzetto anche un marcatore proteico pre-colorato, la cella elettroforetica viene collegata agli elettrodi e si esegue l'elettroforesi. Quando i campioni si trovano all'interno del gel di impilamento si applicano 130 V, mentre quando passano all'interno del gel al 10% si passa a 200 V.

Il western blot serve per individuare in maniera specifica le proteine di nostro interesse, ossia SERCA1 wild-type di coniglio, SERCA1 wild-type di bovino, SERCA1 mutante 766 di coniglio e SERCA1 mutante 211 di bovino. Si prepara la griglia per il western blot posizionando in successione una spugnetta imbevuta nel tampone di trasferimento, un foglio di carta da filtro anch'esso imbevuto nel tampone, il gel di poliacrilamide, la membrana di nitrocellulosa precedentemente tagliata delle giuste dimensioni, un altro foglio di carta da filtro ed infine una spugnetta, entrambi imbevuti nel tampone. Fare molta attenzione a non creare bolle tra la membrana di nitrocellulosa ed il gel di poliacrilamide. Si

inserisce il cosiddetto “sandwich” così formato all’interno della camera di un apposito apparato di western blot che viene riempita con il tampone di trasferimento, in questo caso abbiamo utilizzato il tampone TBS 50 mM TRIS, 150 mM NaCl. La camera di western blot applica un campo elettrico perpendicolare al sandwich, e il trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa si ottiene applicando una corrente di 350 mA per circa 1 ora. È importante rivolgere sempre la membrana di nitrocellulosa verso il polo positivo. Terminato il trasferimento la membrana viene inserita in etanolo assoluto, necessario per fissare le proteine, e successivamente lasciata asciugare su di una carta da filtro. La membrana di nitrocellulosa viene colorata con una soluzione di Ponceau Red che permette di verificare se il trasferimento delle proteine è avvenuto con successo in quanto permette di visualizzare la presenza delle proteine attraverso una colorazione rossa. A questo punto si esegue un lavaggio con acqua distillata e si procede con il rilevamento della proteina d’interesse mediante anticorpi specifici.

2.6 Western blotting

Questa tecnica prevede l'utilizzo di anticorpi primari specifici che vanno a riconoscere solo le proteine che stiamo studiando e di anticorpi secondari legati a un enzima che catalizza una reazione cromogena quando la membrana viene incubata con lo specifico substrato. La membrana viene messa a contatto con la soluzione di incubazione che contiene un tampone e anticorpi primari specifici, e viene lasciata immersa nella soluzione per circa 1 ora in agitazione. Il tampone utilizzato è sempre TBS che viene però integrato con albumina di siero bovino al 3%, necessaria per prevenire il legame non specifico dell’anticorpo. A questo punto la membrana viene lavata rimuovendo la soluzione di incubazione e immersa per altri 5 minuti con TBS nuovo. Questa procedura viene ripetuta per 3 volte in modo da eliminare tutto l’anticorpo primario in eccesso. Poi la membrana viene incubata in agitazione per 45 minuti in una soluzione contenente tampone e anticorpi secondari e successivamente si ripetono i 3 lavaggi come in precedenza. L’enzima legato all’anticorpo secondario utilizzato in questo caso è la fosfatasi alcalina. Per visualizzare la reazione è stata utilizzata la soluzione premiscelata BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

2.7 Immunofluorescenza

Per effettuare l'immunofluorescenza le cellule HEK-293 vengono fissate su vetrini circolari precedentemente trattati per 30 minuti con poli-L-lisina, molecola sintetica che permette di migliorare l'adesione cellulare alle superfici di vetro e plastica. Si prepara una camera umida formata da una scatola con carta assorbente che viene umidificata con acqua, si posizionano i vetrini con le cellule all'interno e si effettuano 2 lavaggi di circa 5 minuti a temperatura ambiente con una soluzione contenente PBS 1X. Si asciugano i vetrini e si procede con l'incubazione con una "soluzione di blocco" contenente PBS 1X, TRITON 0,1% e BSA (albumina siero bovina) 2% per 30 minuti a temperatura ambiente. Questo serve per rendere permeabili le membrane cellulari e impedire legami aspecifici con l'anticorpo primario. A questo punto vengono incubati nella camera umida con la soluzione contenente gli anticorpi primari (anticorpo monoclonale di topo per il riconoscimento di SERCA1) a temperatura ambiente overnight. Il giorno seguente si eseguono due lavaggi dei vetrini con una soluzione di PBS 1X e si procede all'incubazione con la soluzione di anticorpi secondari anti-topo, per 1 ora, in camera umida a temperatura ambiente e al buio (la camera viene coperta con alluminio). A questo punto i vetrini circolari vengono a loro volta fissati su di un vetrino da microscopio, precedentemente lavato con etanolo al 100%, grazie all'utilizzo di moviol. Si tratta di una miscela di 2 polveri che viene utilizzata sottoforma di soluzione per posizionare i vetrini circolari con le cellule sul vetrino rettangolare da microscopio e poi viene lasciato in frigo overnight per solidificare e permettere il fissaggio. A questo punto le cellule sono pronte per essere analizzate al microscopio confocale.

3. RISULTATI

SERCA1 di coniglio è già stata ampiamente studiata. La maggior parte dei dati riportati in letteratura, risalenti agli anni '80 e '90, sono stati ottenuti a partire dalla SERCA1 isolata dal muscolo di coniglio, in quanto è sufficiente il sacrificio di un unico esemplare per ottenere grandi quantità di proteina purificata. Nel coniglio, inoltre, c'è una netta distinzione tra la muscolatura rapida (più chiara) e quella lenta (più scura), visibile anche ad occhio nudo. Questo permette di isolare la proteina esclusivamente dai muscoli rapidi, che sono quelli di nostro interesse, prelevati dalle zampe dell'animale, dove rappresentano l'85 – 90% della muscolatura totale. SERCA1 bovina è una proteina di 993 aminoacidi e condivide il 98% dell'identità di sequenza con l'enzima di coniglio. Nonostante questo, ha un'attività catalitica leggermente inferiore rispetto a SERCA1 di coniglio. Finora, tutte le proprietà biochimiche della pompa SERCA1 in linee cellulari trasfettate sono state ottenute utilizzando il clone di cDNA di coniglio. Grazie agli studi effettuati sulla PMT di bovini Chianina anche SERCA1 di questa razza è stata abbastanza caratterizzata. Nello studio in questione si vuole invece concentrare l'attenzione su due mutazioni: una descritta in mutanti naturali di Zebrafish e una in bovini di razza Romagnola. La prima è stata generata nel cDNA che codifica per la SERCA1 di coniglio (non essendo a disposizione in laboratorio quello di Zebrafish), mentre la seconda in quello bovino. Come prima cosa si è andati a verificare che la proteina SERCA1 wild-type di bovino Romagnola venisse correttamente espressa all'interno delle cellule HEK-293 utilizzate, come avviene per SERCA1 di coniglio, in modo da poter avere la certezza di ottenere dati accettabili e confrontabili. Sono state dunque prelevate le proteine wild-type di coniglio e bovino e sottoposte prima a SDS-PAGE e successivamente a western blot. Dai risultati ottenuti (FIGURA 1) si può vedere che le due proteine hanno lo stesso peso molecolare e vengono espresse nelle cellule HEK-293 in quantità uguali e confrontabili. La β -actina, una proteina del citoscheletro, viene utilizzata come elemento di controllo del carico.

In questo modo è stato dimostrato che anche la proteina SERCA1 di bovino Romagnola può essere utilizzata su questa linea cellulare.

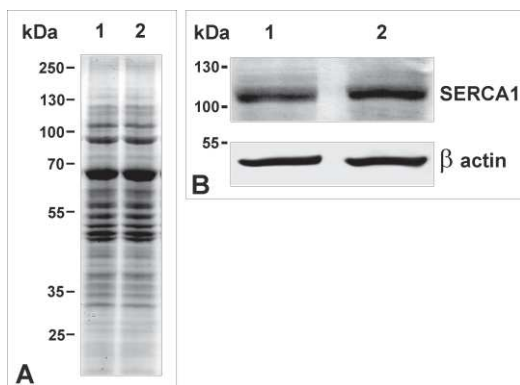


FIGURA 1: SDS-PAGE e western blot di SERCA1 wild-type di coniglio (1) e bovino (2). In figura A è rappresentato il risultato dell' SDS-PAGE, dove si vede che la banda relativa a SERCA1 WT di bovino Romagnola (2) si trova alla stessa altezza di SERCA1 WT di coniglio (1). La scala numerica a sinistra indica il peso molecolare. In figura B è rappresentato il risultato del western blot, anche in questo caso la banda relativa a SERCA1 WT di bovino (2) è molto simile a quella relativa a SERCA1 WT di coniglio (1), indice che sono ugualmente espresse dalle cellule HEK-293.

3.1 Espressione delle varianti Ser766Phe e Gly211Val di SERCA nelle cellule HEK-293

In seguito alla conferma ottenuta sulla forma wild-type si passa a studiare l'effetto della mutazione sulla proteina. Per fare questo si esegue un SDS-PAGE, seguita da un western blot, delle proteine che vengono espresse nelle cellule HEK-293 in seguito alla loro trasfezione con cDNA mutante Ser766Phe di coniglio e Gly211Val di bovino Romagnola. I livelli di espressione delle proteine mutanti vengono confrontati con quelli delle proteine wild-type, sia nel coniglio (FIGURA 2) che nel bovino. Per quanto riguarda il bovino in questo studio è stata analizzata solamente la mutazione Gly211Val e non la Gly286Val, anche se nei casi osservati le due mutazioni insorgono sempre contemporaneamente. Questo perché sembra che Gly211Val svolga un ruolo più decisivo nella patologia, probabilmente perché si trova sul dominio A di SERCA1, molto importante vista la sua grande interazione con altre parti della proteina e i numerosi movimenti a cui è soggetto. Gly286Val, che si trova in una struttura a loop molto corta che unisce i due domini transmembrana M3 e M4 della proteina, è considerata meno nociva. Per quanto riguarda il coniglio, invece, la mutazione Ser766Phe si trova all'interno di un dominio transmembrana coinvolto della formazione del canale per il passaggio del Ca^{2+} . Questo ha portato a pensare che potesse avere un ruolo importante nella malattia. Dal risultato del western blot (FIGURA 2) si può osservare che la quantità di mutante SERCA1 Ser766Phe non differisce rispetto a

quella di SERCA1 wild-type di coniglio, al contrario è identica. Questo significa che la mutazione all'interno del dominio transmembrana non influisce sui livelli di espressione della proteina.

Risultati completamente diversi si ottengono con il western blot relativo al bovino in cui si può chiaramente osservare una riduzione dell'espressione della proteina SERCA1 Gly211Val rispetto alla forma wild-type, che implica una parziale perdita di funzione. Sulla membrana di nitrocellulosa in cui viene eseguito il western blot la banda relativa alla proteina mutante 211 è, infatti, molto più sottile rispetto a quella della forma wild-type. Tale mutazione porta alla produzione di una forma mal ripiegata di SERCA1, probabile causa della diminuzione della sua espressione.

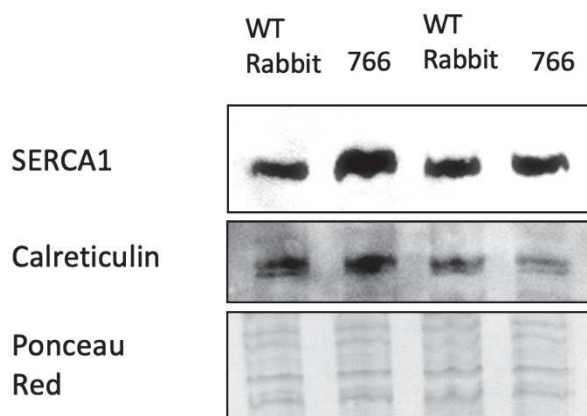


FIGURA 2: Western blot di SERCA1 wild-type e SERCA1 Ser766Phe di coniglio. Vengono confrontate quantità diverse di SERCA1 wild-type di coniglio con SERCA1 Ser766Phe, nelle prime due lanes quantità superiori di entrambe rispetto alle seconde due lanes. Il western blot viene eseguito utilizzando la colorazione rossa Ponceau Red su membrana di nitrocellulosa. Si può osservare che in entrambi i casi la concentrazione di SERCA1 Ser766Phe è uguale a quella di SERCA1 wild-type, indice che la mutazione a livello del dominio transmembrana non comporta una riduzione dell'espressione della proteina. La calreticulina è una proteina strutturale del reticolo sarcoplasmatico che viene utilizzata in questo esperimento come controllo del carico.

3.2 Analisi di immunofluorescenza dei livelli di espressione delle proteine SERCA1 wild-type e mutanti nelle cellule HEK-293

Dopo essere state appositamente incubate con gli anticorpi primari specifici per le proteine SERCA1 e gli anticorpi secondari legati ad un fluoroforo rosso le cellule HEK-293 vengono analizzate al microscopio confocale. I risultati che si ottengono sono paralleli a quelli ottenuti mediante western blot. Inizialmente viene fatto un confronto tra il livello di

espressione di SERCA1 wild-type e SERCA1 Ser766Phe di coniglio (FIGURA 3). Dall'immagine riportata si vede che l'intensità di fluorescenza non differisce molto tra la forma wild-type e quella mutante, analogamente a quanto visto mediante western blot. Nel confronto tra SERCA1 wild-type e SERCA1 Gly211Val di bovino si vede invece una netta differenza di colore. L'intensità di fluorescenza molto inferiore in SERCA1 Gly211Val mutante conferma il risultato già ottenuto con western blot.

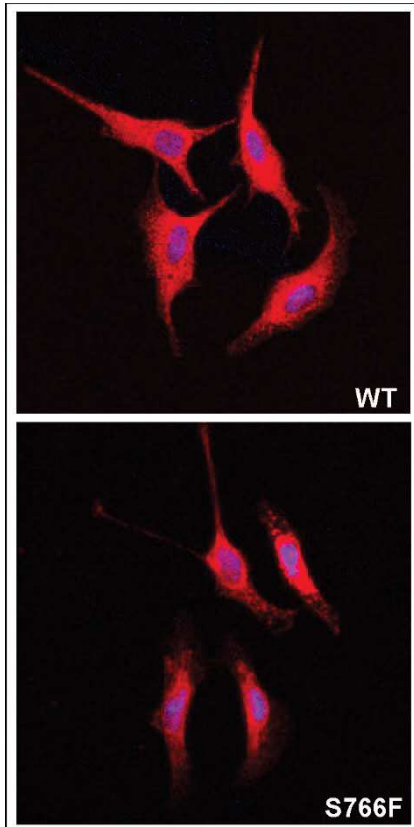


FIGURA 3: Analisi di immunofluorescenza dei livelli di espressione di SERCA1 wild-type e di SERCA1 Ser766Phe di coniglio. Visione al microscopio confocale delle cellule HEK-293 dopo incubazione con anticorpo primario specifico per SERCA1 e anticorpo secondario coniugato con TRITC. I livelli di fluorescenza della forma wild-type e della mutazione Ser766Phe sono molto simili.

4. DISCUSSIONE

In seguito alla descrizione di casi di bovini Chianina affetti da una patologia muscolare definita "Pseudomiopia congenita" e caratterizzata da irrigidimento muscolare, studi mirati hanno riportato la presenza di una mutazione missenso nell'esone 6 del gene ATP2A1. Questo gene codifica per la proteina SERCA1 che si trova nel reticolo sarcoplasmatico ed è essenziale nel momento del rilassamento muscolare, in quanto ha la funzione di pompare il Ca^{2+} dal citosol a lume del reticolo sarcoplasmatico stesso. La mutazione in questione determina la sostituzione dell'amminoacido arginina con istidina in posizione 164 (Arg164His), ossia all'interno del dominio A, estremamente conservato, della proteina. È stato appurato che tale mutazione non varia i livelli di mRNA rispetto ai campioni normali e nemmeno altera le proprietà intrinseche dell'attività Ca^{2+} -ATPasica della proteina. Negli animali affetti è stato riscontrato, però, un livello inferiore di proteina nella membrana sarcoplasmatica, responsabile dell'accumulo di Ca^{2+} citosolico che impedisce il rilassamento muscolare. Più recentemente sono stati riscontrati gli stessi sintomi dei bovini Chianina in alcuni bovini Romagnola, che oltre alla mutazione nell'esone 6, tipica dei Chianina, portano altre due mutazioni specifiche nell'esone 8 del gene ATP2A1. Le mutazioni comportano una sostituzione dell'amminoacido glicina in valina in due posizioni, 211 e 286 (Gly211Val e Gly286Val). La notevole somiglianza del fenotipo clinico tra le due razze bovine ha portato a pensare che la causa della patologia fosse la stessa, dunque, la diminuzione dei livelli di espressione della proteina SERCA1. La novità di questo studio consiste nell'utilizzare plasmidi contenenti cDNA di bovino Romagnola per trasfettare cellule HEK-293, in modo che possano esprimere la proteina SERCA1 specifica di questa razza. Gli studi precedenti, infatti, sono stati eseguiti esclusivamente con SERCA1 di razza Chianina. Questa esperienza in laboratorio è stata molto utile per approfondire tutte le metodiche sperimentali che vengono utilizzate per realizzare tali studi. Mi ha permesso di apprendere le procedure di microbiologia che permettono, utilizzando cellule batteriche, di amplificare un plasmide contenente un costrutto d'interesse. Come ottenere l'espressione proteica di tali costrutti all'interno di cellule adeguate attraverso la loro trasfezione. Ho potuto eseguire un' SDS-PAGE, dalla sua costruzione fisica, alla produzione della

soluzione proteica da caricare nei pozzetti, alla separazione delle singole proteine mediante l'applicazione di un adeguato campo elettrico. Questo mi ha permesso poi di trasferire le proteine separate in una membrana di nitrocellulosa in modo da poter eseguire un western blot ed individuare così quelle di nostro interesse, ossia le SERCA1 wild-type di coniglio e bovino e le mutanti 766 e 211, mediante l'utilizzo di anticorpi primari specifici e secondari. Con tale esperimento ho potuto capire come analizzare in maniera critica il risultato di un western blot. Così ho potuto verificare in prima persona che la mutazione Gly211Val di bovino determina una minore espressione di SERCA1 rispetto alla forma wild-type. Ho potuto poi ottenere conferma di ciò mediante la realizzazione di un esperimento di immunofluorescenza che mi ha permesso di visualizzare le proteine, marcate con fluoroforo rosso, mediante microscopio confocale, in modo da osservare anche la loro distribuzione all'interno della cellula. L'ipotesi di partenza che anche nei bovini di razza Romagnola la mutazione 211 determinasse una diminuzione del livello di espressione della proteina SERCA1 nel SR è stata in questo modo confermata.

Per quanto riguarda la mutazione Ser766Phe di coniglio i medesimi esperimenti mi hanno permesso di osservare che, in questo caso, non influisce sui livelli di espressione della proteina, la quale si trova in quantità molto simili rispetto alla forma wild-type.

Questa, a differenza di Gly211Val e Arg164His si trova in un dominio transmembrana di SERCA1. In particolare, consiste nella sostituzione dell'amminoacido serina in posizione 766 con fenilalanina. Il residuo di serina contribuisce a creare il rivestimento di un canale polare che determina il passaggio del Ca^{2+} attraverso la pompa. La fenilalanina che viene inserita al suo posto possiede un anello aromatico particolarmente ingombrante che va ad alterare la struttura di tale canale.

Si pensa che la mutazione possa contribuire alla patologia mediante un meccanismo molecolare diverso rispetto a quello delle mutazioni Arg164His e Gly211Val, non attraverso la diminuzione di espressione di SERCA1 ma, per esempio, alterando l'affinità della proteina per il Ca^{2+} , o la velocità del suo trasporto. Naturalmente si dovranno effettuare ulteriori studi per verificare tale ipotesi e capirne l'eventuale meccanismo molecolare.

Tornando alla mutazione di bovino, ulteriori studi hanno dimostrato che nel momento in cui si trova nel dominio conservato A determina un errore di

folding della proteina che porta alla produzione di SERCA1 mal ripiegata. È stata fornita la prova che il sistema ubiquitina-proteasoma è responsabile del livello inferiore di SERCA1 Arg164His nel SR. Altri recenti esperimenti sembrano dimostrare che il sistema ubiquitina-proteasoma è responsabile anche della minore quantità di SERCA1 Gly211Val nei bovini Romagnola. In seguito al trattamento delle cellule HEK-293 con l'inibitore MG132 del proteasoma sono stati infatti riscontrati livelli di proteina paragonabili a quelli di un animale sano. Sono necessari ulteriori esperimenti per fornire prove di quest'ultima affermazione, ma con i dati ad oggi disponibili sembra essere affermato il fatto che anche la mutazione Gly211Val generi una proteina mal ripiegata.

Questi modelli animali mostrano un fenotipo clinico molto simile alla patologia umana definita "Miopatia di Brody". Gli studi effettuati su bovini Chianina, insieme a questo effettuato sulla razza Romagnola, dimostrano dunque che tali animali rappresentano un modello molto utile, anche se non convenzionale, per lo studio della malattia di Brody umana e per lo sviluppo di approcci terapeutici innovativi e meno invasivi. In realtà a tale scopo si possono utilizzare più animali diversi, come in questo caso coniglio e Zebrafish, grazie al fatto che si tratta di una proteina estremamente conservata.

Ad oggi, infatti, questa malattia viene curata attraverso la somministrazione di farmaci miorilassanti, non utilizzabili, però, a lungo termine in quanto causano tossicità epatica. Lo sviluppo di farmaci o trattamenti terapeutici più adeguati è dunque fondamentale.

Oltre ad un contributo importantissimo nell'ambito medico questi studi possono determinare lo sviluppo di cure terapeutiche innovative per tale patologia anche in ambito veterinario, al fine di migliorare il benessere animale.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Bianchini et al. "Inhibition of Ubiquitin Proteasome System rescues the defective sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) protein causing Chianina cattle pseudomyotonia", in The Journal of Biological Chemistry (2014).
2. L. Murgiano et al. "Pseudomyotonia in Romagnola cattle caused by novel ATP2A1 mutations", in BMC veterinary research (2012).
3. R. Sacchetto et al. "A defective SERCA1 protein is responsible for congenital pseudomyotonia in Chianina cattle", in the American journal of pathology (2009).