

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

TESI DI DOTTORATO IN BIOCHIMICA XIX CICLO

**SVILUPPO DI UN SAGGIO CELLULARE PER LO STUDIO DEI
TRASPORTATORI TIROIDEI DELLO IODURO BASATO SULLA
PROTEINA FLUORESCENTE YFP**

Settore Scientifico Disciplinare di appartenenza: BIO/10

Candidato:

Dott. Stefano Cianchetta
Matr. 6285

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giorgio Lenaz

Correlatore:

Prof.ssa Kerry Jane Rhoden

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Romeo

INDICE

PREMESSA	5
CAPITOLO I. INTRODUZIONE	8
1.1. FUNZIONE E SINTESI DEGLI ORMONI TIROIDEI	9
1.2. IL SODIUM IODIDE SYMPORTER (NIS)	12
1.2.1. IL TRASPORTO DI IODURO ATTRAVERSO NIS	12
1.2.2. IL PERCLORATO ED ALTRI INIBITORI DEL NIS	14
1.2.3. GLICOSILAZIONE DEL NIS	16
1.2.4. REGOLAZIONE	17
1.2.5. ESPRESSIONE EXTRATIROIDEA DEL NIS	20
1.2.6. DIFETTI CONGENITI DEL TRASPORTO MEDIATO DAL NIS	22
1.3. LA PENDRINA	24
1.3.1. IL TRASPORTO DI IODURO ATTRAVERSO LA PENDRINA	24
1.3.2. REGOLAZIONE DELLA PENDRINA DA PARTE DELLA TIREOGLOBULINA E DEL TSH	26
1.3.3. ESPRESSIONE EXTRATIROIDEA DELLA PENDRINA	27
1.3.4. LA SINDROME DI PENDRED	28
1.4. IL CANCRO TIROIDEO	30
1.4.1. ESPRESSIONE DEL NIS NELLE LESIONI NEOPLASTICHE	31
1.4.2. ESPRESSIONE DELLA PENDRINA NELLE LESIONI NEOPLASTICHE DELLA TIROIDE	32
1.5. IL CANCRO MAMMARIO	33
1.6. PROTEINE FLUORESCENTI PER L'IMAGING IN VIVO	35
1.6.1. CARATTERISTICHE GENERALI	35
1.6.2. PROPRIETÀ E MODIFICAZIONI DELLA GFP DI <i>Aequorea victoria</i>	36
1.6.3. APPLICAZIONI PASSIVE DELLE PROTEINE FLUORESCENTI	39
1.6.4. APPLICAZIONI ATTIVE DELLE PROTEINE FLUORESCENTI: SENSORI BIOCHIMICI	42
1.6.5. LA YFP COME SENSORE DI ANIONI	48
CAPITOLO II. PERCORSO SPERIMENTALE	60

CAPITOLO III. MATERIALI E METODI 64

3.1. COLTURE CELLULARI	65
3.2. TRASFEZIONE	65
3.3. MISURE DI FLUORESCENZA NELLE CELLULE CHE ESPRIMONO YFP-H148Q/I152L	66
3.4. ANALISI DELLA FLUORESCENZA CELLULARE	68
3.5. SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L IN SOLUZIONE ALLO Γ ED AL pH	70
3.6. MISURE DI pH_i CON BCECF: pH_i A RIPOSO, EFFETTO DEL <i>BUFFER</i> PRIVO DI Cl^- , EFFETTO DI Γ E ClO_4^- 1 mM SUL pH_i	71
3.7. CALIBRAZIONI INTRACELLULARI DELLA FLUORESCENZA DI YFP-H148Q/I152L	73

CAPITOLO IV. RISULTATI 76

4.1. SVILUPPO DEL SAGGIO A FLUORESCENZA: IDENTIFICAZIONE DEL TRASPORTO DI Γ

MEDIATO DAL NIS	77
4.1.1. EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A Γ SULLA FLUORESCENZA DELLE CELLULE FRTL-5	78
4.1.2. CRITERI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEL NIS IN CELLULE FRTL-5	82
4.1.3. EFFETTO DELLO Γ SULLA FLUORESCENZA DELLA YFP-H148Q/I152L IN CELLULE COS-7 CHE ESPRIMONO hNIS	88
4.1.4. EFFETTO DELLO I^- SUL pH INTRACELLULARE IN CELLULE FRTL-5	90

4.2. CURVE DI CALIBRAZIONE DELLA YFP-H148Q/I152L PER LA QUANTIFICAZIONE DELL'UPTAKE DI Γ

DELL'UPTAKE DI Γ	92
4.2.1. SENSIBILITÀ IN SOLUZIONE DELLA YFP-H148Q/I152L ESTRATTA DA TIREOCITI AL pH ED ALLO Γ	93
4.2.2. MISURE DELLA SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L AL pH, Cl^- , Γ : CURVE DI CALIBRAZIONE INTRACELLULARE IN TIREOCITI INTATTI	95
4.2.3. MISURE DEL pH INTRACELLULARE A RIPOSO IN CELLULE FRTL-5	100
4.2.4. STIMA DEL Cl^- INTRACELLULARE IN CELLULE FRTL-5	101
4.2.5. QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI Γ IN CELLULE FRTL-5	103

4.3. MISURA DEL TRASPORTO DI ClO_4^-	105
4.3.1. SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L AL ClO_4^- INTRACELLULARE: CURVA DI CALIBRAZIONE IN TIREOCITI INTEGRI PERMEABILIZZATI	106
4.3.2. EFFETTO DEL ClO_4^- SULLA FLUORESCENZA DI YFP-H148Q/I152L IN CELLULE FRTL-5	108
4.3.3. EFFETTO DEL ClO_4^- SUL pH_i E RUOLO DEL Cl^- NELLA RISPOSTA A ClO_4^- IN CELLULE FRTL-5	109
4.3.4. CRITERI PER L'IDENTIFICAZIONE DI UN TRASPORTO DI ClO_4^- MEDIATO DAL NIS	111
4.3.5. VELOCITÀ DI TRASPORTO DI I^- E ClO_4^- NELLE FRTL-5 ED IN CELLULE COS-7 CHE ESPRIMONO hNIS	116
4.4. BREVE SINTESI DEI RISULTATI SPERIMENTALI	118
CAPITOLO V. DISCUSSIONE	120
5.1. VALIDAZIONE DEL NUOVO METODO	122
5.2. DALLE VARIAZIONI DI FLUORESCENZA ALLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE	125
5.3. LA YFP-H148Q/I152L COME BIOSENSORE PER IL TRASPORTO DI PERCLORATO	131
5.4. VANTAGGI ED APPICAZIONI DEL NUOVO METODO	138
BIBLIOGRAFIA	144
GLOSSARIO	166

PREMESSA

Il trasporto di anioni inorganici e' di estrema importanza in vari processi fisiologici e patologici. In particolare, il trasporto dello ioduro da parte della tiroide è necessario per la sintesi degli ormoni tiroidei ed è perciò un processo critico nella regolazione del metabolismo cellulare. Sia i difetti genetici che determinano alterazioni nell'accumulo di ioduro che lo scarso assorbimento dello ioduro alimentare condizionano la crescita e lo sviluppo dell'organismo e, nei casi più gravi, causano cretinismo.

L'accumulo di ioduro radioattivo nella tiroide è alla base del trattamento dei tumori tiroidei con mezzi radioterapici, perciò in molti pazienti l'efficacia della radioterapia può essere diminuita dall'espressione difettiva delle proteine per il trasporto dello ioduro. Trattamenti farmacologici tesi ad aumentare l'attività o l'espressione dei trasportatori di membrana potrebbero di conseguenza essere estremamente utili nel trattamento dei tumori tiroidei e delle malattie genetiche della tiroide.

Trasportatori dello ioduro sono stati individuati anche nella ghiandola mammaria, aprendo una prospettiva per il trattamento radioterapico mediante ^{131}I del tumore al seno. Inoltre il trasferimento genico dei trasportatori di ioduro può rendere sensibili alla radioterapia anche altri tumori non tiroidei.

Scopo della presente ricerca è lo sviluppo di un nuovo saggio cellulare a fluorescenza che possa essere utilizzato nello studio dei trasportatori di ioduro in condizioni fisiologiche e nello studio dei meccanismi cellulari che determinano le anomalie funzionali di detti trasportatori alla base delle malattie genetiche e del cancro tiroideo.

Il saggio utilizza una proteina citoplasmatica ricombinante (YFP-H148Q/I152L) che, se complessata ad alogenuri, presenta un cambiamento nel proprio spettro di fluorescenza. L'uso di questa proteina ha dei vantaggi rispetto ad altri metodi di misurazione del trasporto di ioduro (quali la somministrazione alle cellule di ioduro radioattivo ed il *patch clamp*), data la potenziale

adattabilità del saggio alla sperimentazione dei farmaci su larga scala. La metodica consente inoltre di effettuare misure di trasporto in tempo reale anche su singole cellule.

L'utilità di questo tipo di sonde fluorescenti è stata recentemente dimostrata nello *screening* di una libreria di composti chimici che ha permesso di identificare nuovi potenziali farmaci capaci di attivare il CFTR mutante e *wild-type* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) per il trattamento della Fibrosi Cistica. In prospettiva con questo saggio di fluorescenza sarà dunque possibile identificare composti capaci di stimolare l'attività dei trasportatori tiroidei dello ioduro, quali il NIS (Na⁺/ I⁻ Symporter) o la pendrina. Mutazioni in queste due molecole sono responsabili delle disfunzioni tiroidee che si trovano rispettivamente associate al Difetto Congenito del Trasporto di ioduro ed alla Sindrome di Pendred.

L'identificazione di farmaci selettivi per le proteine di trasporto di ioduro già note o di nuovi trasportatori manipolabili farmacologicamente potrebbe quindi aumentare l'efficacia ed il campo di impiego della radioterapia con ¹³¹I.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1.1. FUNZIONE E SINTESI DEGLI ORMONI TIROIDEI

La ghiandola tiroidea è una struttura specializzata nella produzione, nell'immagazzinamento e nel rilascio degli ormoni tiroidei. L'unità funzionale della tiroide è il follicolo (50-500 µm di diametro). Ciascun follicolo è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali dette tireociti (o cellule follicolari), che delimitano una cavità centrale contenente una sostanza gelatinosa costituita essenzialmente da tireoglobulina (Tg).

I tireociti sintetizzano ormoni che hanno un vasto campo di azione ed interagiscono con quasi tutti i distretti dell'organismo: accrescono la velocità metabolica basale, aumentano il consumo di ossigeno e la produzione di calore, aumentano il metabolismo del colesterolo, stimolano il metabolismo dei carboidrati e dei lipidi e diminuiscono il glicogeno epatico. Sono implicati anche nella crescita e nello sviluppo, infatti stimolano la sintesi delle proteine, la proliferazione e il differenziamento cellulare. Sono inoltre coinvolti nello sviluppo del cervello a livello fetale e neonatale ed agiscono a livello cardiovascolare influenzando frequenza, gittata cardiaca, contrattilità miocardica e vasodilatazione.

Lo iodio rappresenta un elemento fondamentale per la buona funzionalità della ghiandola tiroidea e gli ormoni tiroidei sono le uniche molecole di origine endogena a contenere questo elemento. Lo iodio assunto con la dieta, assorbito e veicolato nella circolazione come ioduro, viene trasportato dal circolo ematico all'interno delle cellule follicolari della tiroide. Le proteine finora identificate responsabili del trasporto vettoriale dalla membrana basolaterale alla membrana apicale e quindi nel mezzo colloidale che riempie il follicolo sono il Sodium Iodide Symporter (NIS) (1) e la pendrina (2) (Figura I).

La proteina NIS è in grado di accumulare lo ioduro all'interno della cellula fino a concentrazioni mM a partire da concentrazioni plasmatiche dell'ordine del nM (3). Il trasporto contro gradiente dello ioduro sfrutta il gradiente elettrochimico favorevole del sodio, mantenuto con spesa di ATP dalla Na^+/K^+ ATPasi. Lo ioduro del citoplasma viene poi trasportato attraverso la membrana apicale delle cellule follicolari dalla pendrina, che nella tiroide trasporta Cl^- e I^- . Alcuni studi elettrofisiologici sono volti a chiarire se si tratti di uno scambiatore anionico o di un canale (4, 5). Lo ioduro trasportato nel comparto del follicolo subisce un processo di ossidazione ed organificazione con residui tirosinici per formare MIT (monoiodotirosina) e DIT (diiodotirosina). La tireoperossidasi (TPO), in presenza di H_2O_2 generata da una NADPH tireossidasi (ThOX), è responsabile dell'organificazione. Questo processo avviene all'interfaccia fra lo spazio colloidale e la membrana apicale dei tireociti in cui sono inseriti gli enzimi. I residui tirosinici che costituiscono gli ormoni tiroidei sono forniti dalla tireoglobulina, che è il maggior costituente del colloide. Oltre alla funzione di procurare il *backbone* proteico per la sintesi, la tireoglobulina provvede all'accumulo degli ormoni sintetizzati. La monoiodotirosina e la diiodotirosina sono poi legate con un ponte etereo per dare la triiodotirosina (T_3) e la tetraiodotirosina o tiroxina (T_4) (6, 7).

Quando arriva lo stimolo per il rilascio degli ormoni tiroidei, avviene un processo di endocitosi della tireoglobulina legata agli ormoni T_3 e T_4 . Attraverso l'idrolisi nei fagolisosomi, la tireoglobulina e gli ormoni vengono liberati: la prima viene avviata al riciclo e ritrasportata nel colloide o degradata, i secondi vengono secreti o metabolizzati dall'enzima microsomale iodotirosina dealogenasi per assicurare il massimo recupero dello iodio non secreto. Tutti questi processi sono attivati dal TSH (Thyroid-Stimulating Hormone).

L'organizzazione della tiroide in follicoli e la polarizzazione delle cellule follicolari sono requisiti essenziali per la produzione degli ormoni tiroidei; la polarizzazione è garantita dalla

segregazione di alcune proteine nella membrana basolaterale o apicale e anche dalla presenza di giunzioni strette fra le cellule che impediscono i movimenti laterali dei costituenti della membrana. La funzione delle giunzioni strette è altresì importante per mantenere l'elevato gradiente di concentrazione di ioduro presente fra l'interno e l'esterno del follicolo e per prevenire la diffusione del contenuto luminale.

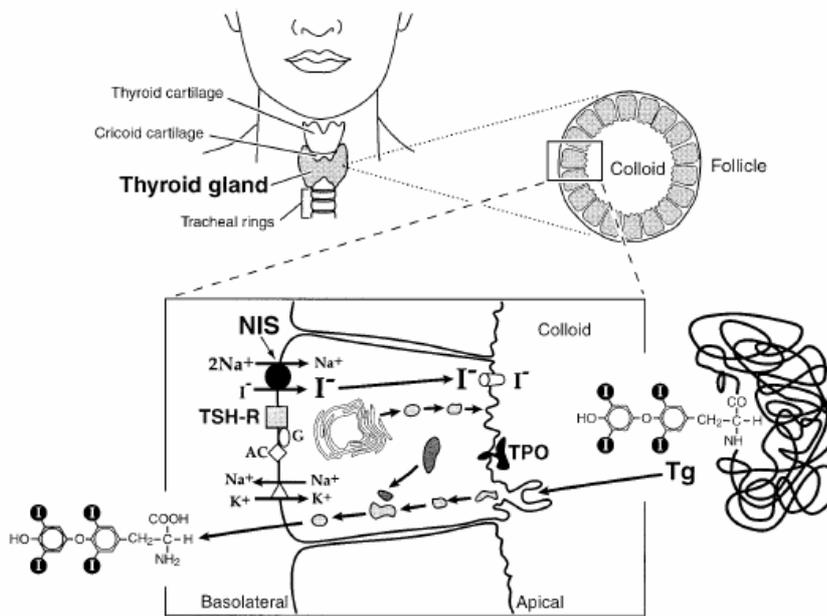


Figura I: Rappresentazione schematica del percorso biosintetico degli ormoni tiroidei triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) nella cellula follicolare tiroidea (8). I follicoli tiroidei sono composti da uno strato di cellule epiteliali che circondano il colloide. La superficie basolaterale delle cellule è mostrata sulla sinistra e quella apicale sulla destra. I simboli geometrici rappresentano proteine e processi rilevanti. Il cerchio rappresenta l'accumulo attivo di I⁻ attraverso il Na⁺/I⁻ symporter (NIS), reso possibile dal gradiente di Na⁺ generato dalla Na⁺/K⁺-ATPasi, rappresentata con un triangolo; il quadrato rappresenta il recettore della tireotropina (TSHR); il rombo l'adenilato ciclasi; l'ellisse la proteina G; il cilindro l'efflusso di I⁻ attraverso il colloide. La TPO (tireoperossidasi) catalizza l'organificazione dello I⁻; le frecce indicano l'endocitosi della tireoglobulina (Tg) iodinata, seguita da idrolisi fagolisosomale della Tg iodinata e secrezione degli ormoni tiroidei.

1.2. IL SODIUM IODIDE SYMPORTER (NIS)

La caratterizzazione di NIS è iniziata nel 1996 quando è stato isolato il cDNA della proteina di ratto da un sistema di espressione in oociti di *Xenopus laevis*, utilizzando librerie di cDNA derivate da cellule FRTL-5 (Fischer Rat Thyroid cells, una linea cellulare tiroidea di ratto altamente differenziata) (9).

NIS è una proteina di 643 aminoacidi ed ha un peso di 70-90 kDa a seconda del grado di glicosilazione (10). Il modello strutturale attualmente accettato prevede una proteina con 13 domini transmembrana, l'aminoterminale extracellulare ed il carbossiterminale intracellulare (10). Nell'uomo la sequenza codificante, localizzata sul cromosoma 19p12-13.2, è organizzata in 15 esoni e presenta una forma di *splicing* alternativo (11, 12).

NIS appartiene alla famiglia proteica dei Solute Carrier Family 5 (SCL5A, secondo la classificazione dell'OMIM). Come per NIS, i membri di questa famiglia utilizzano per il trasporto di soluti nella cellula la forza motrice del gradiente elettrochimico del sodio generato dalla pompa Na^+/K^+ , che, nelle cellule tiroidee, è espressa solo sulla membrana basolaterale (13).

1.2.1. IL TRASPORTO DI IODURO ATTRAVERSO NIS

Attraverso studi di elettrofisiologia, *uptake* di radioisotopi e di microscopia elettronica su oociti di *Xenopus laevis* iniettati con cRNA di NIS (complementary RNA) (14) è stato dimostrato che NIS trasporta sodio e ioduro con una stechiometria di 2:1 e che il trasporto mediato da NIS è elettrogenico e dunque comporta una depolarizzazione della membrana per l'ingresso di sodio. Sulla base dei risultati cinetici, è stato proposto un meccanismo di trasporto secondo il quale il

sodio si legherebbe a NIS prima dello ioduro in maniera ordinata e sequenziale, mentre il trasporto degli ioni sarebbe simultaneo (Figura II). La K_m per lo ioduro è di circa 30 μM (14), in linea con i risultati ottenuti da studi di uptake di isotopi radioattivi da parte di oociti di *Xenopus laevis* iniettati con cRNA di NIS (1) e da studi su cellule FRTL-5 (15). E' interessante notare come la concentrazione di ioduro libero nel plasma dei mammiferi sia di 50-300 nM (3). Da studi di *freeze fracturing*, risulta che NIS è presente in membrana sotto forma di multimeri, almeno negli oociti di *Xenopus laevis* (14).

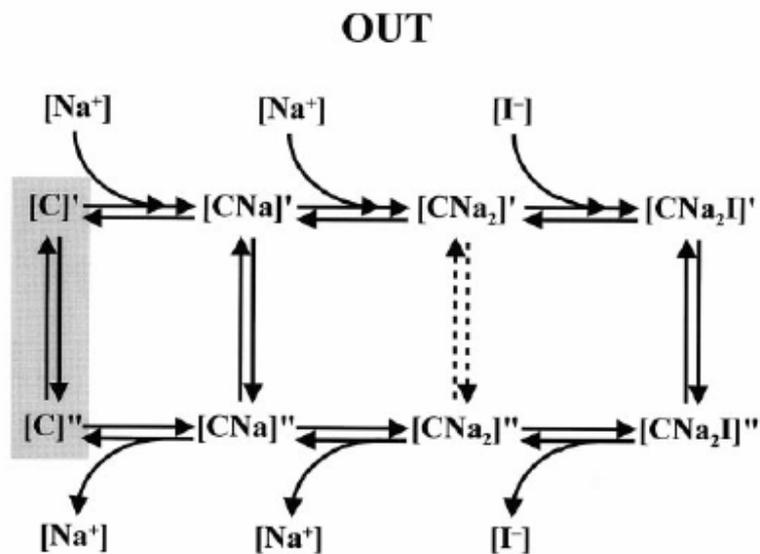


Figura II: Rappresentazione schematica del cotrasporto Na^+/I^- . In questo schema uno ione Na^+ lega il trasportatore. In assenza di substrato lo ione Na^+ può attraversare la membrana attraverso NIS con una modalità di uniporto per il Na^+ ($\text{CNa}' \rightarrow \text{CNa}''$; C, carrier). Il rilascio del Na^+ nel citoplasma è seguito dal ritorno del sito di legame vuoto per completare il percorso ($\text{C}'' \rightarrow \text{C}'$). La transizione $\text{CNa}_2' \rightarrow \text{CNa}_2''$ non dovrebbe contribuire significativamente alle correnti misurate. I dati cinetici suggeriscono che il Na^+ si lega al NIS prima dell'anione e che il rapporto di accoppiamento sia $2\text{Na}^+ : 1$ anione. In presenza di I^- si forma il complesso $\text{CNa}_2\text{I}'$ che con un cambiamento conformazionale espone i tre ioni legati all'interno della cellula ($\text{CNa}_2\text{I}' \rightarrow \text{CNa}_2\text{I}''$). Entrambi gli ioni di Na^+ e I^- sono rilasciati nel compartimento citoplasmatico ed il trasportatore va incontro ad un altro cambiamento conformazionale che espone nuovamente i siti di legame al comparto extracellulare. Il legame e la dissociazione del Na^+ non contribuiscono molto alla corrente totale osservata. E' stato proposto che i movimenti di carica di NIS siano dovuti principalmente ai cambiamenti conformazionali del trasportatore non legato a Na^+ (regione ombreggiata) (14).

1.2.2. IL PERCLORATO ED ALTRI INIBITORI DEL NIS

E' noto da molto tempo che alcuni grandi anioni come il tiocianato (SCN^-) e il perclorato (ClO_4^-) sono inibitori competitivi dell'accumulo di ioduro nella tiroide (3, 16, 17). Le proprietà antitiroidee di questi anioni furono scoperte già nel 1936, quando venne riportata la comparsa di gozzo e/o ipotiroidismo come effetto collaterale in pazienti ipertesi trattati con tiocianato (18). Il meccanismo di inibizione, la similitudine della carica e del raggio ionico con lo ioduro, suggeriscono che il perclorato ed altri inibitori condividano con lo ioduro lo stesso sito di interazione sulla molecola del NIS.

Queste proprietà sono state utilizzate per identificare il sistema di trasporto di ioduro nelle ghiandole salivari, nel plesso corioideo, nello stomaco e nella tiroide fetale.

Gli inibitori anionici devono necessariamente essere monovalenti, dal momento che nessun anione bivalente sembra poter inibire il trasporto (17).

Il perclorato (con una $K_i = 1.7 \text{ uM}$) risulta essere uno tra gli inibitori più potenti, tra 10 e 100 volte più potente del tiocianato nell'inibizione dell'accumulo di ioduro in una varietà di sistemi *in vivo* e *in vitro* (17, 19, 14).

Il perclorato è stato a lungo utilizzato nel trattamento dell'ipertiroidismo, tuttavia oggi non è più impiegato a causa dei severi effetti collaterali riscontrati (anemia aplastica, agranulocitosi) (19). E' stato dimostrato che il perclorato, in tiroide trattate con PTU (6-propil-2-tiouracile), può causare una perdita rapida verso l'interstizio dello ioduro accumulato nel tessuto tiroideo attraverso la membrana basolaterale (22, 23). Questo fenomeno è alla base del "ClO₄⁻ discharge test" utilizzato per individuare difetti nell'organificazione intratiroidea dello ioduro. Nei soggetti normali la somministrazione di perclorato blocca l'accumulo continuo di ioduro radioattivo da parte della tiroide, ma non provoca alcun rilascio dello ioduro già accumulato e organificato

dalla ghiandola. Al contrario, nei pazienti con difetti nell'organificazione di ioduro, la somministrazione dell'inibitore provoca il rilascio dello ioduro libero presente nella tiroide. L'efficacia dell'organificazione di ioduro deve essere valutata in alcune condizioni patologiche, come nei difetti genetici dell'organificazione (24).

Si ritenuto è a lungo che il perclorato fosse trasportato attraverso il NIS all'interno delle cellule follicolari tiroidee (17, 25). Tuttavia Il perclorato a differenza di altri anioni, quali ClO_3^- , SCN^- , SeCN^- , NO_3^- , Br^- , BF_4^- , IO_4^- , BrO_3^- non induce correnti entranti negli oociti di *Xenopus laevis* (14), (Figura III), in cellule FRTL-5 (27) o in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells) che esprimano stabilmente NIS (28).

E' stato dunque suggerito che il perclorato non venga trasportato attraverso il NIS nelle cellule e che agisca più come un bloccante che come substrato (28).

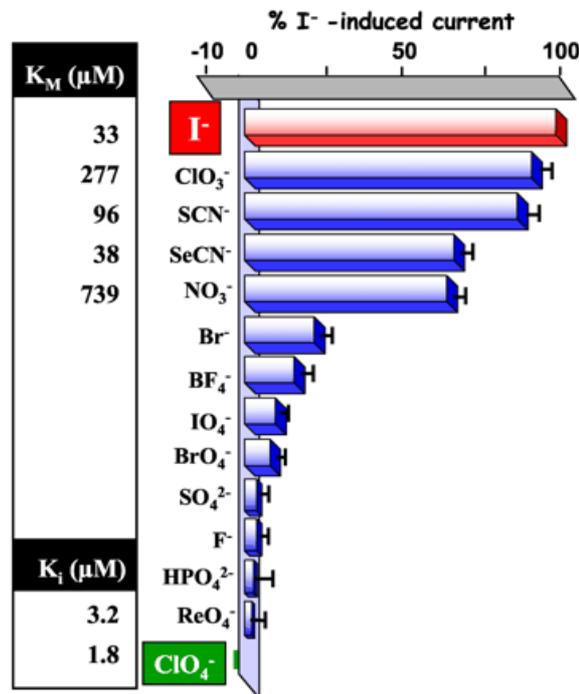


Figura III: Selettività del NIS rispetto a diversi substrati.

Le correnti entranti indotte da diversi anioni (500 μM) sono state registrate ad una V_m di -50 mV. Le correnti sono state normalizzate rispetto alla corrente generata dallo ioduro. La corrente indotta dallo ioduro in assenza di Cl^- non differisce da quella indotta in presenza di Cl^- 100mM. I dati sono riportati come media \pm errore *standard* (14).

1.2.3. GLICOSILAZIONE DEL NIS

Il NIS presenta tre potenziali siti di N-glicosilazione su altrettanti residui di asparagina: Asn 485, Asn 497 e Asn 225. La totale o parziale mancanza della glicosilazione, verificata con studi su mutanti per i tre siti di N-glicosilazione, non modifica sostanzialmente l'attività, la stabilità o il *targetting* di NIS (10). La massa molecolare stimata per NIS è di 65.2 kDa, ma il polipeptide non glicosilato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di SDS-poliacrilammide migra più rapidamente (50 kDa), con un comportamento elettroforetico già noto per proteine idrofobiche politopiche, dovuto ad un alto legame con il detergente, all'incompleto *unfolding* della struttura secondaria della proteina o ad una combinazione di questi due fenomeni (30, 31). Lo studio dell'*uptake* di iodio in cellule COS trasfettate con il *wild-type* e con i mutanti per ciascuno o tutti e tre i siti di glicosilazione ha mostrato che quest'ultimi sono ancora in grado di trasportare iodio all'interno della cellula, anche se l'*uptake* si riduce fino al 50% nel triplo mutante. Questi risultati implicano che nei mutanti privi di glicosilazione l'attività di trasporto venga fondamentalmente mantenuta e che la mancanza della glicosilazione non cambi sostanzialmente il *targetting* di NIS alla membrana. L'analisi cinetica comparata fra cellule trasfettate con il gene *NIS wild-type* e *NIS* privato dei siti di glicosilazione ha evidenziato che la proteina mantiene la stessa K_m per lo ioduro ma subisce una diminuzione di tre volte nella V_{max} apparente. La diminuita attività dei mutanti non è quindi dovuta ad un cambiamento nell'affinità per il substrato, ma alla presenza o di un numero minore di molecole di NIS sulla membrana plasmatica o ad un minor *turnover* di trasporto di ogni singola molecola di NIS (10).

1.2.4. REGOLAZIONE

La regolazione del NIS è mediata da diversi fattori, il principale dei quali è il TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). Lo ioduro stesso è in grado di regolare l'espressione del trasportatore. Varie citochine, prodotte da cellule infiammatorie infiltrate o dalle stesse cellule follicolari in caso di malattie autoimmuni possono regolare l'espressione del gene *NIS* (32, 33, 34, 35).

Regolazione da parte del TSH *in vivo* ed *in vitro*

L'ormone ipofisario TSH stimola il trasporto di iodio nella tiroide attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclasi e l'aumento del cAMP (36, 3). Studi *in vivo* su ratti e *in vitro* su cellule FRTL-5 e cellule tiroidee umane coltivate hanno dimostrato che il TSH non solo stimola il trasporto di ioduro ma anche la trascrizione dell'mRNA di NIS e l'espressione della proteina (37, 38).

In topi trattati con 6-propil-2-tiouracile (PTU), che inibisce l'organificazione dello ioduro, o nutriti con una dieta priva di iodio, gli alti livelli di TSH plasmatico sono correlati ad un aumento dell'espressione proteica di NIS nella tiroide. In topi ipofisectomizzati i livelli di espressione proteica di NIS sono drammaticamente diminuiti e possono essere riportati ad un livello normale con la somministrazione esogena di TSH (38).

Nelle cellule FRTL-5 il trasporto di ioduro stimolato dal TSH è mediato dall'aumento intracellulare del cAMP (209), di fatto può essere anche indotto dal (Bu)₂cAMP o dalla forskolina, un inibitore della fosfodiesterasi.

Le cellule FRTL-5 in terreno senza TSH diminuiscono progressivamente, ma con cinetiche differenti, sia l'espressione di NIS sia la capacità di trasportare ioduro (39). Depravando le cellule di TSH, dopo 5 giorni i valori di IUA (Iodide Uptake Activity) sono pari a zero, mentre si

osserva un'espressione proteica pari ancora al 30% del valore iniziale. Quando si fornisce nuovamente alle cellule il TSH dopo sette giorni di deprivazione, che abbattano sia il livello di espressione proteica sia la IUA, i livelli proteici di NIS ritornano in 48 ore al loro massimo, mentre quelli di IUA raggiungono il 15-20% del loro valore iniziale massimo e si assestano su un *plateau* del 50% nei tre giorni successivi.

Questa dissociazione fra l'attività di *uptake* di ioduro e il contenuto cellulare del trasportatore di ioduro nelle FRTL-5 dopo deprivazione e reintroduzione del TSH nel terreno di coltura suggerisce l'esistenza di un fattore di attivazione, la cui sintesi o attività diminuisce rapidamente e aumenta più lentamente nelle cellule deprivate e poi rieste al TSH. La modulazione dell'attività del trasportatore potrebbe anche coinvolgere meccanismi di fosforilazione o cambiamenti dello stato di oligomerizzazione. Il trasportatore possiede infatti un sito putativo di fosforilazione da parte della proteina chinasi A nella porzione carbossiterminale ed è possibile che la forma funzionale del trasportatore sia multimerica, come riportato da Eskandari *et al.*, 1997 (14). Tuttavia l'esatto meccanismo di regolazione non è ancora pienamente chiarito e nei diversi studi si riscontrano numerose discordanze (39, 37).

Regolazione post-trascrizionale

L'attività di *uptake* di ioduro permane in vescicole di membrana preparate a partire da cellule FRTL-5 coltivate con e senza TSH: nelle vescicole rimangono intrappolate molecole di NIS attive che non risultano invece disponibili sulla membrana plasmatica delle cellule private di TSH (40). Questa osservazione suggerisce che ci possano essere altri meccanismi non trascrizionali che regolano l'attività di NIS, come ad esempio una redistribuzione nei comparti intracellulari della proteina funzionante. Ulteriori studi da parte di Riedel *et al.* (41) hanno infatti dimostrato che il TSH nelle FRTL-5 produce un aumento del tempo di dimezzamento di NIS da

tre giorni (in cellule senza TSH) a cinque, e che la mancanza di TSH produce una redistribuzione del trasportatore nei compartimenti intracellulari, evidenziata con immunofluorescenza e con Western blotting sulla frazione proteica esposta extracellularmente e su quella intracellulare.

Il NIS contiene diversi siti consenso per le chinasi, come la glicogeno sintasi chinasi 3, le chinasi ciclino-dipendenti I e II, la proteina chinasi A e la proteina chinasi C. Studi con $^{32}\text{P}_i$ hanno dimostrato che lo stato di fosforilazione della proteina risponde al TSH (41).

Regolazione da parte dello ioduro

Il fattore principale che regola l'accumulo di ioduro nella tiroide, e quindi dell'attività del NIS, è stato individuato nello ioduro stesso. Alte dosi di ioduro, infatti, diminuiscono l'attività tiroidea.

Wolff e Chaikoff (42) hanno riportato nel 1948 in uno studio *in vivo* che l'organificazione dello ioduro nella tiroide di ratti è bloccata quando le concentrazioni di ioduro nel plasma raggiungono una soglia critica, un fenomeno noto con effetto acuto di Wolff-Chaikoff. L'organificazione ricomincia quando il livello di ioduro nel plasma diminuisce.

Studi ulteriori hanno dimostrato che questo effetto dipende dalle concentrazioni intracellulari di ioduro più che dalle concentrazioni plasmatiche, dal momento che l'effetto di inibizione acuta viene abolito dal tiocianato, che è un inibitore competitivo dello ioduro per NIS che è trasportato all'interno della ghiandola (43). È stato proposto che l'effetto Wolff-Chaikoff sia in realtà mediato da un composto intracellulare iodinato, forse un iodolipide, in grado di inibire anche l'attività adenilato-ciclasica stimolata dal TSH (44).

È stato osservato *in vitro* su cellule FRTL-5 che i livelli proteici di NIS diminuiscono dopo somministrazioni di ioduro mM nell'arco delle successive 48 ore, in seguito ad un aumento del *turnover* di NIS che nelle cellule così trattate passa da 4-5 giorni a 24 h. Nello studio di Eng *et al.* del 2001 (203) i livelli di mRNA non mostrano cambiamenti significativi. Tuttavia analisi *in*

vivo precedentemente effettuate (45, 32) mostravano una diminuzione anche dell'RNA già a dosi dell'ordine di 10^{-4} M di ioduro con somministrazioni di 1-6 giorni. Il meccanismo di regolazione trascrizionale responsabile di questo effetto non è ancora definitivamente chiarito.

Regolazione di NIS da parte della tireoglobulina (Tg)

La Tg follicolare riduce i livelli di mRNA di *NIS* attraverso la soppressione dell'espressione genica a livello trascrizionale, facendo diminuire i livelli di un fattore di trascrizione tiroide-specifico, Pax-8; la Tg di conseguenza regola negativamente i livelli di NIS e l'attività di *uptake* di ioduro nelle cellule FRTL-5 (46).

La tireoglobulina contribuisce inoltre, insieme al TSH stesso, alla diminuzione dell'espressione del TSHR (TSH Receptor).

1.2.5. ESPRESSIONE EXTRATIROIDEA DEL NIS

Oltre che nella tiroide il trasporto attivo di ioduro *via* NIS avviene nella ghiandole salivari, nella mucosa gastrica e nella ghiandola mammaria durante la lattazione (47).

Il trasporto di ioduro tramite NIS nelle sedi extratiroidee mostra somiglianze funzionali con quello che avviene a livello della tiroide (come l'inibizione da parte del tiocianato e del perclorato), ma presente anche delle importanti differenze:

- le sedi di trasporto extratiroidee non sono in grado di organificare lo ioduro accumulato;
- il TSH non ha influenza regolatoria;
- alcune di queste sedi (ghiandole salivari e mucosa gastrica) sono in grado di accumulare tiocianato, che invece nella tiroide è rapidamente metabolizzato e non viene concentrato.

Lo ioduro concentrato nella ghiandola mammaria viene secreto nel latte ed usato dal lattante per la biosintesi degli ormoni tiroidei. Studi di immunocistochimica e Western blotting hanno identificato nei tessuti mammari di ratto durante la lattazione due bande di circa 100 e 75 kDa corrispondenti a diverse forme di glicosilazione di NIS nella ghiandola mammaria (47). Contrariamente alla tiroide, in cui l'espressione di NIS è costitutiva, nella ghiandola mammaria essa inizia a manifestarsi circa a metà della gestazione, in seguito ad un'attività di proliferazione e differenziazione. Da saggi con isotopi radioattivi risulta che all'espressione è associato un significativo aumento del trasporto di ioduro verso la fine della gestazione. Inoltre nella ghiandola durante la lattazione l'espressione di NIS risponde agli stimoli di suzione (47).

Uno studio in topi ovariectomizzati e non ha evidenziato che la regolazione dell'espressione in questo caso è dovuta alla concomitante azione dell'ossitocina e del 17- β -estradiolo. La prolattina, ormone secreto insieme all'ossitocina in risposta alla suzione, ha un ruolo non ancora del tutto chiaro, in quanto sembra avere un effetto stimolante o inibente sull'espressione di NIS a seconda, che esistano rispettivamente alti o bassi livelli di estrogeni nell'animale.

Nello stesso studio attraverso l'immunocistochimica è stata accertata la presenza di NIS nella mucosa gastrica e nelle ghiandole salivari. È stato ipotizzato che il NIS abbia un ruolo importante nel trasporto di ioduro dal flusso sanguigno al lume gastrico, anche attraverso il piccolo contributo dato dalle ghiandole parotidi, garantendo un ricircolo enterotiroideo che potrebbe proteggere dalle deficienze di ioduro e regolarne l'assorbimento (48). Studi più accurati della funzione e delle caratteristiche di questo trasporto sarebbero interessanti anche alla luce dell'aumentata incidenza e mortalità di carcinoma gastrico nei pazienti trattati con radioterapia con ^{131}I .

Esistono numerosi studi che hanno accertato la presenza dell'mRNA di NIS in vari organi e tessuti (26), ma a questi è necessario affiancare studi di immunocistochimica, Western blotting e

di attività per accertarne i falsi positivi e per verificare che la proteina venga effettivamente espressa e sia attiva. Oltre che negli organi precedentemente citati, l'accumulo di ioduro è stato accertato anche nel plesso corioideo e nel corpo ciliare dell'occhio (49), dati contrastanti di espressione proteica esistono anche per la placenta (50).

1.2.6. DIFETTI CONGENITI DEL TRASPORTO MEDIATO DAL NIS

L'ITD (Iodide Transport Defect) è una patologia abbastanza rara. Il quadro clinico generale consiste nell'ipotiroidismo (che può essere normalizzato in alcuni casi con alte dosi di ioduro o con terapia sostitutiva con L-T₄), nel gozzo, nel basso *uptake* di ioduro e nel basso rapporto di concentrazione di ioduro fra saliva e plasma. Anche se l'ipotiroidismo congenito è una malattia poco frequente (con un'incidenza di 1:3000-1:4000 nei neonati) (51), ha effetti deleteri e irreversibili sullo sviluppo del neonato, che, se non trattati, sfociano nel cretinismo. Mutazioni in geni tiroide-specifici, come *TPO* (52), *Tg* (53) e *TSHR* (54), sono state identificate fra le cause dell'ipotiroidismo congenito. Più recentemente anche mutazioni nel gene *NIS* si sono dimostrate determinanti nell'ipotiroidismo. In assenza di molecole di NIS funzionali, lo ioduro non ha accesso alle cellule epiteliali della tiroide, il che causa una diminuita biosintesi degli ormoni tiroidei ed elevati livelli di TSH circolante, che a loro volta stimolano i cambiamenti morfologici e biochimici che portano allo sviluppo del gozzo.

Casi di adenoma follicolare, oltre che di gozzo multinodulare, sono stati associati all'ITD, ma resta da chiarire se la tumorigenesi osservata sia da attribuire alle mutazioni, o, come sembra più probabile, alle condizioni ormonali dei pazienti e ai trattamenti ricevuti. Il trattamento prevede la somministrazione di alte dosi di ioduro per compensare gli scarsi livelli di *uptake*. Il meccanismo proposto per questa compensazione è stato spiegato con il trasporto attraverso canali o

trasportatori non specifici o per diffusione semplice. Comunque nella maggior parte delle mutazioni studiate nel NIS l'attività di trasporto non è completamente abolita, suggerendo che un'attività di trasporto molto bassa può essere compensata anche attraverso la sovraespressione del trasportatore. All'anno 2000 erano stati riportati circa 48 casi di ITD nel mondo, provenienti da 33 famiglie.

Sono state identificate circa 10 mutazioni nel gene *NIS* che sono causa di difetti congeniti del trasporto dello ioduro (Figura IV). Queste mutazioni si ritrovano tutte in omozigosi o in eterozigoti insieme ad altre mutazioni che causano perdita della funzione. Il modello di trasmissione è quindi recessivo, ed i soggetti eterozigoti sono generalmente eutiroidei e con dimensioni della ghiandola tiroidea normali o minimamente aumentate. Questo suggerisce che una copia sana del gene è in grado di fornire livelli adeguati di proteina per il trasporto. Solo per alcune mutazioni è stata effettuata una caratterizzazione funzionale.

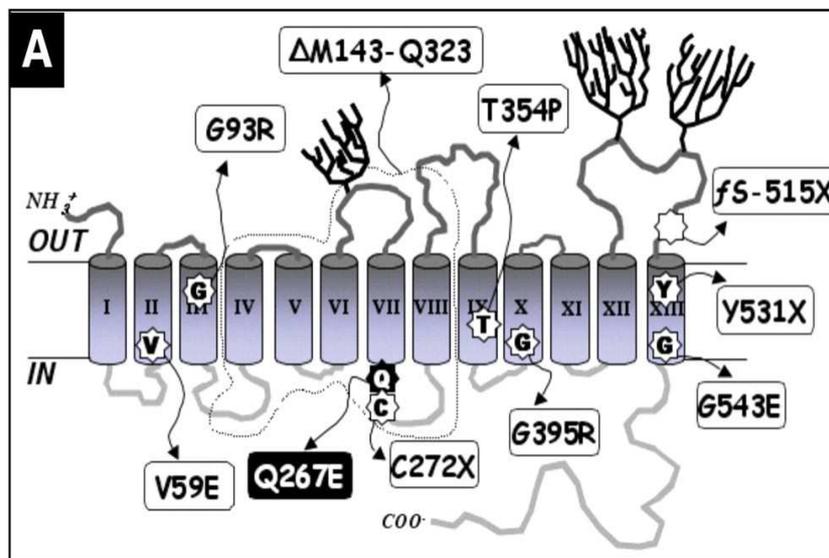


Figura IV: Modello a 13 domini transmembrana della struttura secondaria del NIS umano *wild-type*. Le mutazioni che causano ITD sono mostrate nei rettangoli vicino al residuo coinvolto, con indicazione della posizione e del residuo sostituito. E' stato usato il codice aminoacidico a singola lettera. X, codone di stop; fs, frame shift; Δ, delezione (55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67).

1.3. LA PENDRINA

La pendrina contribuisce all'efflusso di ioduro attraverso la membrana apicale dei tireociti ed è codificata del gene *PDS* responsabile della Sindrome di Pendred. Questo gene, identificato attraverso il clonaggio posizionale sul cromosoma 7q31 all'interno dell'intervallo critico di *linkage* (68), contiene 21 esoni e codifica per un trascritto di 5 kb. Il prodotto è una proteina con 11 o 12 domini transmembrana, altamente idrofobica, composta da 780 aminoacidi e con un peso molecolare di 86 kDa. L'analisi con Western blotting ha rivelato che la proteina è espressa nella tiroide in una forma glicosilata di 115-110 kDa, in accordo con la predizione di diversi siti di glicosilazione sul primo e terzo *loop* extracellulare della proteina.

1.3.1. IL TRASPORTO DI IODURO ATTRAVERSO LA PENDRINA

Per la sua analogia con una famiglia di trasportatori di solfato, inizialmente era stato ipotizzato che la funzione della proteina fosse proprio il trasporto di solfato. Studi di espressione in oociti di *Xenopus laevis* e in cellule Sf9 (ottenute da *Spodoptera frugiperda*) (69) hanno dimostrato che la pendrina è piuttosto un trasportatore di ioduro indipendente dal sodio.

In seguito è stato anche dimostrato che nel tessuto tiroideo di pazienti affetti da sindrome di Pendred il trasporto di solfato non è alterato (70). Studi in cellule CHO e COS-7 (African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells) trasfettate con il cDNA del gene *PDS* hanno evidenziato che la pendrina trasporta efficientemente lo ioduro solo quando la sua concentrazione supera l'1 mM (71). Questo è in accordo con la funzione della proteina di mediare il trasporto verso il *lumen*

follicolare dello ioduro accumulato *via* NIS nel citoplasma. Questa evidenza suggerisce che la pendrina avrebbe le caratteristiche di un canale piuttosto che di un trasportatore.

Uno studio in cellule polarizzate MDCK (epithelial Madin-Darby canine kidney) coltivate all'interfaccia in una camera doppia, esprimenti sia NIS sia la pendrina, ha dimostrato che la pendrina è in grado di permettere la concentrazione di ioduro da una camera all'altra, cosa che non si osserva nelle cellule che esprimono solo NIS e che presentano solo alte concentrazioni intracellulari di ioduro (72).

La pendrina, in altri tipi cellulari, di mammifero e non, ha mostrato attività di scambiatore cloruro/base. E' stato infatti riportato (69) che la pendrina espressa in oociti di *Xenopus laevis* ha proprietà di trasporto simili a quelle dello scambiatore cloruro/formato (5). In cellule embrionali umane renali la pendrina è in grado di trasportare bicarbonato, lo ione idrossido ed il formato (4). Tuttavia i trasportatori ionici e i canali a volte mostrano funzioni alterate quando espressi in tipi cellulari differenti (ad esempio in studi su oociti di *Xenopus laevis* e Sf9 (69) era stata evidenziata una competizione fra cloruro e ioduro non è confermata in studi successivi).

Uno studio più recente (73) condotto con tecniche di elettrofisiologia indicherebbe la pendrina come uno scambiatore Cl⁻/I⁻. Essa medierebbe l'ingresso di cloruro e la fuoriuscita di ioduro dalla cellula verso il *lumen* follicolare e, sia il cloruro sia lo ioduro, agirebbero come attivatori del trasporto. Il riassorbimento dal follicolo del cloruro contribuirebbe al mantenimento del volume, della distribuzione di acqua e delle concentrazioni degli elementi presenti all'interno del follicolo.

1.3.2. REGOLAZIONE DELLA PENDRINA DA PARTE DELLA TIREOGLOBULINA E DEL TSH

L'espressione del gene *PDS* sembra essere meno sensibile agli effetti stimolatori diretti del TSH rispetto ad esempio ai geni per NIS e TPO (Tireoperossidasi). Tuttavia l'espressione della pendrina sembra essere connessa al *network* regolatorio determinato dai livelli di TSH e Tg (Tireoglobulina) proprio grazie a quest'ultima: livelli bassi di Tg sembrano indurre l'espressione della pendrina (74). In generale la Tg sembra antagonizzare l'effetto stimolante del TSH, infatti livelli alti di Tg producono una riduzione dell'espressione di NIS e del TSHR stesso. Un modello concertato di regolazione prevede che in un follicolo con un *lumen* ricco di Tg accumulata, la Tg sopprima l'espressione di NIS, riducendo quindi l'*uptake* di ioduro. La trascrizione di *PDS* è bassa in queste condizioni, ma la proteina ancora funzionante è in grado di trasportare nel *lumen* del follicolo tutto lo ioduro già concentrato all'interno della cellula per la iodinazione. In questo follicolo, il TSH agirebbe soprattutto favorendo il riassorbimento e la degradazione della Tg follicolare e favorendo la secrezione di T₃/T₄ nel flusso sanguigno. Poiché il riassorbimento dal follicolo e la degradazione nei lisosomi della Tg sarebbe a questo punto maggiore della nuova sintesi di Tg, la concentrazione della Tg in questo follicolo inizierebbe a diminuire. La diminuzione del contenuto follicolare della Tg consentirebbe infine una ripresa dell'espressione del NIS, della pendrina e della Tg stessa (75).

1.3.3. ESPRESSIONE EXTRATIROIDEA DELLA PENDRINA

L'espressione del gene *PDS* è stata rilevata nella tiroide e nel rene attraverso Northern blot e nella coclea fetale attraverso PCR su una libreria di cDNA.

Anche analisi immunoistochimiche (76) hanno confermato la presenza della pendrina sulla membrana apicale delle cellule epiteliali del tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle e del tubulo contorto distale, anche se in quantità 200 volte minori che nella tiroide. Inoltre, solo una minoranza di cellule si è mostrata positiva, riflettendo livelli di espressione eterogenei.

E' stato riportato (69) che la pendrina espressa in oociti di *Xenopus laevis*, ha proprietà di trasporto simili a quelle dello scambiatore cloruro/formato, che partecipa nel riassorbimento del 60% del cloruro filtrato ed è localizzato sulla membrana apicale delle cellule del tubulo prossimale. Inoltre la proteina è stata rilevata nei dotti collettori corticali (4), in particolare nelle cellule intercalate. Le cellule intercalate hanno il compito di fornire una regolazione fine dell'escrezione acido/base per mezzo di un processo di trasporto di bicarbonato. Inoltre, i dotti collettori corticali provenienti da topi *Pds*^{-/-} non sono in grado di secernere bicarbonato.

La capacità della pendrina di mediare il trasporto di questi anioni apre interessanti spunti per capire la sua funzione nell'orecchio interno. La composizione dell'endolinfa nell'orecchio interno ha una bassa concentrazione di sodio, ma alte concentrazioni di potassio e cloruro rispetto al plasma e alla perilinfa. La generazione di questi gradienti ionici è garantita da diversi trasportatori ionici collocati su vari tipi di cellule nell'orecchio interno. Mutazioni nei geni che codificano per questi trasportatori ionici sono associati a forme di sordità, indicando che il mantenimento della normale composizione elettrolitica nell'orecchio interno è un parametro critico per una normale funzione uditiva.

1.3.4. LA SINDROME DI PENDRED

La sindrome di Pendred è un disturbo autosomico recessivo caratterizzato dall'associazione della sordità neurosensoriale al gozzo. Esiste una grossa variabilità intra ed interfamiliare. La maggior parte dei pazienti è eutiroidea, indipendentemente dalla presenza del gozzo, mentre l'ipotiroidismo, generalmente subclinico, si osserva in circa il 30-40% dei casi.

E' la forma più comune di sordità sindromica e rende conto del 10% delle sordità ereditarie (77).

Nella sindrome di Pendred, l'orecchio interno ha alterazioni morfologiche che vanno dalla dilatazione del dotto vestibolare alla malformazione di Mondini, in cui le tipiche curve della coclea formano invece una cavità comune. L'alterazione del trasporto ionico associato alla sindrome di Pendred potrebbe portare a flussi anormali di sali e acqua, con conseguente dilatazione e perdita della normale architettura della coclea.

Le anomalie renali non sono parte delle manifestazioni cliniche della sindrome di Pendred, molto probabilmente per la ridondanza dei sistemi di trasporto del cloruro nel nefrone.

Nella tiroide dei soggetti affetti da questa patologia lo ioduro non è completamente organificato, con effetti variabili sulla biosintesi degli ormoni tiroidei (78). Sono note più di novanta mutazioni del gene, la maggior parte delle quali sono mutazioni missenso. Alcune di queste portano a proteine con *targetting* alterato alla membrana plasmatica che sono ritenute nel reticolo endoplasmatico (80, 81).

Studi funzionali sulla localizzazione della proteina mutata (Tabella I) effettuati in cellule HeLa tramite l'analisi dell'efflusso di ioduro e di fluorescenza su pendrina *wild-type* e non con *tags* costituiti da Green Fluorescent Protein hanno evidenziato che molte di queste mutazioni provocano l'intrappolamento della pendrina nel reticolo endoplasmatico (*Endoplasmatic Reticulum Storage Disorders, ERSD*) (80).

MUTANTI	EFFETTI
G102R	Colocalizza con ER
L117F	Distribuzione simile al <i>wild-type</i>
V138F	Colocalizza con ER
G209V	Distribuzione simile al <i>wild-type</i> ; riduzione del trasporto
L236P	Ritenuto parzialmente nel ER
T410M	Colocalizza con ER
Q446R	Colocalizza con ER
Y556C	Distribuzione parzialmente simile al <i>wild-type</i>
G673E	Distribuzione parzialmente simile al <i>wild-type</i>
L676Q	Ritenuto parzialmente nel ER
<i>FS 306->309X</i>	Ritenuto parzialmente nel ER

Tabella I: Mutazioni di *PDS* che causano ritenzione nel Reticolo Endoplasmatico (81, 72, 9, 80).

1.4. IL CANCRO TIROIDEO

I carcinomi tiroidei differenziati sono relativamente rari. L'incidenza annuale in varie parti del mondo va di 0.5 a 10 casi per 100.000 persone. Fattori di rischio importanti sono l'esposizione a radiazioni al collo durante l'infanzia, che aumentano il rischio di carcinoma papillare della tiroide, e deficienze di iodio per i carcinomi follicolari ed anaplastici. Una maggiore incidenza di carcinomi papillari si riscontra in pazienti con poliposi adenomatosa del colon. Circa il 3% dei carcinomi papillari sono familiari (83).

I noduli tiroidei che accumulano ioduro in maniera uguale o più efficiente rispetto al circostante tessuto normale sono generalmente benigni, mentre la maggior parte dei cancri tiroidei mostra una marcata diminuzione nell'accumulo di ioduro rispetto al tessuto sano. In effetti, i carcinomi che si comportano come noduli caldi iperfunzionanti sono molto rari. Per questo motivo lo ioduro ha un ruolo enorme in campo diagnostico e terapeutico per la diagnosi e cura dei tumori tiroidei differenziati.

I principali tipi morfologici dei tumori tiroidei differenziati sono il carcinoma papillare (75-85% di tutti i tumori tiroidei) e il carcinoma follicolare (10-20%). Entrambi originano dalle cellule tiroidee follicolari.

Il carcinoma papillare è un tumore privo di capsula con strutture follicolari e papillari caratterizzato da cellule con nuclei sovrapposti con solchi longitudinali, anche se ne esistono numerose varianti istologiche.

Il carcinoma follicolare è caratterizzato dalla differenziazione follicolare, ma senza i cambiamenti nucleari tipici del carcinoma papillare. L'invasione della capsula è uno degli elementi per distinguere tra queste varianti. Si riconoscono diverse forme tumorali in base alla

capacità invasiva. Si possono anche distinguere carcinomi ben differenziati con struttura macrofollicolare fino a carcinomi poco differenziati con piccole aree di crescita solida (83).

Il trattamento dei carcinomi tiroidei differenziati consiste nella tiroidectomia totale o quasi totale seguita da trattamento ablativo con ^{131}I . Il radioisotopo distrugge i carcinomi microscopici occulti nonché tutto il rimanente tessuto tiroideo normale. Nella fase postablazione è possibile la ricerca di eventuali metastasi con un *total body scan* con ^{131}I (8, 26). Spesso viene anche somministrata tiroxina, poiché molti carcinomi sono sensibili al TSH. Infatti l'inibizione del rilascio di TSH attraverso la somministrazione di tiroxina aumenta la sopravvivenza e diminuisce il numero di ricadute (83).

Tuttavia circa il 33% dei tumori tiroidei metastatici e la totalità dei tumori anaplastici perdono la capacità di accumulare ioduro radioattivo (216, 207) ed al momento non sono disponibili trattamenti efficaci per i pazienti con queste forme tumorali aggressive.

1.4.1. ESPRESSIONE DEL NIS NELLE LESIONI NEOPLASTICHE

Normalmente in un dato follicolo, la proteina NIS è rilevabile solo in alcuni tireociti. L'espressione è basolaterale ed il numero di tireociti positivi varia da follicolo a follicolo, con una prevalenza di espressione nei follicoli piccoli composti da tireociti cuboidali e colonnari e solo più raramente nei follicoli larghi composti di tireociti appiattiti. Questo dato è consistente con il fatto che l'attività di concentrare lo ioduro è eterogenea fra i diversi follicoli all'interno della tiroide (84). L'espressione di NIS nei carcinomi tiroidei va quindi confrontata con questa distribuzione che già in condizioni fisiologiche si presenta non omogenea.

Esistono numerosi studi sull'espressione di NIS nei tumori e nei noduli benigni della tiroide. I loro risultati sono però molto discordanti, dal momento che sono stati condotti con tecniche

differenti e dal momento che l'espressione di *NIS* si avvale di numerosi meccanismi regolatori (trascrizionale, traduzionali, post-traduzionali, di *targetting* alla membrana plasmatica, di distribuzione nei compartimenti intracellulari). Alcuni studi hanno suggerito una diminuzione dell'espressione di *NIS* (85, 86, 84); altri hanno indicato un'alterazione nel controllo post-trascrizionale nei tumori tiroidei (87) ed altri ancora un aumento dei livelli di espressione del trasportatore (88, 90, 89, 91).

Nelle lesioni neoplastiche al momento non c'è evidenza della presenza di mutazioni nel gene di *NIS* (92).

1.4.2. ESPRESSIONE DELLA PENDRINA NELLE LESIONI NEOPLASTICHE DELLA TIROIDE

L'espressione e la funzione di alcuni geni specifici per la tiroide risultano alterate nei tumori tiroidei (gene *TPO*, *Tg*, *TSHR* e *NIS*). Inoltre sono noti difetti nel trasporto di ioduro nelle cellule cancerose (85). Pertanto anche l'espressione del gene *PDS* è stata analizzata nei tumori della tiroide, sia con PCR quantitativa, che con studi di immunocistochimica (74). L'analisi immunocistochimica di 18 tumori maligni non ha rivelato complessivamente grosse differenze rispetto al tessuto tiroideo normale. L'analisi con RT-PCR ha mostrato variazioni molto limitate nei tumori maligni e benigni rispetto al tessuto normale (93).

1. 5. IL CANCRO MAMMARIO

E' stato riportato che alcuni tumori ormone-dipendenti del seno concentrano lo ioduro di 5-7 volte rispetto ai livelli plasmatici (94).

Dal confronto di 23 carcinomi invasivi e 6 carcinomi duttali con 8 campioni normali da mammoplastiche riduttive è stato trovato che l'87% dei carcinomi invasivi e l'83% di quelli duttali esprimono NIS (mentre nei campioni di controllo non vi è espressione) (47).

Immagini scintigrafiche *in vivo* di adenocarcinomi mammari in femmine di topo non in gestazione e non in lattazione con attivazione dell'oncogene *Ras* o sovraespressione dell'oncogene *Neu* hanno dimostrato una pronunciata attività specifica di NIS (che può essere inibita con perclorato). Il potenziale diagnostico dell'alta prevalenza dell'espressione di NIS nei tumori umani del seno (più dell'80%, contro lo 0% dei controlli negativi) diventa evidente se lo si compara con la prevalenza (33%) del principale *marker* tumorale attualmente utilizzato per il carcinoma mammario, *Her2/neu* (47).

E' stato riportato che il trattamento con acido retinoico tutto-trans (t-RA) aumenta la produzione di mRNA di *NIS* nonché della proteina stessa, e stimola l'*uptake* di ioduro in maniera tempo e dose dipendente fino a 9.4 volte il valore basale di trasporto in una linea cellulare di cancro mammario MCF-7 che esprime il recettore degli estrogeni (95). Studi nelle cellule MCF-7 hanno dimostrato che l'estradiolo aumenta l'espressione di RAR (Retinoic Acid Receptor). Non è stata invece osservata nessuna induzione dell'espressione di NIS in seguito a trattamento con t-RA in linee cellulari negative per il recettore degli estrogeni o in linee di tessuto normale. La V_{max} del trasporto di ioduro nelle cellule MCF-7 è pari solo al 15% della V_{max} nelle FRTL-5, suggerendo una ridotta espressione di NIS nelle MCF-7 rispetto alla FRTL-5. Tuttavia la ridotta espressione

potrebbe essere in parte compensata dal maggior tempo di dimezzamento della concentrazione intracellulare di ioduro di circa 24 min nelle MCF-7 (nelle FRTL-5 è di soli 3.9 min); il tempo di permanenza di un isotopo radioattivo nelle cellule cancerose mammarie potrebbe rivelarsi inaspettatamente lungo, con risvolti positivi per il successo della radioterapia. Il t-RA diminuisce l'*uptake* di ioduro nelle cellule FRTL-5, mentre la forskolina non lo induce nelle MCF-7, a conferma della diversità di regolazione del NIS nelle linee cellulari tiroidee e mammarie, come riflesso della modulazione differenziale del trasporto di ioduro via NIS nelle due diverse sedi.

I successivi studi *in vivo* hanno dimostrato in modelli animali che il trattamento con t-RA induce un aumento di 15 volte rispetto al trasporto basale nelle cellule cancerose mammarie, mentre non si osserva un aumento significativo dell'accumulo indotto dal trattamento negli altri organi (96). Non è del tutto chiaro se l'organificazione dello ioduro sia necessaria per aumentare la permanenza del radioisotopo nelle strutture cancerose, considerando che esse molto spesso mancano della struttura follicolare. Comunque, la radioterapia si è dimostrata efficace *in vitro* (97) nel trattamento sperimentale del cancro alla prostata, dopo induzione tessuto specifica di NIS. Poiché in questo sistema non c'è organificazione, questo studio indica che la radioterapia potrebbe essere efficace anche in sistemi che trasportano ma non organificano lo ioduro, come può essere il cancro del seno. I dati incoraggianti sul tempo di permanenza *in vitro* in linee cellulari dello ioduro nei cancri mammari necessitano di ulteriori conferme su colture primarie *in vitro* e attraverso studi *in vivo*. Inoltre, poiché NIS nella tiroide e nella ghiandola mammaria è regolato in maniera differente, sarebbe possibile proteggere la tiroide in caso di somministrazione di radioisotopi a pazienti di cancro al seno. Infatti la soppressione della tiroide con somministrazione esogena di T₃ porterebbe all'inibizione del rilascio di TSH e alla concomitante sottoregolazione del NIS tiroideo, proteggendo conseguentemente il tessuto tiroideo dalla radioterapia (47).

1.6. PROTEINE FLUORESCENTI PER L'IMAGING IN VIVO

1.6.1. CARATTERISTICHE GENERALI

La possibilità di indagare molti sistemi biologici dipende in modo rilevante dalla capacità di visualizzare e quantificare nelle singole cellule molecole segnale ed eventi con alta risoluzione spaziale e temporale. Gli avanzamenti nella microscopia a fluorescenza e nell'ingegnerizzazione delle proteine appartenenti alla famiglia delle GFP (Green Fluorescent Proteins) in mutanti con migliorate proprietà spettrali e biochimiche forniscono gli strumenti di base per investigare i processi più complessi nelle cellule viventi.

Le sonde basate su proteine fluorescenti (di seguito indicate come FP) presentano alcune caratteristiche vantaggiose rispetto ai cromofori organici più semplici, in quanto possono essere disegnate per rispondere a una più ampia varietà di eventi biologici e segnali, si possono indirizzare in diversi compartimenti cellulari ed introdurre in un' ampia varietà di tessuti e organismi intatti. Le proteine chimeriche contenenti FP hanno il vantaggio di poter essere espresse *in situ* mediante trasferimento genico. Inoltre, solo raramente, sono causa di tossicità o di perturbazioni del sistema analizzato.

La GFP, originalmente isolata nella medusa *Aequorea victoria* da Shimomura *et al.* nel 1962 (204), agisce come emettitore secondario nel sistema di bioluminescenza basato sulla fotoproteina Ca^{2+} -dipendente Aequorina, ossia converte il segnale indotto dal calcio nella fluorescenza verde tipica della specie.

Le potenzialità della GFP come sonda furono riconosciute solo dopo il clonaggio avvenuto nel 1992 (205) e la sua espressione in sistemi eterologhi, dove un prodotto di fusione fu usato per

monitorare l'espressione genica in batteri e nematodi (206, 105, 208). A partire da questi studi la GFP è stata ingegnerizzata per produrre un vasto numero di mutanti capaci di coprire gran parte dello spettro visibile, proteine di fusione e biosensori.

Recentemente sono state identificate ed isolate proteine fluorescenti anche da altre specie, consentendo un'ulteriore espansione delle caratteristiche biochimiche e dello spettro disponibile.

1.6.2. PROPRIETA' E MODIFICAZIONI DELLA GFP DI *AEQUOREA VICTORIA*

Le proteine fluorescenti appartenenti a questa famiglia hanno una massa molecolare di circa 25 kDa e presentano una struttura a β -barrel essenziale per lo sviluppo ed il mantenimento della fluorescenza. La formazione del cromoforo all'interno del globulo proteico non richiede cofattori esterni (eccetto l'ossigeno). Il fluoroforo è derivato da una tripletta di aminoacidi adiacenti, ossia Ser 65, Tyr 66, Gly 67.

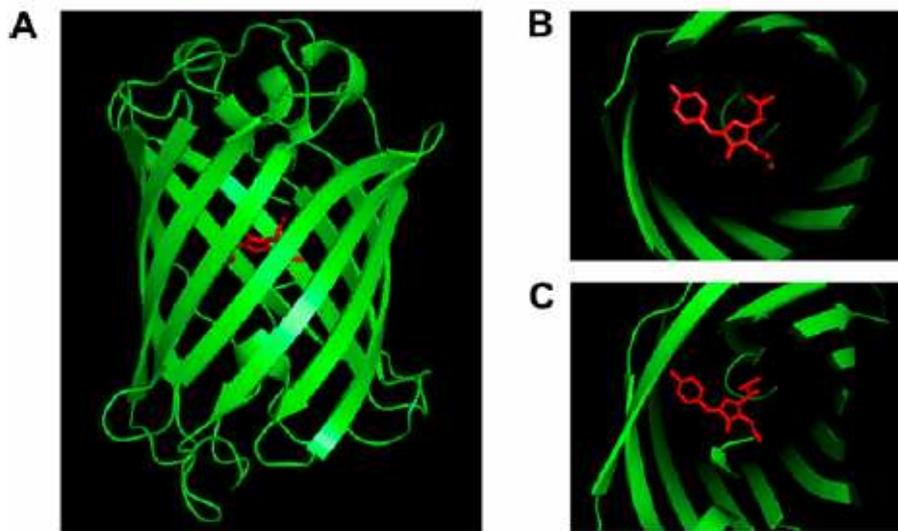


Figura V: A) Rappresentazione della struttura cristallografica della GFP *wild-type*. Il cromoforo al centro del β -barrel è rappresentato in rosso. B) Ingrandimento del cromoforo della GFP costituito dagli aminoacidi Ser65-Tyr66-Gly67. C) Il cromoforo si trova al centro di un α -elica che corre lungo l'asse centrale del β -barrel

Benché questo semplice motivo aminoacidico sia diffuso in natura, generalmente esso non dà luogo alla formazione di alcun cromoforo. La caratteristica che in questo caso rende fluorescente la proteina è la collocazione della tripletta peptidica al centro di un α -elica che corre lungo l'asse di un β -barrel particolarmente stabile costituito da 11 β -sheet (Figura V). All'interno dell'ambiente idrofobico al centro del β -barrel avviene una reazione di ciclizzazione ossidativa in due *step* successivi: prima una reazione tra il carbossile della Ser 65 e l'azoto amminico della Gly 67 (responsabile della formazione di un anello eterociclico imidazolin-5-one, Figura VI), poi un'ossidazione successiva provoca la coniugazione dell'anello imidazolinico con Tyr 66 e la formazione della specie fluorescente (100, 101, 210).

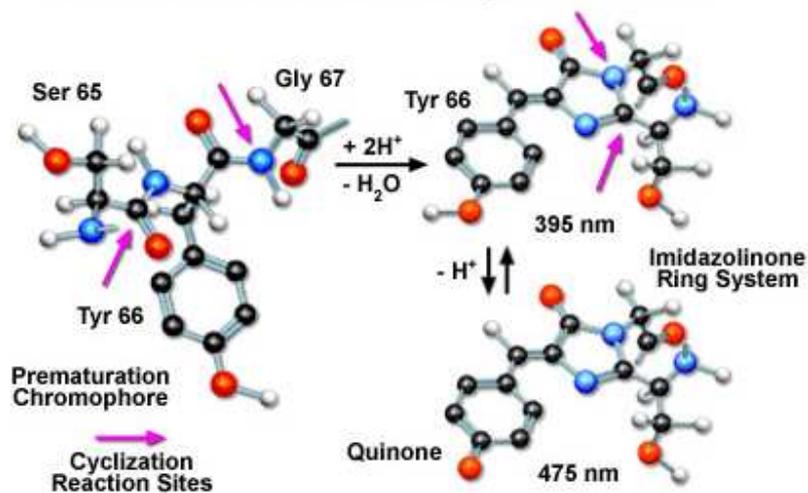


Figura VI: Maturazione del fluoroforo della GFP. Nella figura è rappresentato il processo di ciclizzazione ossidativa che porta alla maturazione del fluoroforo.

Il fluoroforo della GFP può esistere in due stati: la forma protonata è lo stato predominante e presenta un massimo dell'eccitazione a 395 nm, la forma non protonata assorbe invece approssimativamente a 475 nm. I picchi di emissione sono vicini e parzialmente sovrapposti, con

i massimi di emissione di fluorescenza rispettivamente alle lunghezze d'onda di 503 e 508 nm (102). Alcune delle caratteristiche della GFP hanno rilevanti implicazioni per il suo utilizzo come sonda. Le proprietà fotofisiche della GFP sono abbastanza complesse e la molecola può ospitare una quantità considerevole di modificazioni. La fluorescenza della GFP dipende fortemente dalla struttura molecolare che circonda il fluoroforo e le mutazioni di siti in prossimità del fluoroforo tripeptidico possono alterarne fortemente le proprietà.

Nel *wild-type* l'impaccamento dei residui aminoacidici all'interno del β -barrel è estremamente stabile e ciò permette una resa quantica (*quantum yield*) molto alta. Questa solida struttura proteica conferisce inoltre una certa resistenza alle fluttuazioni del pH, della temperatura nonché alla presenza di denaturanti. L'alto livello di stabilità viene generalmente compromesso da mutazioni che perturbano la fluorescenza e possono causare una riduzione del *quantum yield* ed una più elevata sensibilità alle condizioni ambientali.

Al fine di utilizzare le proteine fluorescenti in cellule di mammifero la GFP *wild-type* è stata sottoposta a diverse modifiche.

Il primo passaggio è stato l'ottimizzazione della formazione del fluoroforo a 37°C. La maturazione del fluoroforo *wild-type* è abbastanza efficiente a 28°C, ma lo è molto meno a 37°C e ciò riduce sostanzialmente la fluorescenza. La mutazione della Phe 64 in Leu permette una maturazione a 37°C equivalente a quella osservata a 28°C nel *wild-type* (103).

Per ottimizzare i codoni per l'espressione della GFP in cellule di mammifero sono state introdotte inoltre più di 190 mutazioni silenti nella sequenza codificante (104). E' stato anche introdotto un sito di inizio traduzione di Kozak contenente la sequenza A/GCCAT mediante l'inserzione di una Valina come secondo aminoacido. Queste ed altre modifiche sono comuni a tutte le sonde fluorescenti derivate dalla GFP *wild-type*.

Ulteriori mutazioni del fluoroforo o nelle regioni circostanti hanno portato all'isolamento di numerosi varianti spettrali, come le BFP, le CFP e le YFP (Blue, Cyan, Yellow Fluorescent Proteins) con massimi di eccitazione/emissione rispettivamente di 380/442 nm, 434/475 nm e 512/525 nm.

Altre modifiche hanno permesso lo sviluppo di proteine fluorescenti ancora più sofisticate, come le varianti fotoattivabili (79), le varianti *timer* (113) e le varianti che possono fungere da sensori fluorescenti che hanno aperto nuove applicazioni per la marcatura fluorescente *in vivo*, in studi di espressione, interazione, attività, movimento e *turnover* proteico, nonché per studi di funzione di organelli, studi di motilità cellulare ed infine per misure dirette di parametri cellulari (29).

1.6.3. APPLICAZIONI PASSIVE DELLE PROTEINE FLUORESCENTI

Per una gran parte delle applicazioni di *imaging* fluorescente il marcatore è un attore biologicamente inerte usato soltanto come marcatore visibile.

Data la natura delle strutture β -barrel che schermano il cromoforo dall'ambiente esterno, alcune FP sono adatte alle così dette applicazioni passive, quali il monitoraggio della sintesi, degradazione, localizzazione e traslocazione delle proteine *partner* alle quali vengono fuse.

Fluorescenza come *marker* spaziale

Forse la più popolare applicazione delle sonde fluorescenti è il loro uso come marcatori per rivelare il *pattern* spaziale statico-dinamico di vari componenti cellulari. Già nel 1995 la lista delle proteine fuse alle FP contava decine di esempi (105) ed oggi sono oramai migliaia.

Uno sviluppo interessante di queste applicazioni consiste, ad esempio, nella possibilità di identificare proteine sconosciute in base al proprio *pattern* di localizzazione subcellulare (106). Nelle così dette strategie “Protein Trap”, lo screening visuale delle cellule che contengono la sequenza codificante della proteina fluorescente fusa con i cDNA di una libreria viene usato per identificare le proteine che presentano il *pattern* di localizzazione di interesse. La sequenza di cDNA che codifica per ciascuna proteina *target* può essere poi isolata direttamente dal clone e quindi identificata.

Anche la localizzazione di molecole di mRNA può essere visualizzata fondendo una FP alla corrispondente RNA-binding protein (107, 108). Usando questo approccio è stato infatti visualizzato il movimento dell’mRNA codificato dal gene *bicoid* durante l’oogenesi di *Drosophila melanogaster*, attraverso l’uso di una FP fusa ad Exu, la proteina che accompagna l’mRNA di *bicoid* durante il trasporto nella parte anteriore dell’oocita di *Drosophila melanogaster* (109).

Fluorescenza come *marker* temporale

Visto che le FP sono autosufficienti nel formare il cromoforo e generare il segnale fluorescente (110), esse possono rappresentare per l’analisi dell’espressione genica un’alternativa alla β -galattosidasi (*lacZ*) come *marker* di espressione in sezioni di tessuto o in organismi transgenici.

L’impiego delle FP ha però come svantaggio rispetto al sistema enzimatico la mancanza di un sistema di amplificazione del segnale (laddove ogni singola FP possiede un solo cromoforo, ogni singola copia di β -lattamasi o galattosidasi o luciferasi (111) può amplificare il segnale agendo su molte molecole di substrato consentendo di rilevare più bassi livelli di espressione genica).

Una soluzione per superare questa limitazione consiste nell’indirizzare le FP verso un definito

sub-compartmento cellulare e dunque sfruttare il contrasto locale per distinguere il segnale fluorescente dall'autofluorescenza di *background*.

Per monitorare i *pattern* temporali di espressione genica e le dinamiche di sintesi, localizzazione e degradazione delle proteine sono stati sviluppati *reporter* di complessità crescente.

Una limitazione delle FP come marcatori passivi consiste nell'impossibilità di distinguere le proteine marcate neosintetizzate da quelle preesistenti, poiché il *label* fluorescente rimane tale fino a che la proteina non è degradata. L'emivita della proteina può essere però ridotta associando alla FP un dominio proteico in grado di promuoverne una più rapida degradazione.

Ad esempio fondendo la FP con un dominio derivato dall'ornitina decarbossilasi di topo (112) si ottiene un *label* fluorescente con un *turnover* aumentato e un'emivita di circa due ore. Queste FP varianti così destabilizzate minimizzano l'accumulo della fluorescenza di *background* normalmente generata dal debole livello basale di espressione presente anche senza induzione e permettono di estendere l'uso delle FP come *reporter* trascrizionali. Il costo di questa strategia è rappresentato dalla minore sensibilità, poiché per produrre un determinato livello di fluorescenza è necessario un maggiore livello di trascrizione e traduzione del gene in osservazione.

Un altro esempio dell'uso delle FP come marcatori temporali è rappresentato dall'impiego di una particolare versione della proteina fluorescente DsRed, isolata in coralli del genere *Discosoma* (113). Questa variante cambia la propria fluorescenza da verde a rossa dopo circa 24 ore dalla sintesi, poiché l'intermedio tipo-GFP verde accumulato viene convertito nella specie rossa grazie ad una successiva modificazione ossidativa del cromoforo. La storia temporale di attivazione del promotore viene quindi riflessa nel rapporto tra la fluorescenza verde e quella rossa. Poiché la scala temporale del cambiamento di fluorescenza è fissa e la risoluzione è limitata ad un numero elevato di ore, un sistema come questo potrebbe essere utile per le analisi dei geni che controllano lo sviluppo (113).

Un'altra tecnica consente di monitorare il traffico ed il *sorting* vescicolare lungo il percorso secretorio. Questa si basa su un mutante GFP sensibile alla temperatura che matura e si ripiega correttamente soltanto a temperature non permissive per gli eventi di *sorting*. Crescendo la cellule a questa temperatura, un numero significativo di GFP temperatura-sensibili si accumula nel *trans*-Golgi; aumentando la temperatura non è possibile il *folding* delle GFP temperatura-sensibili neo sintetizzate ma è consentito il *sorting* delle proteine già ripiegate. In tal modo è possibile monitorare il destino di questo gruppo di proteine fluorescenti. Questo approccio di tipo *pulse-chase* è stato recentemente impiegato per visualizzare le dinamiche dei granuli secretori immaturi che possono essere distinti dalla maggioranza di granuli secretori maturi (114).

1.6.4. APPLICAZIONI ATTIVE DELLE PROTEINE FLUORESCENTI: SENSORI BIOCHIMICI

Ad oggi sono numerosi gli sforzi volti allo sviluppo di sensori fluorescenti codificati geneticamente per la misura di diversi analiti come Ca^{+2} , Cl^- , I^- , metaboliti, e di parametri biochimici come il potenziale di membrana, il pH o l'attività di enzimi.

Questi sensori possono essere espressi all'interno di linee cellulari stabili (eventualmente in specifici organelli cellulari) od in animali transgenici (in specifici tessuti), espandendo in tal modo le possibilità di studiare la fisiologia cellulare e dello sviluppo, nonché la possibilità di effettuare *screening* in formato *high-throughput*. Gli attuali sensori codificati geneticamente e basati sulle proteine GFP possono essere suddivisi in tre categorie: sensori basati sulla FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), sensori chimerici (costituiti da una proteina fluorescente ed una *detector*) e sensori che utilizzano una singola FP (Figura VII).

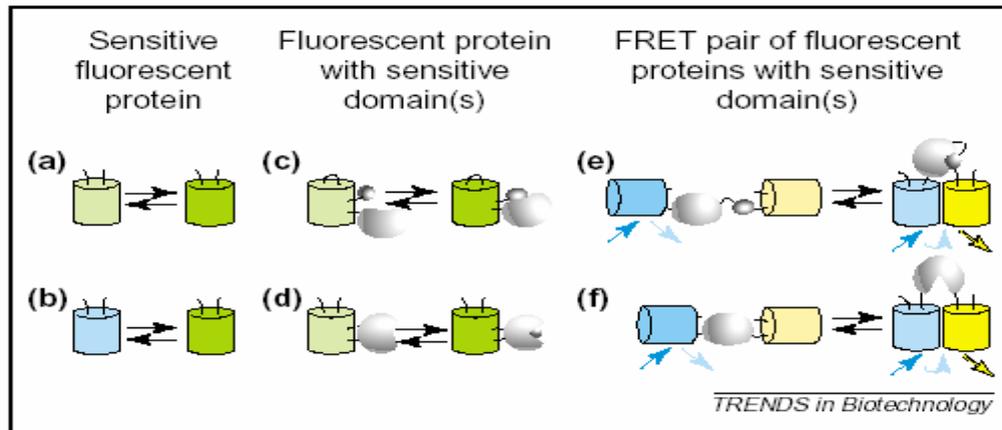


Figura VII: Tipologie principali di sensori basati sulle proteine fluorescenti.

Le proteine fluorescenti sono rappresentate come cilindri, i domini “sensore” come ovali. Sensori basati su singole proteine fluorescenti che rispondono modificando l’intensità (a) o il colore della fluorescenza emessa (b). Sensori basati su proteine fluorescenti permutate circolarmente fuse a domini sensore (c) o proteine fluorescenti chimeriche con un inserito un dominio sensore (d). Sensori basati sulla FRET tra due proteine fluorescenti fuse a uno o più domini sensore (e, f).

Sensori basati sull’*energy transfer*

I sensori basati sulla FRET sono sensori composti che necessitano della presenza di almeno due cromofori e la cui intensità di emissione di fluorescenza dipende da un processo di trasferimento dello stato eccitato tra gli stessi. La FRET è un fenomeno quantomeccanico che si verifica tra un donatore ed un accettore fluorescenti, posti sufficientemente vicini l’uno all’altro (20-60 Å), quando lo spettro di emissione del donatore è sovrapposto a quello di eccitazione dell’accettore. In queste condizioni l’energia si trasferisce dal donatore all’accettore con un’efficienza che dipende dalla distanza, dall’estensione della sovrapposizione spettrale e dall’orientamento spaziale dei cromofori. In questi costrutti i cambiamenti negli spettri di emissione di fluorescenza sono provocati dalle variazioni di efficienza di *energy transfer* all’interno di una coppia donatore–accettore di proteine fluorescenti. Infatti, in risposta al legame di un particolare ligando o in seguito a specifiche modificazioni, l’interazione dei due domini porta a cambiamenti

nell'orientazione spaziale e nella distanza tra le due FP che generano un visibile cambiamento negli spettri di emissione (Figura VII).

Nella FRET entrambi gli spettri di eccitazione devono essere ben separati per permettere emissioni indipendenti. Quando la stechiometria del donatore e dell'accettore è fissa, ossia quando sono fusi in un'unica catena polipeptidica, il parametro che conviene misurare sperimentalmente è il rapporto tra l'intensità di fluorescenza del donatore e dell'accettore.

Per esempio il sensore Cameleon, usato per misurare il Ca^{+2} intracellulare, è costituito da una proteina di fusione comprendente CFP-calmodulina-linker-YFP-M13, dove la CFP e la YFP sono la coppia di cromofori (rispettivamente Cyan Fluorescent Protein e Yellow Fluorescent Protein) mentre la calmodulina è una proteina che in presenza di Ca^{+2} si lega al peptide M13 consentendo l'energy transfer tra i cromofori e dunque una variazione rilevabile negli spettri di emissione (115, 116).

Se due cromofori sono legati tramite un dominio sensore capace di andare incontro ad una modifica conformazionale in seguito a fosforilazione da parte di specifiche Kinasi, provocando quindi una variazione della FRET, è possibile monitorare in continuo il bilanciamento delle attività kinasiche e fosfatasiche all'interno di singole cellule con una risoluzione spaziale e temporale molto superiore a quella dei saggi convenzionali con fosforo radioattivo o con anticorpi specifici (117, 118).

Saldando i due cromofori CFP e YFP mediante un peptide sensibile alle proteasi è invece possibile misurare l'attività caspatica durante l'apoptosi, inclusa l'attivazione della cascata a livello di singola cellula (119, 120).

In alternativa alle configurazioni esaminate in cui i due cromofori sono fusi in un unico polipeptide da un dominio sensore, fondendo le due FP a due proteine distinte la FRET

intermolecolare consente la misura delle interazioni tra i due *partner* polipeptidici, come ad esempio nella dissociazione delle proteine G (121).

Sono stati sviluppati altri sensori basati sulla FRET per la misura di numerosi analiti tra cui il cloruro (122), il maltosio (123), il glucosio (124, 125), il cGMP (165, 166) ed il cAMP (126).

L'uso di cromofori codificati geneticamente evita le procedure di marcatura *in vitro* con rodamina e fluorescina e di microiniezione nelle cellule dei coniugati (127).

Tuttavia una tra le più significative limitazioni d'impiego di questo gruppo di sensori basati sulla FRET è data dal loro basso *range* dinamico, ossia da un basso livello di contrasto nelle misure del rapporto tra picchi di emissione (2-6 volte) (128).

In molte situazioni, dunque, le sonde chimiche possono risultare ancora competitive, sia per screening *high-throughput* sia per misure su singole cellule, come nel caso dei sensori per il Ca^{+2} messi a confronto in cellule neuronali (129).

Sensori chimerici

Questi sensori sono costituiti da costrutti chimerici tra una singola proteina fluorescente ed un *detector* peptidico capace di rispondere con una variazione conformazionale al legame di un analita. Questa variazione conformazionale causa un riarrangiamento nella proteina fluorescente ed un'alterazione delle sue proprietà spettrali.

I sensori chimerici possono essere costruiti combinando una FP con una proteina *detector full-length* o con un motivo peptidico più corto. In uno degli esempi meglio caratterizzati la calmodulina (CaM) viene inserita in luogo della Tyr 145 della YFP: ciò provoca un aumento di circa 7 volte della fluorescenza in seguito al legame del Ca^{+2} (99, 130). Questi sensori, noti come Camgaros, si sono dimostrati utili per l'*imaging* del Ca^{+2} nei mitocondri (131) e nel cervello di *Drosophila melanogaster* (132).

Una importante variazione topologica consiste nell'inserire il dominio *detector* in una FP permutata circolarmente: il C-term e l'N-term originali della FP vengono legati con un *linker* flessibile e dei nuovi C ed N-terms vengono appositamente generati in una delle possibili posizioni vicine al cromoforo. Queste permutazioni aumentano la flessibilità e la responsività ottica agli *stress* conformazionali applicati, facilitando la trasmissione di variazioni conformazionali nell'intorno del cromoforo [per esempio sensori Pericam (133), sensori per l'attività MAPKinasica (134)].

Altri sensori chimerici rispondono a variazioni di potenziale di membrana. Per esempio il sensore Flash è generato inserendo la GFP in un mutante non funzionale per un canale del K^+ potenziale-dipendente (135, 136); un altro è ottenuto inserendo la GFP *wild-type* in un canale per il Na^+ .

Tra i sensori per ioni, un esempio interessante è costituito dalla chimera ottenuta fondendo proprio le due proteine del sistema di bioluminescenza di *Aequorea victoria*, ossia la GFP e la fotoproteina Ca^{+2} -sensibile Aequorina (137).

Sensori costituiti da una singola Proteina Fluorescente

Ingegnerizzando le FP è possibile renderle direttamente sensibili a diversi parametri, tramite l'introduzione di specifiche mutazioni puntiformi nel cromoforo o in prossimità di questo o nella struttura β -barrel. Si vengono così a creare siti di legame o di *sensing* per analiti o altri parametri biochimici che conseguentemente modulano la fluorescenza emessa. Ad esempio è stata dimostrata la possibilità di rendere alcune varianti della GFP o della YFP sensibili ai potenziali redox intracellulari tiolo-disolfuro, ponendo due residui cisteinici su due β -strand adiacenti in maniera da consentire la formazione di un legame intramolecolare. L'ossidazione reversibile dei

due residui e la formazione del legame disolfuro riduce la fluorescenza del sensore basato sulla YFP di circa due volte (138). In alternativa, nel sensore basato sulla GFP, il legame disolfuro provoca uno *shift* di uno dei picchi, modificando il rapporto di eccitazione di 6-8 volte (139). Questi sensori potrebbero consentire indagini sulla dinamica o l'eterogeneità dei potenziali redox in diversi compartimenti cellulari.

Tra i tentativi di sviluppo dei sensori sulle FP per ioni di interesse, possiamo citare anche una variante del BFP (Blue Fluorescent Protein) ingegnerizzata tramite mutazioni puntiformi per legare lo Zn^{+2} presso il cromoforo (140). Tuttavia la variazione di fluorescenza non particolarmente elevata (circa 2 volte) ed il *rate* di associazione piuttosto lento ($t_{1/2}$ di circa 4 h) rendono necessari numerosi miglioramenti perché la sonda risulti biologicamente utile.

Sono inoltre state individuate alcune varianti della GFP particolarmente sensibili alle variazioni di pH: questi mutanti possono essere utilizzati per misurare il pH in diversi compartimenti cellulari (141, 142), sia mediante modulazione dell'intensità di fluorescenza, sia mediante misure dei rapporti tra picchi di emissione (*ratiometric measurement*). Questi sensori, fusi a proteine di membrana, sono stati utilizzati per monitorare l'esocitosi ed il riciclo delle vescicole per la secrezione dei neurotrasmettitori simpatici: queste "synapto-pHluorins" riportano infatti la secrezione dei neurotrasmettitori rispondendo alla brusca variazione di pH quando l'interno della vescicola (a pH circa 5) viene esposto all'esterno della cellula (pH circa 7) in seguito alla fusione con la membrana plasmatica (142).

Infine, nel caso di alcune varianti della YFP, proprio tra quelle utili nella misura del pH citoplasmatico o della matrice mitocondriale (143), ossia con una pK_a piuttosto elevata (*range* tra 7-8), sono stati individuati e sviluppati mutanti la cui fluorescenza risponde alla concentrazione di alogeni ed altri anioni.

1.6.5. LA YFP COME SENSORE DI ANIONI

Le YFP (Yellow Fluorescent Proteins) sono state derivate dalle GFP nel 1996 sostituendo la Thr 203 con aminoacidi aromatici come la Tyr. Questa famiglia di proteine fluorescenti è stata creata proprio dopo che la struttura cristallografica della GFP aveva rivelato la vicinanza della Thr 203 al cromoforo (100). La mutazione di questo residuo in Tyr consente di stabilizzare lo stato eccitato del cromoforo grazie ad un'interazione π - π tra gli anelli aromatici, aumentandone così la polarizzabilità e causando nello spettro di eccitazione ed in quello di emissione uno spostamento di 20 nm verso lunghezze d'onda più lunghe (*red shift*) (144).

Le prime due generazioni di YFP sono esemplificate dai mutanti S65G/S72A/T203Y (115) e S65G/V68L/S72A/T203Y (100), dove la Thr 203 è responsabile del *red shift* mentre le altre tre mutazioni determinano un miglioramento nell'intensità di fluorescenza della YFP espressa in cellule eucariotiche (103). Si tratta di esempi di mutanti ottenuti tramite tecniche di ingegneria proteica razionale; visto che la sostituzione T203Y richiede ben tre variazioni a livello nucleotidico questa variante difficilmente avrebbe potuto essere isolata con protocolli di mutagenesi *random* (144). Tra le proteine fluorescenti ottenute da *Aequorea victoria* questa YFP è quella con spettro di emissione maggiormente spostato verso il rosso e, come precedentemente riportato, è stata spesso utilizzata come partner della CFP (Cyan Fluorescent Protein) in esperimenti basati sulla FRET (145, 146).

La sostituzione T203Y, oltre allo spostamento verso il rosso provoca, anche altre variazioni strutturali, ossia variazioni nei legami idrogeno interni e, per l'ingombro sterico, piccoli spostamenti delle catene laterali vicine e del *backbone* stesso. Tali variazioni hanno fatto emergere nuove proprietà quali la sensibilità al pH ed alla concentrazione di anioni (147, 148).

Proprietà spettrali e strutturali della YFP

La YFP, come la GFP, presenta due massimi di assorbimento il cui rapporto relativo di intensità è pH-dipendente. Il picco intorno a 392 nm è associato alla forma neutra del cromofoforo, mentre il picco a circa 514 nm nello spettro visibile è associato alla forma anionica del cromofoforo (149).

La YFP emette un'intensa fluorescenza quando viene eccitata nella banda di lunghezze d'onda a minor energia, con un massimo di emissione intorno a 528 nm. La fluorescenza emessa quando l'eccitazione avviene alla lunghezza d'onda più corta è invece estremamente debole, anche se l'esperimento viene condotto ad un valore di pH in cui domina la forma neutra del cromofoforo (144).

Nella GFP le forme ionizzata e non del cromofoforo coesistono in un *range* di pH da 6 a 10, poiché si stabilisce un equilibrio interno in cui un protone viene condiviso tra il fenolato del cromofoforo ed il carbossilato del Glu 222 situato in prossimità dell'eterociclo (150, 82, 167). A valori di pH fisiologici il Glu 222 risulta protonato, mentre nel cromofoforo prevale la forma anionica (pK_a 5.9).

Anche la YFP presenta un pK_a tra 5.2-5.4 ed il Glu 222 è probabilmente protonato (100, 151). Tuttavia nella YFP, come in molte altre varianti, la stabilità di questo equilibrio protonico interno risulta alterata e lo stato del cromofoforo viene ad essere fortemente influenzato dall'intorno (147). In particolare nella YFP la pK_a del cromofoforo mostra una forte dipendenza dalla concentrazione di alcuni anioni, come ad esempio il cloruro (151), la pK_a aumenta infatti da 5.2 a 7 in presenza di NaCl 140 mM (152). L'interazione con l'alogenuro provoca uno *shift* della pK_a , quindi una variazione dell'equilibrio tra la forma neutra e ionizzata del cromofoforo e dunque della fluorescenza (Figura VIII).

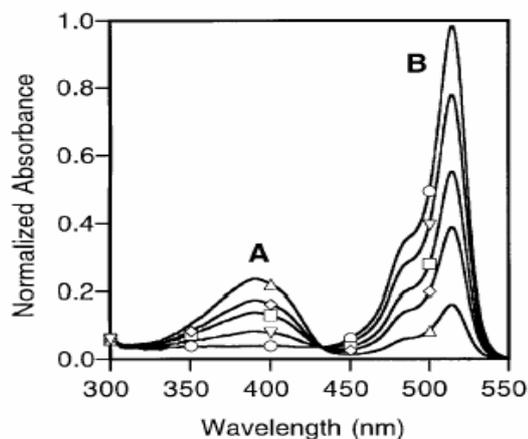


Figura VIII: Scansione dell'assorbanza della YFP al variare della concentrazione di Cloruro a pH costante pari a 6.4.

La banda A corrisponde alla forma neutra del cromoforo ($\lambda_{\text{max}} = 392 \text{ nm}$), la banda B corrisponde alla forma anionica del cromoforo ($\lambda_{\text{max}} = 514 \text{ nm}$). (-○-) 0 mM Cl, (-▽-) 50 mM Cl, (-□-) 50 mM Cl, (-◇-) 100 mM Cl, (-△-) 400 mM Cl.

E' proprio la sostituzione T203Y a rendere possibile l'interazione con un anione come il cloruro, principalmente attraverso due meccanismi; la Tyr 203 con il proprio ingombro sterico favorisce la formazione di una cavità che può allargarsi per accogliere un anione e stabilizza direttamente la presenza dell'anione tramite un legame idrogeno.

I dati cristallografici mostrano che con la formazione del legame idrogeno tra la Tyr 203 e l'anione anche il cromoforo si sposta verso l'anione e di conseguenza il gruppo carbossilato del Glu 222 ruota lontano dall'azoto dell'anello aromatico del cromoforo. In questo modo si forma un nuovo saldo legame idrogeno con la Ser 205 e si ha una variazione della pK_a (Figura IX).

Da un'analisi mutazionale della YFP risulta che la reversione della Tyr 203 nella Thr 203 *wild-type* provoca una notevole perdita nell'energia di legame con l'anione. Questo decremento, stimato in circa 2 Kcal/Mole, è compatibile con l'energia di un singolo legame idrogeno (153).

Nella struttura cristallografica della GFP-S65G/V68L/S72A/T203Y/H148Q (indicata per brevità anche come YFP-H148Q) legante uno ione ioduro la Tyr 203 forma chiaramente un legame idrogeno con l'alogeno (153).

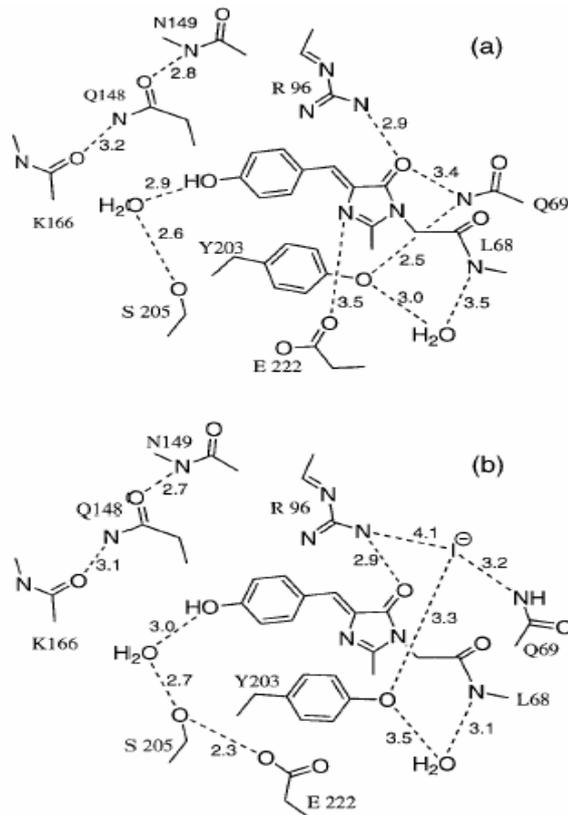


Figura IX: Diagramma schematico degli aminoacidi in prossimità del cromoforo nella struttura dell'apoproteina (a) e nella proteina legata a un alogeno (b).

In assenza della Tyr 203 si osserva una larga cavità, adiacente alla posizione 65 ed al cromoforo, riempita da diverse molecole di solvente (100, 101).

Di principio anche queste molecole di acqua potrebbero fornire il potenziale per un legame idrogeno con un vicino anione, tuttavia nella GFP *wild-type* non si osserva alcun legame con anioni. E' stato proposto che il dipolo fenolico della Tyr 203 non sia il solo responsabile del legame. Lo *stress* sterico dovuto all'introduzione della catena laterale piuttosto ingombrante della Tyr 203 potrebbe facilitare infatti l'espansione del β -barrel e le altre variazioni

La cavità ha una natura anfifilica con una zona ricca di gruppi polari e carichi (Tyr 203, cromoforo, Arg 96, Gln 69, Gln 183), mentre il lato opposto contiene residui idrofobici (Ile 152, Leu 201, Val 163, Val 150, Phe 165): questo permette un'interazione favorevole con anioni grandi e facilmente polarizzabili, come ad esempio lo ioduro. In effetti nelle YFP si riscontrano numerose somiglianze con i siti di legame per alogenuri presenti in altre proteine, ossia legami idrogeno mediati da gruppi ammidici ed idrossilici, interazioni con gruppi di Arg, Lys o His (presenti specialmente in siti di legame per il cloruro) (155, 156), nonché interazioni di Van der Waals con residui apolari (157).

Volume della cavità, flessibilità del β -barrel e legame dell'anione

Il legame dell'anione non è una semplice funzione del volume della cavità. La piccola cavità interna presso il cromoforo, che nelle varianti YFP può essere occupata da un anione, è stata osservata anche in numerose strutture cristallografiche di varianti della GFP che non contengono anioni legati. In tali strutture la cavità vuota non varia molto nelle dimensioni, né nella posizione. Calcolando il volume di Van der Waals accessibile ad una sfera con un raggio di 1.2 Å, la GFP *wild-type* presenta un volume di 21 Å³ (150), 10 Å³ la GFP S65T (100), 16 Å³ la YFP e la YFP-H148G (144).

Visto che solo nelle YFP si osserva il legame con anioni (151), chiaramente la dimensione e la posizione della cavità della apoproteina non è correlata direttamente con la forza di legame. La cavità nell'apoproteina è troppo piccola per ospitare ioni come Cl⁻, Br⁻, o I⁻ che hanno raggi di Van der Waals tra 24.8 e 54 Å³. In tutte le varianti YFP sono perciò necessarie modifiche conformazionali, non consentite nelle GFP, per accomodare uno qualsiasi di questi anioni.

Le sostituzioni che influenzano la flessibilità strutturale del β -barrel in diverse YFP possono quindi modificare l'affinità e la selettività per gli anioni (ordine relativo nella forza di legame). La YFP-H148Q, ad esempio, presenta una cavità più grande ed estesa verso il cromoforo rispetto alla YFP, grazie a piccoli spostamenti del cromoforo e delle catene laterali degli aminoacidi che formano la cavità. La maggiore dimensione della cavità di YFP-H148Q potrebbe in parte giustificare la più elevata affinità di questa variante per un anione particolarmente voluminoso come lo ioduro (153).

Legame con l'anione e stato di protonazione del cromoforo

La forte dipendenza della pK_a del cromoforo (e quindi della fluorescenza) dal legame ad un anione può essere descritta tramite un equilibrio accoppiato che consideri le interazioni tra due diversi ligandi: l'anione, che si lega presso l'estremità imidazolinonica del cromoforo adiacente all'Arg 96, ed il protone, che si lega all'estremità fenolica dello stesso.

L'analisi cristallografica della YFP-H148Q indica la presenza di un singolo sito di legame rilevante per l'anione (153), mentre un coefficiente di Hill prossimo all'unità nella titolazione del pH in presenza o assenza di cloruro fornisce l'evidenza di un singolo evento di protonazione (148). La costante di legame dell'anione viene quindi influenzata dal livello di protonazione e viceversa: il legame è cioè cooperativo, dal momento che il legame dell'anione facilita la protonazione del cromoforo aumentandone la pK_a .

La correlazione tra il legame dell'anione e la protonazione del cromoforo può essere anche spiegata con considerazioni elettrostatiche: l'anione si trova a 4.3 Å dall'ossigeno carbonilico dell'eterociclo del cromoforo e poiché una struttura di risonanza del cromoforo in forma anionica

pone la carica negativa sull'ossigeno carbonilico dell'imidazolinone (Figura XI) si ha un'interazione di carica sfavorevole e quindi viene promossa la protonazione del cromoforo.

La forma anionica del cromoforo viene così destabilizzata e la pK_a si sposta verso valori maggiori.

Questo effetto osservato nella YFP è analogo a quello causato dal cloruro in alcuni pigmenti visivi dei conici (156), come per esempio nel pigmento visivo Gecko P521 (158).

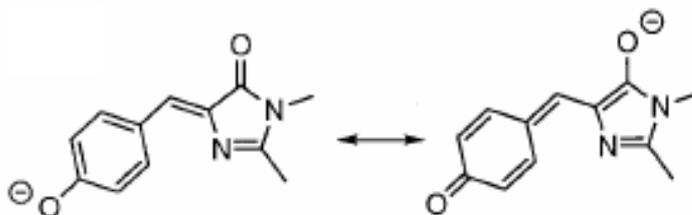


Figura XI: Diagramma delle due principali strutture di risonanza del cromoforo in forma anionica.

Affinità e selettività per i diversi anioni: ruolo dell'energia di deidratazione

In generale i piccoli anioni monovalenti tendono ad interagire con la YFP con costanti di legame dell'ordine del mM (2-100mM). Non può essere identificata per questa interazione una preferenza nella forma dell'anione, dal momento che molecole lineari triatomiche (es. tiocianato), molecole planari quadrate (es. perclorato), molecole trigonali (es. nitrito) e sferiche (es. alogeni) possono comunque modulare la pK_a del cromoforo (153). Dal momento che le

costanti di legame cadono nello stesso *range* e sono ordinate secondo l'energia di idratazione, si può assumere che queste molecole condividano lo stesso sito di legame. Gli anioni bivalenti, come il fosfato ed il solfato, o gli anioni monovalenti più grandi, come il gluconato, non sembrano interagire con la YFP o alterarne la pK_a (153).

La forza relativa di legame degli anioni per la YFP-H148Q (148) in rapporto alle loro energie di idratazione indica che queste ultime danno un contributo importante alla stabilità del legame: il legame dell'anione nella cavità richiede infatti la sostituzione delle interazione ione-solvente con interazioni ione-proteina. Nella seguente serie di anioni le energie di idratazione sono ordinate da deboli a forti: $CO_4^- < I^- < NO_3^- < SCN^- < Br^- < Cl^- < F^-$ (159): il *trend* osservato per il legame degli anioni alle varianti YFP segue grossolanamente questa serie.

I monoanioni poliatomici e lo ioduro hanno energie di idratazione relativamente deboli, mentre gli altri alogeni interagiscono con più forza con l'acqua. Nel caso degli alogeni l'energia di idratazione diminuisce al crescere del volume atomico e ciò spiega perché gli alogeni più grandi si leghino più facilmente all'ambiente idrofobico nell'interno della proteina.

Un altro fattore che contribuisce alla selettività nel legame anionico può essere la configurazione elettrostatica degli anioni poliatomici, dove la carica negativa delocalizzata su diversi atomi può migliorare le interazioni tramite la coordinazione a diversi gruppi della proteina.

Infine può essere rilevante anche la dimensione dell'anione, vista la posizione poco accessibile della cavità di legame.

Le proprietà di specifiche varianti

Come già detto, l'ordine di affinità delle varianti YFP per il legame con anioni monovalenti è correlato alla serie liotropica riscontrata spesso anche in altre proteine leganti alogeni, come i canali per il Cl^- (159). Un anione con un'energia di deidratazione minore, come lo ioduro, risulta

quindi favorito rispetto al cloruro (283 vs 347 KJ/Mole). Tuttavia singole sostituzioni aminoacidiche possono spostare significativamente l'affinità della particolare variante YFP per un alogeno in termini di valore assoluto, nonché la selettività relativa per un anione rispetto all'altro (Tabella II).

Tabella II: Costanti di dissociazione per il legame dello ioduro e del cloruro alle proteine YFP ed ai suoi revertanti.

Variant	Substitutions	K_1 (mM) ^a for Cl ⁻	K_1 (mM) ^a for I ⁻	pK _a ^b
YFP	S65G/V68L/S72A/T203Y	4.69 (0.17)	2.46 (0.11)	5.4
Revertant 1	S65G/S72A/T203Y	13.2 (0.34)	3.04 (0.11)	5.8
YFP-H148Q	S65G/V68L/S72A/H148Q/T203Y	28.4 (5.1)	2.68 (0.11)	6.7
YFP-H148G	S65G/V68L/S72A/H148G/T203Y	82.8 (18.3)	15.73 (2.6)	7.5
Revertant 2	S65G/V68L/S72A	153 (26)	117 (16)	6.4

^a A lower estimate of the standard deviation (as reported by Kaleidagraph[®]) is given in parenthesis.
^b The chromophore pK_a determined by absorbance in the absence of any interfering anions, such as chloride (buffered with either Hepes or Pipes, 150 mM gluconate).

Allo stesso modo è possibile modificare la pK_a della variante. Diverse varianti descritte presentano quindi le particolari caratteristiche di affinità, selettività e pK_a che ne consentono un utilizzo come sonde adatte alla misura del pH o del Cl⁻ o dello I⁻ intracellulare.

Ad esempio nella variante YFP-H148G la sostituzione dell'His 148 con una Gly crea un'apertura nel β-barrel e la formazione di un canale accessibile al solvente direttamente in contatto col cromoforo. Inoltre il legame idrogeno diretto tra l'His 148 e l'estremità fenolica del cromoforo viene rimosso: l'ossigeno fenolico forma un legame idrogeno con una molecola di acqua legata, a sua volta in contatto con le molecole di solvente esterne. Questa sostituzione provoca un sensibile aumento della pK_a, rendendolo simile a quello del cromoforo nella proteina denaturata (pK_a = 7.5 in assenza di anioni interferenti e pari ad 8 in presenza di Cl⁻ 140 mM). Contemporaneamente questa variante presenta un'affinità per il cloruro non particolarmente elevata (K_{Cl} = 82 mM) (144). Queste caratteristiche la rendono adatta per misure di pH in

organelli basici, come ad esempio nei mitocondri, seppur in presenza di concentrazioni fisiologiche di cloruro. Varianti con una pK_a inferiore si sono invece dimostrate utili nella misura del pH citoplasmatico (147).

La variante YFP-H148Q, rispetto alla YFP-H148G sopra descritta, presenta una minore accessibilità del solvente al cromoforo (153), una pK_a inferiore ed una maggiore affinità per gli alogeni. In particolare presenta una sensibilità relativamente alta al cloruro e ioduro a valori di pH citoplasmatici (148). Ciò è stato evidenziato tramite studi biofisici e cellulari volti a verificarne la possibilità di impiego per lo studio dell'attivazione e del trasporto mediato dal canale CFTR. La risposta della YFP-H148Q consente misure quantitative del trasporto di Cl^- (148) e rappresenta un'alternativa ai marcatori organici "quinolinium-type" sensibili al Cl^- (160, 161). Dal momento che questa variante lega lo ioduro con affinità 10 volte superiore, la YFP-H148Q è stata impiegata come sonda per monitorare lo scambio cloruro-ioduro mediato dal CFTR in cellule 3T3 coesprimenti il canale e la sonda (148). Un saggio funzionale quantitativo basato su questa variante è stato proposto per lo *screening* in formato *high-throughput* di potenziali modulatori della permeabilità agli alogeni del CFTR (162). Tramite lo *screening* di una libreria di mutanti ottenuti a partire dalle YFP-H148Q, mediante sostituzione *random* di coppie di aminoacidi in prossimità del sito di legame per gli alogeni, sono state isolate delle varianti con migliorate caratteristiche di sensibilità e selettività verso gli alogeni (163). Ad esempio la YFP-H148Q/V163S presenta un'insolita serie di selettività ($Cl^- < NO_3^- < I^- < Br^-$), ossia una sensibilità al cloruro maggiore che allo ioduro, probabilmente a causa dell'ambiente più idrofilico presente nella cavità di legame dell'anione. Poiché presenta un K_d per il cloruro inferiore al precursore YFP-H148Q, questa variante può essere considerata adatta come sonda per la concentrazione di cloruro.

Infine la variante YFP-H148Q/I152L mostra un'affinità ed una selettività per lo ioduro estremamente elevata rispetto a quella per il cloruro. L'aumento di affinità per lo ioduro ottenuto nella I152L è probabilmente causato da un effetto sterico, dove una piccola variazione nella dimensione della tasca di legame consente di accomodare più facilmente un anione ingombrante come lo ioduro (163). Le due varianti YFP-H148Q e H148Q/I152L sono state entrambe impiegate per misurare lo scambio I^-/Cl^- tramite il canale CFTR (162, 163, 148), ma l'alta affinità della seconda per lo ioduro ed una selettività 40 volte maggiore per lo ioduro rispetto al cloruro ($K_I = 1.9 \text{ mM}$ e $K_{Cl} = 85 \text{ mM}$ a pH 7.4) la rendono interessante come sensore del trasporto di ioduro mediato dal NIS in cellule tiroidee pur in presenza di contrazioni fisiologiche di cloruro (164).

CAPITOLO II

PERCORSO

SPERIMENTALE

Per la messa a punto del saggio si sono ottenute e manipolate opportune linee cellulari che coesprimessero in coltura i trasportatori per lo ioduro endogeni o ricombinanti insieme al sensore fluorescente derivato dalla YFP (Yellow Fluorescent Protein).

Come principale modello sperimentale sono state scelte le cellule FRTL-5 (Fischer Rat Thyroid cells). Le cellule FRTL-5 presentano espressione endogena sia del NIS (Sodium Iodide Symporter) che della Pendrina ed inoltre sono state estensivamente utilizzate per caratterizzare le cinetiche di *uptake* di ioduro mediante traccianti radioattivi o *voltage clamp* (168, 169, 170, 27).

Per la validazione del nuovo metodo sono stati eseguiti numerosi *test* funzionali al fine identificare il trasporto di ioduro non radioattivo mediato da NIS in cellule FRTL-5 rese fluorescenti con YFP-H148Q/I152L. I criteri funzionali saggiati comprendono *test* di risposta a concentrazioni di ioduro extracellulare nel *range* del micromolare (con costruzione di una curva di dose-risposta allo ioduro e determinazione della K_m), l'inibizione specifica del NIS mediante perclorato, la dipendenza del trasporto dal gradiente di Na^+ , la dipendenza dell'espressione del NIS dall'ormone TSH. Sono state eseguite valutazioni circa la riproducibilità dei *test* su singole cellule o su cloni. Il metodo è stato ulteriormente validato in cellule COS-7 (African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells) cotrasfettate con YFP \pm -NIS per confermare la specificità delle variazioni di fluorescenza indotte dal trasporto di ioduro tramite il NIS.

In estratti ottenuti da *E. coli* la YFP-H148Q/I152L è sensibile al pH ed alla concentrazione alogenuri. Quindi per quantificare l'*uptake* di ioduro nelle cellule in cui è presente il NIS, ossia per esprimere le variazioni di fluorescenza osservate in seguito all'esposizione a ioduro extracellulare in termini di concentrazione intracellulare di ioduro, è necessario analizzare i parametri che possono influenzare le misure di trasporto di ioduro con YFP-H148Q/I152L. La sensibilità della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L al pH ed allo ioduro è stata misurata *in*

vitro (in lisati di tireociti che esprimono YFP-H148Q/I152L) per confrontarla con le misure effettuate in estratti ottenuti da *E. coli* (163), quindi è stata misurata “*in vivo*” (ossia in tireociti integri opportunamente e selettivamente permeabilizzati) per tenere conto anche della presenza del cloruro, della particolare matrice (citoplasma cellulare) e del sistema di espressione (cellule di mammifero).

Sono state quindi costruite le curve di calibrazione della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L al variare del pH e alternativamente del cloruro intracellulare; sono state infine realizzate le curve di calibrazione della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L al variare della concentrazione di ioduro intracellulare a diversi valori di pH e in presenza di differenti concentrazioni di cloruro. E' stato stimato con metodi diversi il pH ed il cloruro intracellulare (pH_i , $[Cl^-]_i$).

Tutti questi dati sono infatti necessari per esprimere le variazioni di fluorescenza nelle cellule, in seguito all'esposizione a ioduro, in termini di concentrazione intracellulare e dunque per calcolare la reale capacità delle cellule analizzate di concentrare e ritenere lo ioduro al loro interno.

Le variazioni del pH e del cloruro intracellulari possono alterare l'affinità della YFP-H148Q/I152L per lo ioduro. La conoscenza degli effetti del pH e del cloruro intracellulari sulla risposta allo ioduro della YFP-H148Q/I152L riveste quindi una particolare importanza per escludere eventuali falsi positivi qualora si valuti la possibilità di convertire il saggio in un formato *high-throughput* per lo *screening* di librerie combinatoriali di composti organici capaci di modulare il trasporto di ioduro.

Il saggio a fluorescenza basato sulla sonda YFP-H148Q/I152L è stato poi utilizzato per studiare le proprietà di trasporto del NIS. In particolare è risultato possibile indagare un aspetto che tramite altre tecniche (*patch clamp*, radioisotopi) non risulta chiaramente risolto. Tale aspetto

riguarda possibilità che le ghiandole tiroidea e mammaria trasportino e concentrino anche il perclorato nei follicoli tiroidei e nel latte materno tramite il NIS.

Il perclorato risulta essere il più potente inibitore competitivo del NIS ($K_i = 2 \mu\text{M}$) e può interferire con la sintesi degli ormoni tiroidei riducendo la biodisponibilità dello ioduro. Il perclorato, utilizzato in numerose applicazioni industriali, è un contaminante diffuso nelle acque potabili e nelle derrate alimentari. Le evidenze circa il trasporto mediato dal NIS sono ad ora contraddittorie ed indirette: in esperimenti di *patch clamp* non si rileva passaggio di corrente mediato da NIS in seguito a esposizione a perclorato (il modello corrente prevede che NIS cotrasporti due ioni Na^+ per ogni anione), mentre il latte materno oltre allo ioduro pare contenere anche questo anione. La variante YFP- H148Q/I152L espressa nei tireociti è stata testata per la sensibilità alla presenza di perclorato. Si è poi cercato di utilizzare il saggio sviluppato anche per la misura del trasporto di perclorato. Per approfondire le proprietà funzionali del NIS circa l'interazione con questo agente antitiroideo, sono stati eseguiti numerosi esperimenti su cellule tiroidee FRTL-5 e su cellule COS-7 trasfettate con NIS.

CAPITOLO III

MATERIALI E

METODI

3.1. COLTURE CELLULARI

Le cellule FRTL-5 (Fischer Rat Thyroid cells), donate da F. Curcio e S. Ambesi-Impiombato dell'Università di Udine, sono state coltivate in terreno Coon's modified F12, addizionato di siero di vitello al 5%, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 µg/ml ed un mix di 6 ormoni (6H) contenete insulina 1 µg/ml, idrocortisone 3.6 ng/ml, apotranseferrina 5 µg/ml, glicina-L-istidina-L-lisina acetato 10 ng/ml, somatostatina 10 ng/ml e TSH 1 mU/ml.

Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera al 5% CO₂. I passaggi delle cellule FRTL-5 sono stati effettuati nella soluzione "CTC", contenete collagenasi 20 U/ml, tripsina 0.75 mg/ml e siero di pollo al 2% dializzato in HBSS (Hanks' buffered salt solution) priva di Ca⁺² e di Mg⁺².

Le cellule COS-7, donate da S. Ferroni dell'Università di Bologna, sono state cresciute in terreno DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10%, penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg/ml. I passaggi delle cellule COS-7 sono stati effettuati in una soluzione contenete 0.05% di tripsina-EDTA.

3.2. TRASFEZIONE

Il vettore pcDNA3.1, contenete la sequenza codificante di YFP-H148Q/I152L (pcDNA3.1-YFP-H148Q/I152L), è stato donato da A. Verkman (University of California) ed il vettore pcDNA contenete le sequenza codificante *full-length* di hNIS, è stato donato da S. Jhiang (Ohio State University).

La sequenza di hNIS è stata subclonata nel vettore pcDNA3.1/Zeo in corrispondenza dei siti *KpnI/XbaI* e si è generato il costrutto pcDNA3.1/Zeo-hNIS.

Le cellule FRTL-5, cresciute in piastre da 24 pozzetti, sono state trasfettate con pcDNA3.1-YFP-H148Q/I152L 0.8 µg/pozzetto utilizzando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) nel rapporto di 4 µl di liposoma a 1 µg di DNA. I cloni delle cellule FRTL-5 che esprimono in modo stabile la proteina fluorescente sono stati selezionati prima tramite crescita in terreno contenente l'antibiotico G418 500 µg/ml per due settimane, poi con diluizioni limite delle cellule sopravvissute.

Le cellule COS-7 sono state invece cotrasfettate con pcDNA3.1-YFP-H148Q/I152L e pcDNA3.1/Zeo-hNIS o alternativamente col vettore pcDNA3.1/Zeo vuoto.

Per la trasfezione transiente le cellule COS-7 sono state cresciute in piastre a 6 pozzetti, contenuti vetrini coprioggetto rotondi da 25 mm.

La doppia trasfezione transiente è stata condotta con 0.5 mg di ciascun plasmide (1mg/pozzetto totale) e Fugene (Stratagene) in rapporto 3 µl : 1 µg. Le misure di fluorescenza sono state effettuate 48-72 h dopo la trasfezione transiente.

3.3. MISURE DI FLUORESCENZA NELLE CELLULE CHE ESPRIMONO YFP-H148Q/I152L

L'intensità di fluorescenza è stata monitorata costantemente con un microscopio invertito Zeiss Axiovert 200, dotato di una lampada ad arco allo xeno XBO da 75W ed un set di filtri XF104-2 YFP per l'eccitazione a 500 +/- 12.5 nm e l'emissione a 545 +/- 17.5 nm (Omega Optical, USA/Crisel Instruments, Italy). La fluorescenza delle cellule YFP-H148Q/I152L è stata osservata con un obiettivo 40x adatto all'immersione in olio. Le immagini sono state acquisite ogni 10 s, per intervalli di tempo di 100 ms ciascuno. Per acquisire le immagini è stata utilizzata una camera Coolsnap HQ CCD (Roper Scientific) e per processarle è stato impiegato il software Metafluor (Universal Imaging, USA/Crisel Instrument, Italy).

Le cellule sono state cresciute su vetrini coprioggetto rotondi da 25 mm di diametro montati in una camera per *imaging* a controllo termostatico (Water Instruments) mantenuta a 36.5°C-37°C.

Le cellule sono state costantemente perfuse con 4-5 ml/min di PBS (phosphate-buffered saline) composto da NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 0.7 mM, MgCl₂ 1.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM e glucosio 10 mM (pH 7.4).

Le cellule sono state esposte a concentrazioni di I⁻ variabili da 1 μM a 100 mM, sostituendo le relative quantità di NaCl con quantità equimolari di NaI (mantenendo sempre una concentrazione di totale di NaCl e NaI pari a 137 mM). Anche in cellule esposte a ClO₄⁻ le relative quantità di NaCl sono state sostituite con quantità equimolari di NaClO₄⁻.

L'effetto del *buffer* senza cloruro sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è stato valutato sostituendo tutti i sali di Cl⁻ presenti nel PBS con sali di gluconato.

Per analizzare l'effetto del Na⁺ extracellulare sui cambiamenti di fluorescenza indotti da I⁻, da Cl⁻ e da ClO₄⁻, gli esperimenti sono stati condotti in HBS (salina tamponata con HEPES, composta da NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0.7 mM, MgCl₂ 1.1 mM, HEPES 10 mM e glucosio 10 mM, pH 7.4). Sono state preparate soluzioni HBS contenenti Na⁺ 5-10 mM, sostituendo l'NaCl con quantità equimolari di colina cloruro.

L'effetto del pH sulla fluorescenza di YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 è stato determinato esponendo le cellule ad una soluzione ad alta concentrazione di K⁺ (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, CaCl₂ 0.7 mM) con pH tra 6.5 e 7.5, in presenza di nigericina 7 μM e valinomicina 5 μM.

3.4. ANALISI DELLA FLUORESCENZA CELLULARE

Generalmente le misure dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L sono state effettuate su gruppi di 20-100 cellule FRTL-5 e di 5-15 cellule COS-7. Queste misure esprimono quindi l'intensità media di tutte le cellule fluorescenti presenti nella regione di interesse selezionata.

La variabilità da cellula a cellula è stata stimata selezionando 50 cellule singole, all'interno di un gruppo rappresentativo di cellule.

La misura della fluorescenza di *background*, valutata su un'area del vetrino senza cellule, è stata sottratta dalla fluorescenza cellulare ed è inferiore al 10% della fluorescenza totale (fluorescenza media del *background* 8.7 \pm 0.5%, n = 45).

L'autofluorescenza delle cellule non trasfettate con YFP-H148Q/I152L è risultata trascurabile rispetto a quella dello vetrino stesso. Il foto-decadimento della fluorescenza intracellulare della YFP-H148Q/I152L causato dalla luce di eccitazione segue un andamento esponenziale. L'esposizione alla luce di eccitazione provoca un decremento della fluorescenza intracellulare della YFP-H148Q/I152L. In particolare, con periodi di esposizione di 100 ms ogni 10 s, è stato osservato un decadimento esponenziale a singola fase della fluorescenza con una costante di decadimento media pari a 0.0033 \pm 0.0003 min⁻¹ (n = 45). Per correggere questo effetto, i valori dell'intensità di fluorescenza a riposo (F_0) in assenza di perturbazioni (per es. Γ , ClO₄⁻) sono stati sottoposti a regressione non lineare con una curva di decadimento esponenziale a una fase in modo da ottenere la curva teorica di F_0 per ogni istante temporale.

I valori dell'intensità di fluorescenza (F) durante l'esposizione a Γ (o ClO₄⁻) sono quindi stati normalizzati rispetto ad F_0 per ottenere una misura di fluorescenza relativa (RF) per ogni istante temporale ($RF(t) = F(t)/F_0(t)$). Le variazioni di fluorescenza indotte da Γ (o ClO₄⁻) sono espresse

in termini di velocità massima di decremento della fluorescenza ($\Delta RF/\Delta t$) e decremento della fluorescenza in prossimità dell'equilibrio misurato dopo 5 min dall'esposizione a Γ (o ClO_4^-) ($\Delta RF_{5\text{min}}$). Entrambi sono valori negativi riflettono una diminuzione della fluorescenza, ma sono stati riportati nei grafici in valore assoluto. $\Delta RF/\Delta t$ è stata stimata come la pendenza iniziale (massima pendenza) della curva che rappresenta la migliore regressione non lineare (tra una curva di decadimento esponenziale ad una fase ed una a due fasi) delle variazioni di fluorescenza relativa (RF) indotte da Γ o ClO_4^- . La dipendenza dalla concentrazione delle variazioni di fluorescenza indotte da Γ sono state analizzate con una regressione non lineare, utilizzando un'equazione di Hill bifasica:

$$Y = Y_{\min} + (\alpha_H(Y_{\max} - Y_{\min})/(1 + (K_H/[I^-])^{nH})) + (1 - \alpha_H)(Y_{\max} - Y_{\min})/(1 + (K_L/[I^-])^{nL})$$

dove Y è la risposta in termini di $\Delta RF/\Delta t$;

Y_{\min} e Y_{\max} sono rispettivamente la massima e la minima risposta;

K_H e K_L sono le costanti di affinità per le componenti ad alta e bassa affinità della risposta (definite come le concentrazioni di Γ extracellulare capaci di produrre metà della risposta massima);

nH e nL sono i coefficienti di Hill per le componenti ad alta e bassa affinità della risposta;

α_H è la frazione della risposta mediata dalla componente ad alta affinità.

Similmente per il ClO_4^- è stata utilizzata un'equazione di Hill monofasica ($\alpha_H = 1$).

Le regressioni e le altre analisi sono state eseguite con Prism4 (GraphPad Software).

3.5. SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L IN SOLUZIONE ALLO I⁻ ED AL pH

La sensibilità della YFP-H148Q/I152L allo I⁻ ed al pH è stata determinata in una soluzione derivata da un lisato di tireociti. Le cellule FRTL-5 che esprimono YFP-H148Q/I152L sono state cresciute in fiasche da 150 cm² (10-20x10⁶ cellule/fiasca), quindi tripsinizzate e centrifugate a 1500 rpm. Le cellule così raccolte sono state lisate tramite risospensione in 100 µl di HEPES 10 mM e due cicli di congelamento/scongelamento.

Il lisato è stato centrifugato a 12000 rpm ed è stato raccolto il sovrinatante. Le aliquote di sovrinatante da 12 µl ciascuna (gocce) contenenti la YFP-H148Q/I152L sono state depositate su un vetrino e le immagini fluorescenti sono state acquisite con un obiettivo 10x (in modo che comprendessero almeno il 90% della superficie delle gocce).

La sensibilità al pH della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è stata determinata portando il pH del sovrinatante a diversi valori con l'aggiunta di NaOH (concentrazione di Na⁺ finale < 3 mM).

L'intensità di fluorescenza a ciascun valore di pH è stata normalizzata con quella misurata a pH 7.0 e la pK_a (valore di pH a cui l'intensità di fluorescenza è pari a ½ del valore massimo) è stata ricavata tramite regressione non lineare con una sigmoide.

La sensibilità allo I⁻ è stata determinata aggiungendo 0-100 mM di NaI o quantità equivalenti di sodio gluconato al sovrinatante, mantenendo la concentrazione totale di Na⁺ pari a 137 mM (NaI più sodio gluconato).

L'intensità di fluorescenza in presenza di I⁻ è stata normalizzata con quella rilevata in assenza di I⁻ ed assumendo che lo I⁻ interagisca con un singolo sito di legame, i dati ricavati sono stati inseriti nell'equazione:

$$Y = 1 - a [I]/(K_I + [I])$$

dove **Y** è la fluorescenza relativa in presenza di I^- ;

a è la massima diminuzione nella fluorescenza relativa prodotta da alte concentrazioni di I^- ;

K_I è la concentrazione di I^- in grado di produrre metà della diminuzione massima della fluorescenza.

3.6. MISURE DI pH_i CON BCECF: pH_i A RIPOSO, EFFETTO DEL *BUFFER* PRIVO DI Cl^- , EFFETTO DI I^- E ClO_4^- 1 mM SUL pH_i

Nelle cellule FRTL-5 il pH_i è stato misurato con il microscopio a fluorescenza e con BCECF. Le cellule che non esprimevano YFP-H148Q/I152L sono state incubate con 10 μ M del precursore BCECF-AM addizionato al terreno di coltura per 45 min. Successivamente le cellule sono state lavate e mantenute nel terreno di coltura per altri 20 min, in modo da permettere l'idrolisi della BCECF-AM. La fluorescenza è stata monitorata con lo stesso *set* di filtri usati per la YFP (eccitazione 500 +/- 12.5 nm; emissione 545 +/- 17.5 nm). Le cellule sono state osservate con un obiettivo 20x e le immagini sono state acquisite per periodo di 200 ms ogni 10 s. I cambiamenti nella fluorescenza sono stati valutati in relazione alla fluorescenza a riposo che, in assenza di specifiche manipolazioni, resta stabile per almeno 30 min.

Per le misure di pH_i a riposo, le cellule sono state perfuse con PBS e la fluorescenza misurata è stata confrontata con quella della curva di calibrazione del pH ottenuta esponendo le cellule ad

una soluzione ad alta concentrazione di K^+ (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, $CaCl_2$ 0.7 mM, pH 6.5-8.0) contenete nigericina 7 μ M e valinomicina 5 μ M.

L'effetto del buffer senza cloruro sul pH_i a riposo è stato valutato sostituendo tutti i sali di Cl^- presenti nel PBS con sali di gluconato e misurando l'effetto della sostituzione sulla fluorescenza del BCECF.

L'effetto dello I^- sul pH_i è stato determinato sostituendo parte del NaCl nel PBS con una quantità equimolare di NaI e misurando l'effetto sulla fluorescenza del BCECF.

L'effetto del ClO_4^- sul pH_i è stato determinato sostituendo parte del NaCl nel PBS con una quantità equimolare di $NaClO_4$ e misurando l'effetto sulla fluorescenza del BCECF.

La sensibilità al pH del BCECF in tireociti integri selettivamente permeabilizzati è stata determinata esponendo le cellule a soluzioni con alte concentrazioni di K^+ (HEPES 10 mM, KCL 130 mM, $CaCl_2$ 0.7 μ M) a pH 6.5–8.0 in presenza degli ionofori nigericina 7 μ M e valinomicina 5 μ M che consentono il rapido equilibrio tra ioni H^+ e K^+ intra ed extra cellulari.

La pK_a è stata determinata utilizzando l'equazione:

$$F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) / (1 + 10^{nH(pK_a - pH)})$$

dove **F** è la fluorescenza normalizzata;

F_{\min} e **F_{\max}** sono rispettivamente il minimo e il massimo valore di F;

nH è il coefficiente di Hill.

La fluorescenza ad ogni valore di pH è stata normalizzata rispetto alla fluorescenza del BCECF a pH 7.0.

3.7. CALIBRAZIONI INTRACELLULARI DELLA FLUORESCENZA DI YFP-H148Q/I152L

Le calibrazioni intracellulari della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 sono state effettuate permeabilizzando selettivamente le cellule. Gli ionofori impiegati consentono infatti il controllo selettivo della concentrazione intracellulare di specifici ioni. Sono stati utilizzati: la nigericina (ionoforo per K^+/H^+), la valinomicina (ionoforo per K^+) ed il tributilstagno (TBT, ionoforo per alogenuri/ OH^-/ClO_4^-). La nigericina, che è necessaria per equilibrare il pH intracellulare con quello esterno, permeabilizza le cellule anche al K^+ , quindi, per evitare movimenti netti di questo ione, è necessario utilizzare un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ . La valinomicina facilita il raggiungimento dell'equilibrio tra K^+ esterno ed interno.

La dipendenza dal pH della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è stata determinata esponendo le cellule ad una soluzione ad alta concentrazione di K^+ (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, $CaCl_2$ 0.7 mM) a pH 5.5-8.5 in presenza di nigericina (5 μ M) e valinomicina (5 μ M). La fluorescenza ad ogni valore di pH è stata normalizzata rispetto alla fluorescenza a pH 7.0. La pK_a è stata determinata utilizzando l'equazione:

$$F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) / (1 + 10^{nH(pK_a - pH)})$$

dove **F** è la fluorescenza normalizzata;

F_{min} e **F_{max}** sono rispettivamente il minimo e il massimo valore di F;

nH è il coefficiente di Hill.

La sensibilità della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L agli alogenuri ed al ClO_4^- è stata determinata esponendo le cellule ad una soluzione ad alta concentrazione di K^+ (HEPES 10 mM,

potassio gluconato 130 mM, calcio gluconato 0.7 mM) a pH 5.5-8.5 in presenza di nigericina 5 μM , valinomicina 5 μM e tributilstagno 10 μM .

Ogni specifica concentrazione di Cl^- (tra 5 e 130 mM) è stata ottenuta tramite la sostituzione isotonica di potassio gluconato con potassio cloruro equimolare, mantenendo la concentrazione totale di K^+ a 130 mM (potassio gluconato più potassio cloruro). Concentrazioni più alte di Cl^- sono state raggiunte in condizioni ipertoniche.

Ogni specifica concentrazione di I^- (tra 1 e 130 mM) è stata ottenuta tramite la sostituzione isotonica di potassio gluconato con potassio ioduro equimolare, mantenendo la concentrazione totale di K^+ a 130 mM.

Ogni specifica concentrazione di ClO_4^- (tra 1 e 130 mM) è stata ottenuta tramite la sostituzione isotonica di potassio gluconato con potassio perclorato equimolare, mantenendo la concentrazione totale di K^+ 130 mM. La fluorescenza al variare della concentrazione di Cl^- , I^- , ClO_4^- è stata normalizzata rispetto alla fluorescenza in assenza del particolare anione in analisi.

L'effetto del pH sulle curve di sensibilità agli alogenuri della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è stato determinato modificando il pH della soluzione ad elevata concentrazione di K^+ , fino ad ottenere i valori desiderati di pH nel *range* fisiologico intracellulare (pH 6.8-7.4).

Le curve di calibrazione per lo ioduro a pH 7.0 (in presenza di concentrazioni costanti di Cl^- 0, 15, 50 mM) e la curva di calibrazione del ClO_4^- (a pH 7.0 e con cloruro costante 15 mM) sono state ottenute sostituendo parte del potassio gluconato con un'opportuna quantità equimolare di KCl.

Le costanti di affinità (K_X) della YFP-H148Q/I152L per gli alogenuri e per il perclorato (K_{Cl} per il cloruro, K_{I} per lo ioduro, K_{ClO_4} per il perclorato,) sono state determinate, assumendo che gli anioni interagiscano con un singolo sito di legame, tramite l'equazione:

$$F = F_{\max} - (F_{\max} - F_{\min}) / (1 + 10^{nH (\log K_x - \log [X])})$$

dove **F** è la fluorescenza normalizzata che viene osservata ad una data concentrazione di anione [X⁻];

F_{min} è il valore di **F** a concentrazioni saturanti di [X⁻];

F_{max} è il valore di **F** in assenza di [X⁻] ed è pari a 1;

nH è il coefficiente di Hill.

L'esposizione al sistema di perfusione al tributilstagno (TBT) ha causato una contaminazione significativa che non è stato possibile rimuovere attraverso lavaggi in H₂O ed ha pertanto determinato l'accumulo di un residuo di TBT da un esperimento all'altro. Per gli esperimenti di calibrazione degli alogenuri si è assunto che il TBT fosse presente in tutti gli esperimenti, anche nelle fasi iniziali di *set-up* in cui le cellule sono state mantenute in PBS. La contaminazione residua da TBT ha determinato un abbassamento della fluorescenza in PBS, presumibilmente in seguito all'aumento della permeabilità della membrana cellulare al cloruro. Dopo aver eseguito tutti gli esperimenti con il TBT, il sistema di perfusione è stato lavato accuratamente con etanolo (il solvente del TBT) e tutti i componenti rimpiazzabili sono stati sostituiti.

CAPITOLO IV

RISULTATI

4.1. SVILUPPO DEL SAGGIO A FLUORESCENZA: IDENTIFICAZIONE DEL TRASPORTO DI I⁻ MEDIATO DAL NIS

Questa prima sezione tratta lo sviluppo del saggio cellulare a fluorescenza per il trasporto di I⁻.

Gli obiettivi degli esperimenti descritti in questa prima parte sono i seguenti:

- Verificare la possibilità di utilizzare la variante YFP-H148Q/I152L sensibile alla concentrazione di I⁻ come biosensore per il trasporto di I⁻ in cellule tiroidee;
- Verificare la possibilità di effettuare misure di trasporto riproducibili ed in tempo reale in gruppi di cellule o in cellule singole;
- Validare il metodo mediante *test* funzionali specifici per identificare il trasporto di I⁻ mediato dal NIS (Sodium-Iodide Symporter), ossia costruire una curva dose-risposta allo I⁻ e determinarne la K_m, verificare l'inibizione specifica del trasporto con ClO₄⁻, verificare la dipendenza del trasporto dal gradiente di Na⁺ e dall'azione dell'ormone TSH (Thyroid-Stimulating Hormone);
- Verificare il metodo in un modello cellulare non tiroideo, ovvero in cellule COS-7 che esprimono YFP-H148Q/I152L trasfettate o meno con NIS;
- Escludere eventuali effetti indiretti dello I⁻ extracellulare sulla fluorescenza cellulare mediati da alterazioni del pH (a conferma dell'interazione diretta tra la sonda YFP-H148Q/I152L e lo I⁻ nel citoplasma).

4.1.1. EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A I^- SULLA FLUORESCENZA DELLE CELLULE FRTL-5

Un clone di cellule FRTL-5 (Fischer Rat Thyroid cells) selezionato per l'espressione stabile della proteina fluorescente YFP-H148Q/I152L è stato esposto sotto perfusione ad una concentrazione di I^- extracellulare pari a 100 μ M (Figure 1, 3). Lo I^- ha provocato un rapido decremento della fluorescenza cellulare a partire da 10 secondi dall'esposizione. La fluorescenza ha raggiunto un livello prossimo all'equilibrio in 5-10 minuti.

Il decremento della fluorescenza è risultato reversibile, con un recupero completo della fluorescenza iniziale entro 10 minuti dalla rimozione dello I^- extracellulare.

Le variazioni di fluorescenza indotte da I^- sono risultate riproducibili all'interno di uno stesso esperimento: tre applicazioni consecutive di I^- hanno provocato risposte simili (Figura 2).

L'aggiunta di I^- direttamente alla YFP-H148Q/I152L in soluzione (ottenuta da un lisato di cellule FRTL-5) ha soppresso la fluorescenza con un costante $t_{1/2} < 1s$, suggerendo che la velocità di diminuzione della fluorescenza nelle cellule intatte non è limitata dalla velocità di legame di I^- alla YFP-H148Q/I152L (non mostrato in figura).

La variabilità tra cellula e cellula nelle risposte indotte da I^- (100 μ M) è stata stimata misurando le variazioni di fluorescenza in 50 cellule singole selezionate a caso all'interno di una popolazione clonale di cellule FRTL-5 (Figura 3A-3D).

La risposta indotta da I^- nelle singole cellule risulta essere variabile da cellula a cellula sia in termini di massima velocità di decremento della fluorescenza ($\Delta RF/\Delta t$) che di decremento raggiunto dopo 5 minuti di esposizione a I^- (ΔRF_{5min}), ossia in prossimità dello *steady-state*.

Nessuno dei due parametri risulta correlato con l'intensità iniziale (a riposo) della fluorescenza delle singole cellule (Figura 3E), suggerendo che la variabilità da cellula a cellula nella risposta

indotta dallo Γ è indipendente dalle differenze nel livello di espressione della YFP-H148Q/I152L in cellule diverse.

Al contrario è stata osservata una correlazione significativa tra la $\Delta RF/\Delta t$ e la $\Delta RF_{5\text{min}}$ ($p < 0.001$, $R^2 = 0.59$) (Figura 3F), suggerendo che le differenze tra cellula e cellula nella velocità di influsso di Γ e nella concentrazione intracellulare di Γ raggiunta si muovono in parallelo.

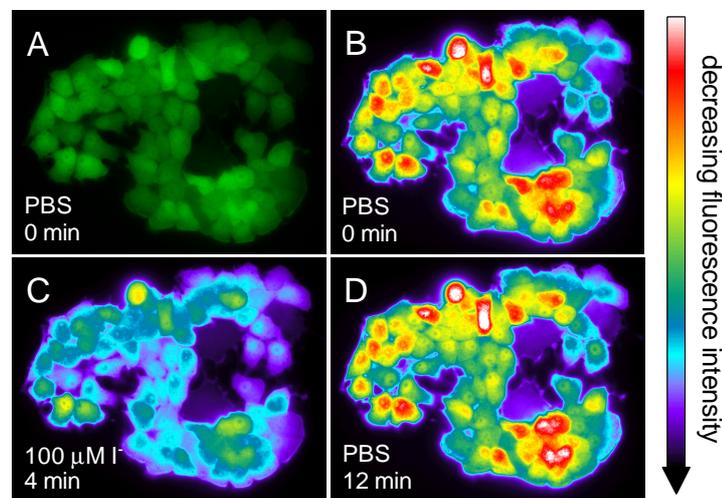


Figura 1: Fluorescenza delle cellule FRTL-5 che esprimono YFP-H148Q/I152L esposte a Γ extracellulare.

Le immagini mostrano le cellule mantenute in PBS (A e B); in presenza di Γ extracellulare 100 μM dopo 4 minuti (C), e dopo il recupero della fluorescenza in PBS per 12 minuti (D). Nel pannello A, la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è monocromatica (verde), nei pannelli B C e D l'intensità di fluorescenza è stata rappresentata in pseudocolori, dove il bianco corrisponde alla massima intensità di fluorescenza e il nero alla minima intensità.

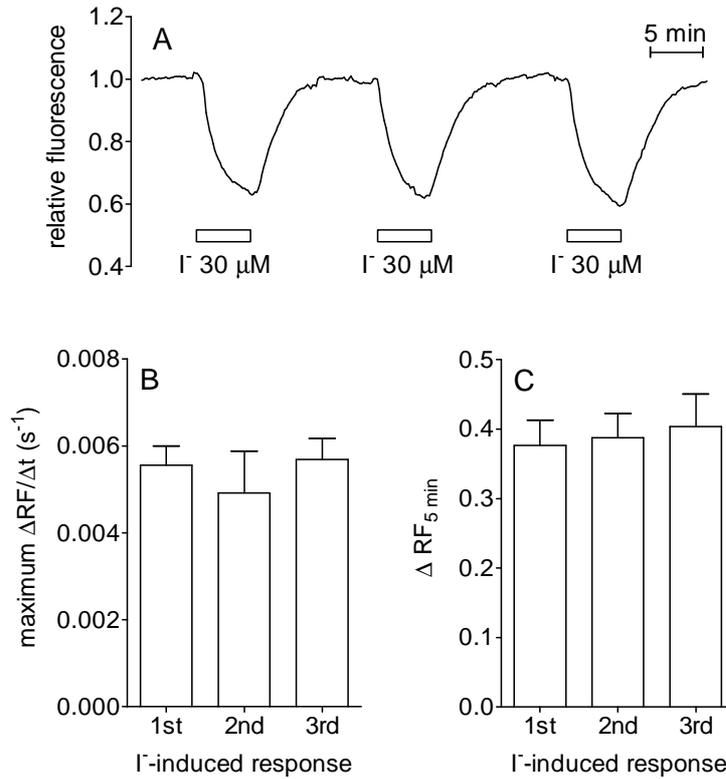


Figura 2: Riproducibilità delle variazioni indotte dallo I^- nella fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL- 5.

Un gruppo di cellule è stato esposto a I^- extracellulare 30 μ M e l'intensità di fluorescenza è stata monitorata. La linea continua mostra un tracciato rappresentativo di un gruppo di cellule sottoposto a tre applicazioni consecutive di I^- (A). La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale a riposo (relative fluorescence).

Per la prima, la seconda e la terza risposta consecutiva indotte dall'esposizione a I^- sono state calcolate la velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta RF/\Delta t$) (B) ed il decremento di fluorescenza vicino allo *steady-state* ($\Delta RF_{5 \text{ min}}$) (C). Le barre rappresentano la media \pm errore *standard* in $n = 3$ esperimenti indipendenti. Le differenze tra le risposte consecutive non sono risultate significative.

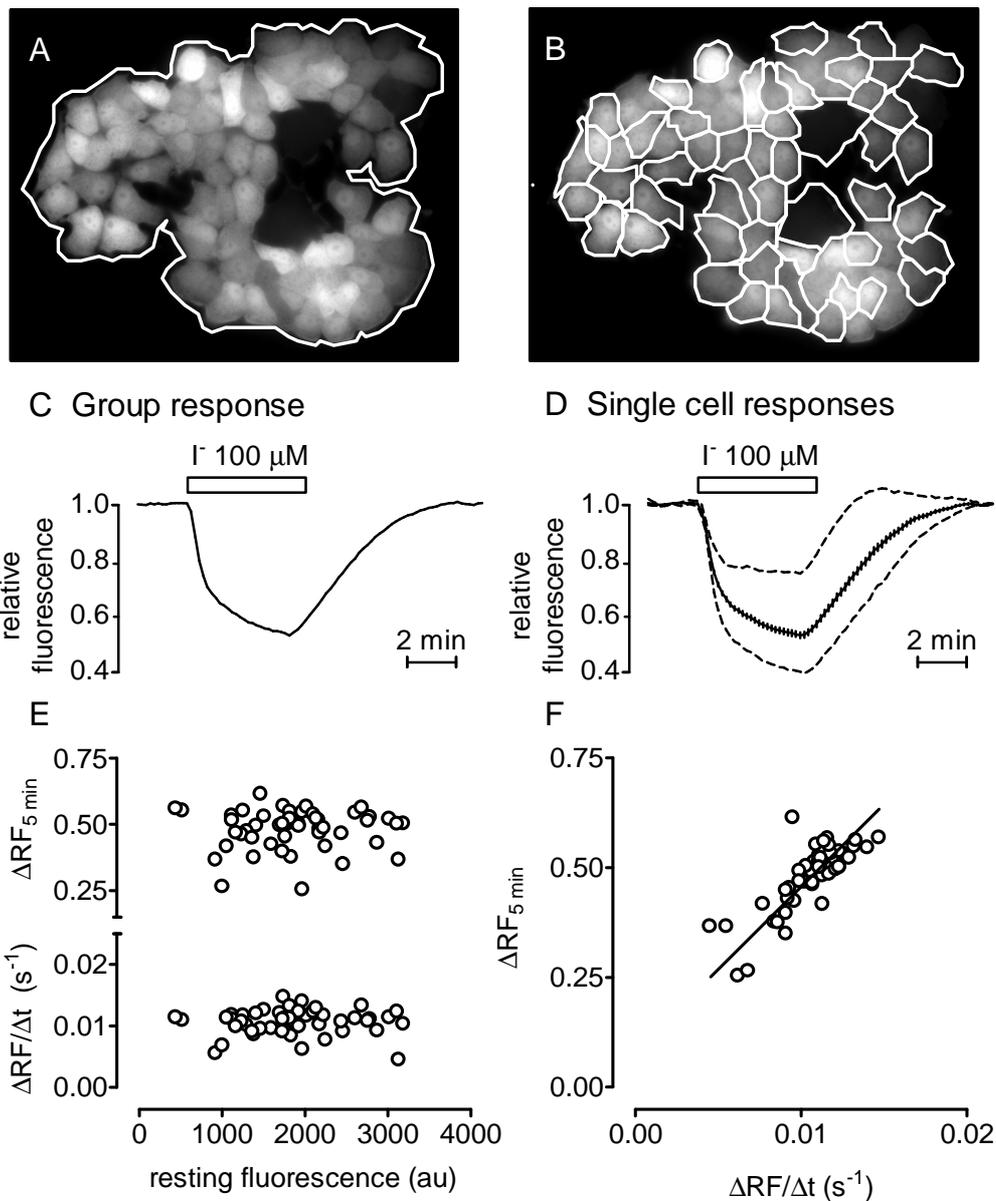


Figura 3: Quantificazione dei cambiamenti indotti dallo I^- nella fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5.

Le cellule sono state esposte a I^- extracellulare $100 \mu\text{M}$ e l'intensità di fluorescenza è stata monitorata all'interno delle regioni di interesse selezionate. Le regioni selezionate comprendono o l'intero gruppo di cellule (A e C) o 50 cellule singole all'interno del gruppo (B e D). La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (Relative Fluorescence).

Nel pannello D, la linea continua rappresenta la risposta media delle 50 cellule con le barre di errore verticali (Errore *Standard*), le linee tratteggiate rappresentano invece la più grande e la più piccola risposta delle singole cellule a I^- . L'intensità della fluorescenza a riposo (resting fluorescence) delle singole cellule non è risultata correlata con la velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta t$) o con il decremento di fluorescenza vicino allo *steady-state* ($\Delta\text{RF}_{5\text{min}}$) indotti dallo I^- (pannello E). Al contrario, è risultata significativa la correlazione tra $\Delta\text{RF}/\Delta t$ e $\Delta\text{RF}_{5\text{min}}$ (pannello F). In E ed in F, i simboli rappresentano le risposte delle singole cellule e la linea rappresenta una retta di regressione di Deming. (au) = unità di misura arbitraria.

4.1.2. CRITERI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEL NIS IN CELLULE FRTL-5

Dipendenza dalla concentrazione di I^-

Lo I^- ha provocato una diminuzione consistente della fluorescenza in cellule FRTL-5 a concentrazioni extracellulari comprese tra 3 μ M e 100 mM; alla concentrazione di 1 μ M ha provocato una risposta in 4 esperimenti su 7 (Figura 4A). La velocità massima di decremento della fluorescenza ha mostrato una dipendenza bifasica dalla concentrazione di I^- , con costanti ad alta e a bassa affinità rispettivamente di 35 μ M e >1 mM rispettivamente (Figura 4B).

Sensibilità al ClO_4^- , inibitore competitivo del NIS

Il ClO_4^- ha inibito le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte da I^- in cellule FRTL-5 (Figura 5). Il pre-trattamento delle cellule con ClO_4^- per 5 minuti ha provocato un'inibizione del 97% e del 91% della velocità massima di decremento della fluorescenza indotta da I^- rispettivamente 35 μ M e 1mM. Inoltre, l'aggiunta di ClO_4^- alle cellule 5 minuti dopo l'inizio dell'esposizione allo I^- ha provocato la reversione della risposta indotta dallo I^- , con un ripristino dei livelli basali (a riposo) della fluorescenza.

Il ClO_4^- stesso ha provocato un piccolo decremento reversibile della fluorescenza a riposo, con una riduzione del 2-5% alla concentrazione di 50 μ M e del 5-10% alla concentrazione di 1 mM.

Dipendenza dal Na^+ Extracellulare

I cambiamenti indotti da I^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 sono risultati dipendenti dalla presenza di Na^+ extracellulare. Una riduzione della concentrazione di Na^+ nel mezzo extracellulare da 145 mM a 10 mM (Figura 6) ha causato una inibizione della

velocità massima di diminuzione della fluorescenza indotta da I^- 30 μ M e 1 mM rispettivamente del 95% e del 85%.

Regolazione del TSH

Le cellule FRTL-5 vengono generalmente cresciute in un medium contenente 1mU/ml di TSH.

Per esaminare l'effetto della rimozione del TSH, le cellule sono state prima seminate in un medium contenente TSH, dove hanno potuto aderire ed iniziare a replicarsi per 2-4 giorni, quindi sono state divise in due colture parallele mantenute per altri 7 giorni in un medium contenente TSH oppure nel medium privo dell'ormone.

La crescita nel medium privo di TSH ha causato un'inibizione della velocità massima di diminuzione della fluorescenza indotta da I^- 100 μ M e 10 mM rispettivamente del 97% e del 90% (Figura 7).

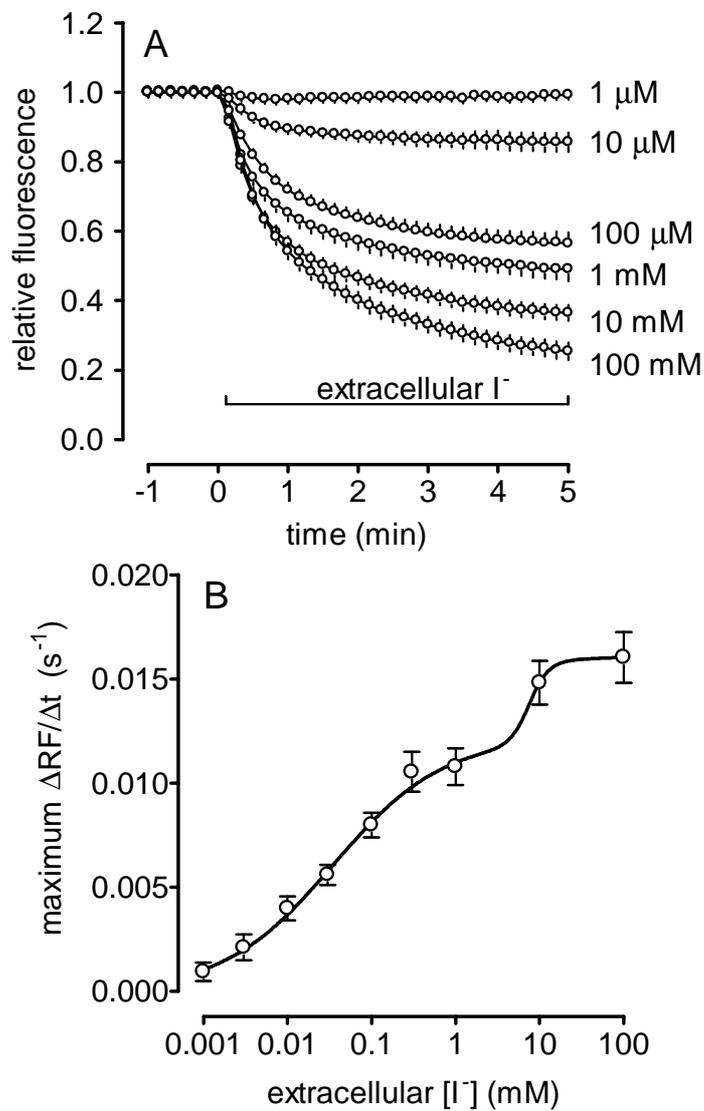


Figura 4: Relazione tra la concentrazione di I⁻ e le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5.

(A) Effetto di I⁻ 1μM-100mM sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale a riposo (Relative Fluorescence).

(B) Dipendenza dalla concentrazione di I⁻ delle variazioni di fluorescenza indotte dallo I⁻ espresse in termini di massima velocità di variazione della fluorescenza ($\Delta RF/\Delta t$). La linea continua rappresenta la regressione non lineare con un'equazione di Hill bifasica. I simboli e le barre rappresentano la media +/- l'errore *standard* di n = 7-17 esperimenti distinti.

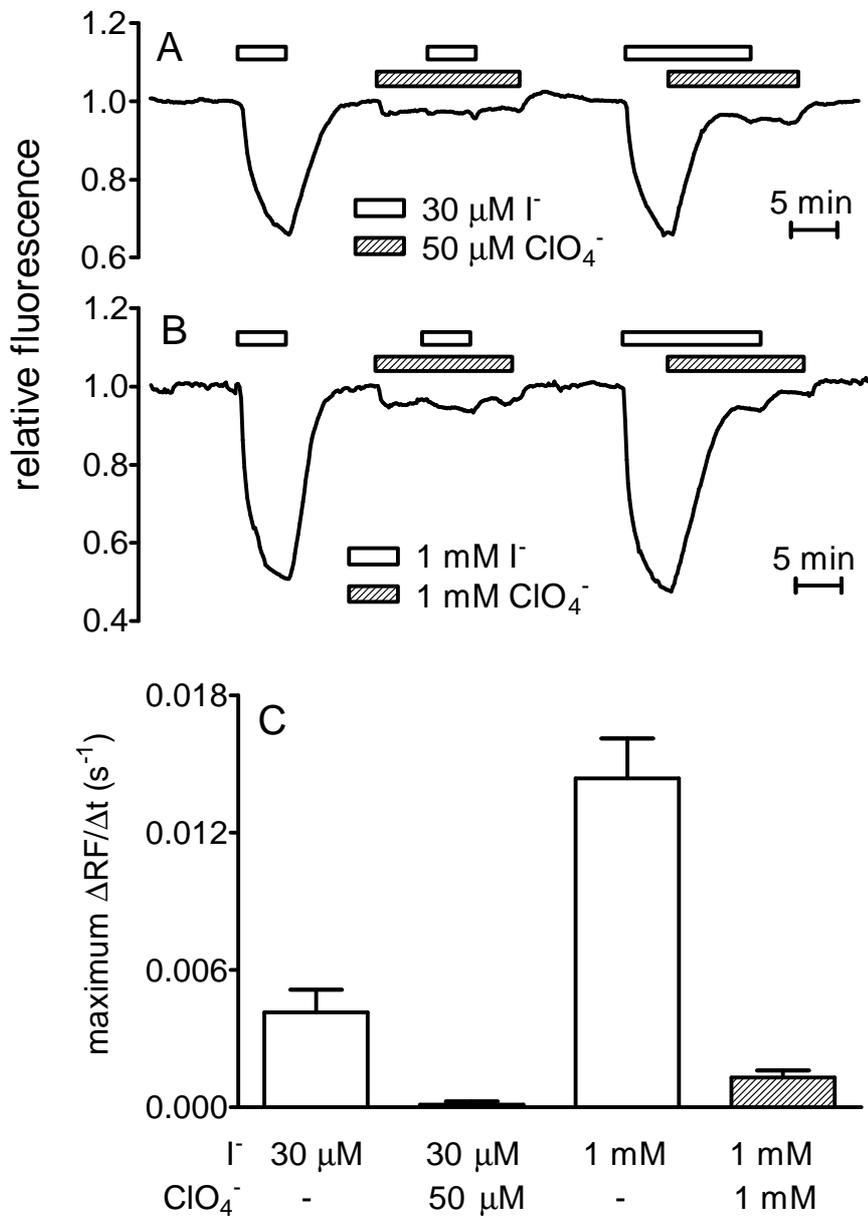


Figura 5: Effetto del ClO_4^- sulle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte dallo I^- in cellule FRTL-5.

(A) Effetto di I^- $30 \mu\text{M}$ e ClO_4^- $50 \mu\text{M}$ (A) e di I^- 1 mM e ClO_4^- 1 mM (B) sull'emissione di fluorescenza delle cellule FRTL-5. Entrambi i tracciati mostrano una prima risposta allo I^- da solo, una seconda risposta allo I^- dopo un pretrattamento ed in presenza di ClO_4^- e, una terza risposta allo I^- da solo seguito dall'aggiunta di ClO_4^- per invertire le variazioni della fluorescenza indotte dallo I^- . La fluorescenza (Relative Fluorescence) è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (a riposo). I tracciati sopra riportati sono rappresentativi della classe di esperimenti eseguiti.

(C) Effetto del ClO_4^- sulla velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta t$) indotta dallo I^- . Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 5-6$ esperimenti distinti.

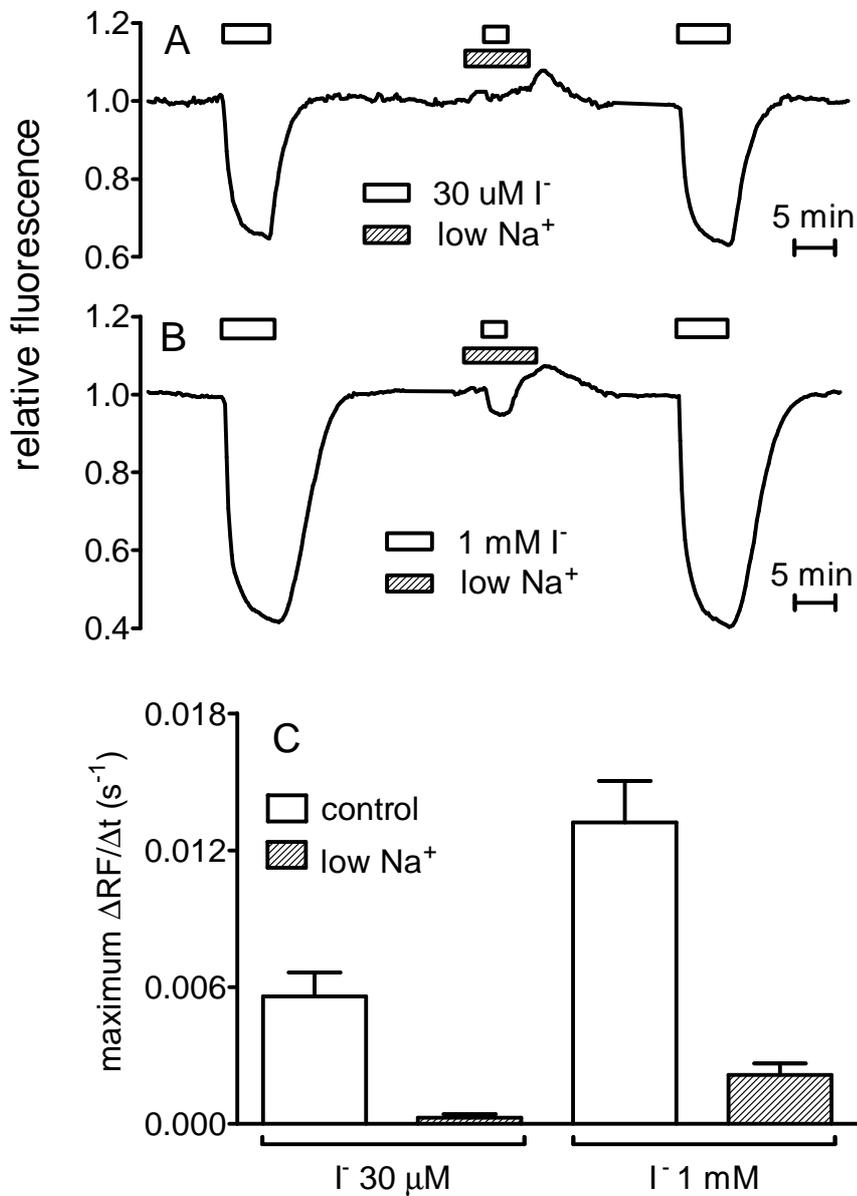


Figura 6: Effetto di una ridotta concentrazione extracellulare di Na⁺ sulle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte dallo I⁻ in cellule FRTL-5.

(A) Effetto di una bassa concentrazione extracellulare di Na⁺ (10 mM) sul decremento della fluorescenza indotta da I⁻ 30 μM (A) e da I⁻ 1 mM (B). Entrambi i tracciati mostrano, una prima risposta allo I⁻ da solo in una soluzione tamponata con HEPES contenente una concentrazione *standard* di Na⁺ (145 mM), una seconda risposta allo I⁻ dopo una riduzione del Na⁺ a 10 mM (rimpiazzato da una quantità equimolare di colina) e una terza risposta allo I⁻ in presenza di Na⁺ 145 mM. La fluorescenza (Relative Fluorescence) è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (a riposo). I tracciati sopra riportati sono rappresentativi della classe di esperimenti eseguiti.

(C) Effetto di una bassa concentrazione extracellulare di Na⁺ (10 mM) sulla velocità massima di variazione della fluorescenza (ΔRF/Δt) indotta dallo I⁻. Le barre rappresentano la media +/- l'errore *standard* di n = 5-6 esperimenti distinti.

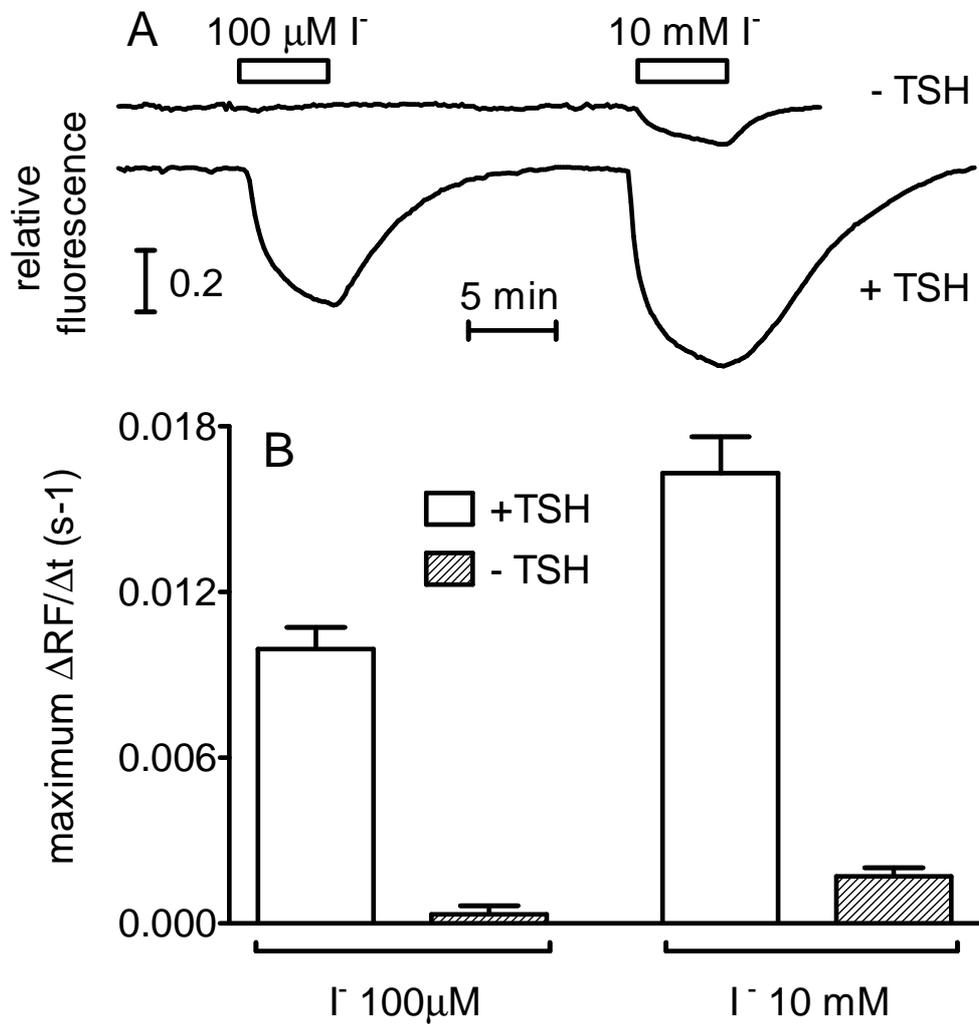


Figura 7: Effetto della rimozione del TSH sulle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte da I^- in cellule FRTL-5.

(A) I tracciati rappresentativi mostrano le variazioni dell'intensità di fluorescenza indotte dallo I^- in cellule mantenute per 7 giorni in assenza di TSH (tracciato superiore, - TSH) o in presenza di TSH 1 mU/ml (tracciato inferiore, +TSH). Le cellule sono state successivamente esposte a I^- 100 μM e 10 mM. I tracciati sopra riportati sono rappresentativi della classe di esperimenti eseguiti. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore a riposo iniziale (Relative Fluorescence).

(B) Effetto del TSH sulla velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta\text{t}$) indotta da I^- 100 μM e 10 mM. Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti.

4.1.3. EFFETTO DELLO I^- SULLA FLUORESCENZA DELLA YFP-H148Q/I152L IN CELLULE

COS-7 CHE ESPRIMONO hNIS

Le variazioni della fluorescenza indotte dallo I^- in cellule COS-7 sono state esaminate dopo 48-72 ore dalla cotrasfezione con il cDNA per la YFP-H148Q/I152L associato alternativamente o al cDNA per hNIS (human NIS) o al vettore vuoto.

L'esposizione a I^- extracellulare 100 μ M ha provocato un decremento della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L nelle cellule transfettate col cDNA per hNIS, mentre non ha indotto alcun effetto in cellule cotrasfettate con il vettore vuoto (Figura 8A-8B).

La risposta allo I^- è stata bloccata da un pre-trattamento con ClO_4^- 100 μ M, dunque questa risposta risulta mediata specificamente dal NIS (Figura 8C).

L'esposizione a I^- 10 mM ha provocato una diminuzione della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L anche in cellule prive del hNIS, suggerendo che, in cellule COS-7, le concentrazioni più elevate di I^- possono attivare un influsso attraverso permeabilità addizionali a bassa affinità.

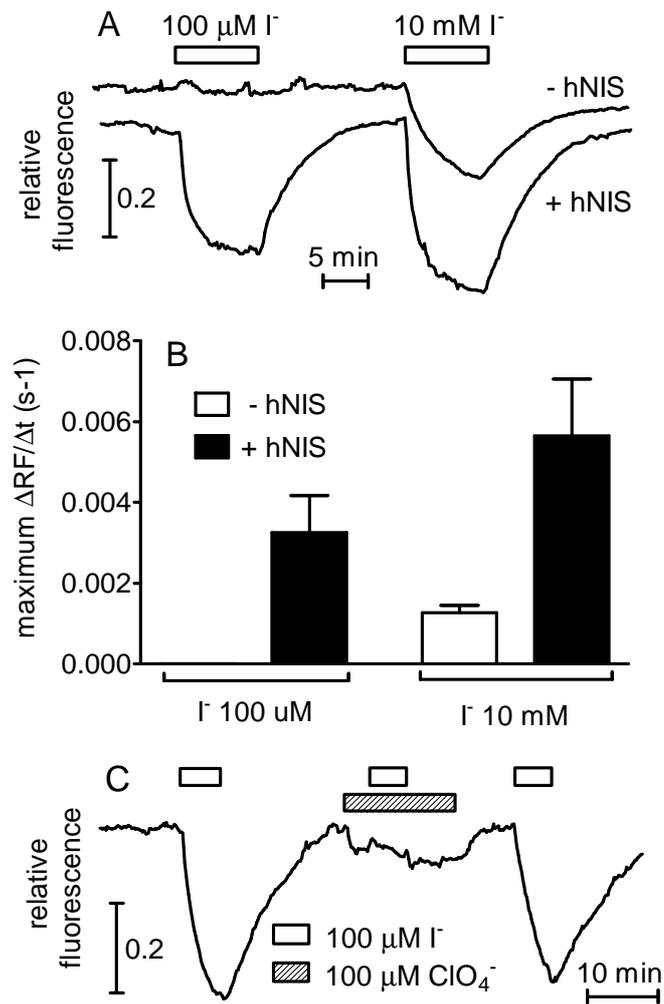


Figura 8: Variazioni indotte dallo I^- nella fluorescenza delle cellule COS-7 cotrasfettate con YFP-H148Q/I152L ed il cDNA per hNIS.

(A) I tracciati rappresentativi mostrano le variazioni dell'intensità di fluorescenza indotte dallo I^- in cellule COS-7 trasfettate con un vettore vuoto (tracciato superiore, - hNIS) o con un plasmide contenente la sequenza codificante per hNIS (human Sodium Iodide Symporter) (tracciato inferiore, +hNIS). Le cellule sono state successivamente esposte a I^- 100 μM e 10 mM. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (Relative Fluorescence).

(B) Effetto del TSH sulla velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta t$) indotta dallo I^- . Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 5$ esperimenti distinti.

(C) Un tracciato rappresentativo mostra l'inibizione prodotta dal perclorato (ClO_4^-) 100 μM sulla risposta indotta da I^- 100 μM in cellule trasfettate con hNIS. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (Relative Fluorescence).

4.1.4. EFFETTO DELLO I^- SUL pH INTRACELLULARE IN CELLULE FRTL-5

Le proteine fluorescenti YFP sono sensibili al pH. L'acidificazione provoca la diminuzione dell'emissione di fluorescenza. E' stato quindi investigato l'eventuale ruolo del pH nella mediazione o modulazione delle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L osservate in cellule FRTL-5.

E' stato quindi valutato l'effetto dell'esposizione a I^- extracellulare sul pH intracellulare (pH_i) delle FRTL-5 per escludere la possibilità che lo I^- causasse un decremento del pH_i e dunque riducesse la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indipendentemente dall'influsso dell'anione nella cellula e dall'interazione diretta con la proteina fluorescente. Il pH_i è stato monitorato con BCECF in cellule FRTL-5 che non esprimono YFP-H148Q/I152L. L'esposizione a I^- extracellulare 1 mM non ha prodotto alcun effetto sulla fluorescenza emessa dalla sonda per il pH BCECF (Figura 9). Al contrario, permeabilizzando opportunamente le stesse cellule con un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina e imponendo valori di pH_i di 7.5 e 6.5 è stato osservato un aumento e poi una diminuzione della fluorescenza del BCECF, a conferma della sua sensibilità al pH.

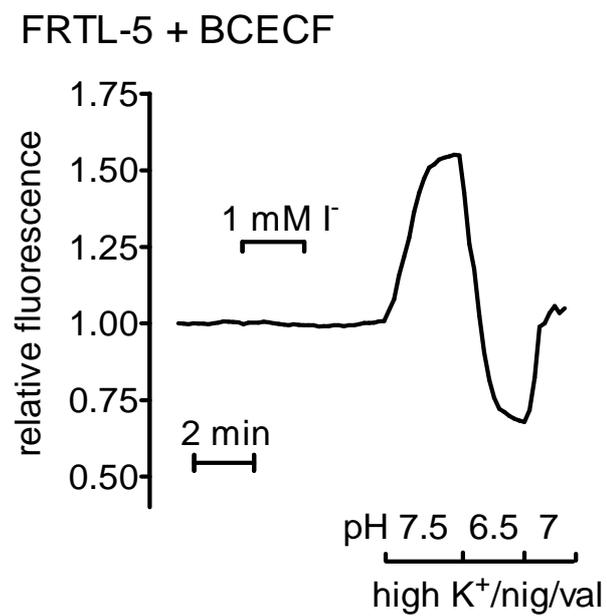


Figura 9: Effetto dello I⁻ sulla fluorescenza del BCECF.

Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza del BCECF in cellule FRTL-5 esposte prima a I⁻ extracellulare 1 mM, poi ad un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina, imponendo valori di pH_i tra 6.5 e 7.5. La fluorescenza (Relative Fluorescence) è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (a riposo).

4.2. CURVE DI CALIBRAZIONE DELLA YFP-H148Q/I152L PER LA QUANTIFICAZIONE DELL'UPTAKE DI I⁻

L'obiettivo principale di questa seconda sezione consiste nella quantificazione dell'effettiva concentrazione intracellulare di I⁻. Sono riportati gli esperimenti e le misure che consentono di esprimere le variazioni di fluorescenza osservate, in seguito all'esposizione a I⁻ extracellulare, in termini di concentrazione intracellulare di I⁻, nonché di quantificare l'effettiva capacità delle cellule tiroidee di concentrare e ritenere lo I⁻ nel citoplasma ($[I]_i/[I]_e$).

Poiché l'affinità della YFP-H148Q/I152L per lo I⁻ può risentire del pH e della concentrazione di Cl⁻, sono state realizzate le curve di calibrazione della YFP-H148Q/I152L al variare di questi parametri singolarmente ed in combinazione, all'interno di *range* fisiologici.

Le curve di calibrazione sono state realizzate sia su estratti cellulari in soluzione sia all'interno dei tireociti (curve di calibrazione intracellulari per tener conto della matrice).

Sono state effettuate misure e stime del pH e del Cl⁻ intracellulari nelle cellule FRTL-5 a riposo. Le stime del pH_i e del [Cl⁻]_i consentono di determinare il valore della K₁ (costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per lo I⁻), da utilizzare per la conversione delle variazioni di fluorescenza in termini di concentrazione di ioduro intracellulare ($[I]_i$).

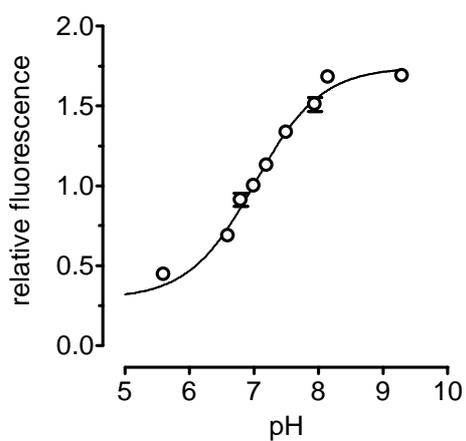
4.2.1. SENSIBILITÀ IN SOLUZIONE DELLA YFP-H148Q/I152L ESTRATTA DA TIREOCITI AL pH ED ALLO I⁻

In estratti ottenuti da *E. coli* la YFP-H148Q/I152L è sensibile al pH ed alla concentrazione di I⁻, in particolare la K_I riportata è pari a 1.9 mM (misure eseguite in soluzione priva di Cl⁻ a pH = 7.35) e la pK_a è pari a 6.95 (163).

Per confronto è stata prima misurata in soluzione la sensibilità al pH della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L estratta da tireociti. La stima della pK_a è di 7.02 (Figura 10A).

Quindi è stato misurato in soluzione l'effetto del pH sulla sensibilità allo I⁻ della YFP-H148Q/I152L estratta da tireociti in un *range* di pH fisiologici (tra 6.8 e 7.2). L'affinità della YFP-H148Q/I152L estratta da tireociti per lo I⁻ (K_I) è risultata pari a 1.4, 2.0 e 2.4 mM a valori di pH rispettivamente di 6.8, 7.0 e 7.2 (Figura 10B). Ciò suggerisce la presenza di un ridotto decremento della sensibilità per lo I⁻ al crescere del pH. Le costanti misurate in estratti di tireociti sono risultate compatibili con quelle riportate per estratti da *E. coli*, tuttavia è stato ritenuto opportuno eseguire misure di calibrazione intracellulari direttamente in tireociti integri selettivamente permeabilizzati per tener conto dell'eventuale effetto della matrice (YFP-H148Q/I152L citoplasmatica) e della presenza di cloruro (vedi paragrafo seguente).

A. YFP-H148Q/I152L



B. YFP-H148Q/I152L

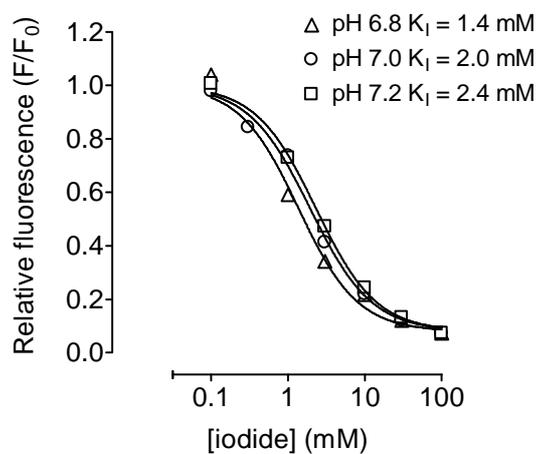


Figura 10: Effetto del pH e dello I^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in soluzione.

(A) Sensibilità al pH della YFP-H148Q/I152L in soluzione estratta da tireociti. La fluorescenza è stata normalizzata rispetto al suo valore a pH 7.0. I punti rappresentano la media \pm errore *standard* di $n = 3$ esperimenti indipendenti. (B) Effetto del pH sulla sensibilità allo I^- della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L estratta da tireociti in soluzione. La fluorescenza, ad ogni valore di pH, è stata normalizzata rispetto al suo valore in assenza di I^- . I punti rappresentano la media di 3 campioni con un errore *standard* (non mostrato) $<10\%$ del valore medio per ogni punto. Il *buffer* di lisi utilizzato non contiene Cl^- .

4.2.2. MISURE DELLA SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L AL pH, Cl^- , Γ : CURVE DI CALIBRAZIONE INTRACELLULARE IN TIREOCITI INTATTI

La YFP-H148Q/I152L è sensibile al pH, alla concentrazione di Γ e, in misura minore, anche alla concentrazione di Cl^- ; anche la presenza di altri soluti presenti nel citoplasma potrebbe giocare un ruolo.

Quindi, per correlare quantitativamente l'effetto sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L espressa in tireociti alle variazioni di questi tre parametri direttamente nel citoplasma, sono state realizzate delle curve di calibrazione intracellulare (Figura 11 e 12). I valori misurati delle costanti di affinità della YFP-H148Q/I152L per il Cl^- e lo Γ sono riportati in Tabella 1.

In Figura 11 sono riportati i tracciati rappresentativi degli esperimenti utilizzati per la costruzione delle curve di calibrazione intracellulare del pH, del Cl^- e dello Γ .

Per la calibrazione del pH le cellule FRTL-5, perfuse inizialmente con PBS, sono state selettivamente permeabilizzate agli ioni H^+ con un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina. Imponendo diversi valori di pH_i sono state poi osservate le corrispondenti variazioni della fluorescenza intracellulare. Le variazioni di fluorescenza rilevate sono risultate rapide e reversibili (Figura 11A).

Le cellule selettivamente permeabilizzate agli ioni H^+ ed agli alogenuri (con *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina addizionato di tributylstasgno -TBT- ionoforo per $\text{Cl}^-/\Gamma/\text{OH}^-$), sono state esposte a concentrazioni crescenti di Cl^- e di Γ (Figura 11B-11C rispettivamente), imponendo contemporaneamente un valore costante per il pH_i . All'aumentare della concentrazione di Cl^- o di Γ è stata osservata una diminuzione progressiva della fluorescenza intracellulare. Tali variazioni sono risultate completamente reversibili, suggerendo

la completa reversibilità dell'interazione del Cl^- e dello I^- con la YFP-H148Q/I152L intracellulare nonché il mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica dei tireociti durante gli esperimenti. L'aumento iniziale della fluorescenza seguito all'esposizione al *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina (Figura 11B-11C) può essere attribuito alla fuoriuscita del Cl^- intracellulare e/o a variazioni del pH_i .

In Figura 12 sono riportate le curve di calibrazione della YFP-H148Q/I152L, realizzate in tireociti integri permeabilizzati al variare dei tre parametri pH_i / Cl^- / I^- . Il pannello 12A rappresenta la sensibilità al pH della fluorescenza intracellulare; la pK_a stimata risulta pari a 7.08 ± 0.05 . Il pannello 12B mostra le curve di sensibilità della YFP-H148Q/I152L alla concentrazione del Cl^- intracellulare. Le diverse curve sono state ottenute imponendo valori costanti di pH_i compresi tra 6.8 e 7.4. L'affinità per il Cl^- della YFP-H148Q/I152L intracellulare all'interno dei tireociti è risultata pari a 39, 56, 58, 114 mM, con valori di pH_i rispettivamente di 6.8, 7.0, 7.2 e 7.4. È stata quindi osservata una diminuzione dell'affinità della YFP-H148Q/I152L intracellulare per il Cl^- al crescere del pH_i .

Nel pannello 12C sono riportate le curve di sensibilità della fluorescenza intracellulare alla concentrazione citoplasmatica di I^- . Per le diverse curve sono stati imposti valori di pH_i compresi tra 6.8 e 7.4. L'affinità per lo I^- della YFP-H148Q/I152L intracellulare all'interno dei tireociti è risultata di 2.0, 2.7, 3.2, 6.1 mM a valori di pH_i rispettivamente di 6.8, 7.0, 7.2 e 7.4. Anche in questo caso è stata osservata una diminuzione dell'affinità per I^- al crescere del pH_i (Tabella 1). Un aumento del pH_i provoca una diminuzione contemporanea dell'affinità della YFP-H148Q/I152L per i due alogenuri. L'effetto dell'aumento del pH_i sulla selettività è quindi molto modesto.

Infine nel pannello 12D sono riportate le curve di sensibilità della YFP-H148Q/I152L alla concentrazione di Γ^- intracellulare mantenendo il pH_i costante pari a 7.0 ed imponendo diverse concentrazioni intracellulari di Cl^- comprese tra 0 e 50 mM.

L'affinità della YFP-H148Q/I152L intracellulare per lo Γ^- è risultata di 2.7, 3.5, 5.0 mM a valori di $[\text{Cl}^-]_i$ rispettivamente di 0, 15 e 50 mM. E' stata quindi osservata una diminuzione dell'affinità per lo Γ^- al crescere della concentrazione del Cl^- intracellulare, a pH costante (Tabella 1).

Tabella 1: Sensibilità agli alogenuri della YFP-H148Q/I152L all'interno delle cellule FRTL-5.

	$K_{\text{Cl}} \text{ (mM)}^a$	$K_{\Gamma} \text{ (mM)}^a$
pH 6.8	39	2.0
pH 7.0	56	2.7
pH 7.2	58	3.2
pH 7.4	114	6.1
pH 7.0, +15 mM Cl^-	-	3.5
pH 7.0, +50 mM Cl^-	-	5.0

^aLe costanti di affinità (K_{Cl} and K_{Γ}) rappresentano le concentrazioni di alogenuri in grado di provocare una diminuzione del 50% della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L all'interno delle cellule FRTL-5.

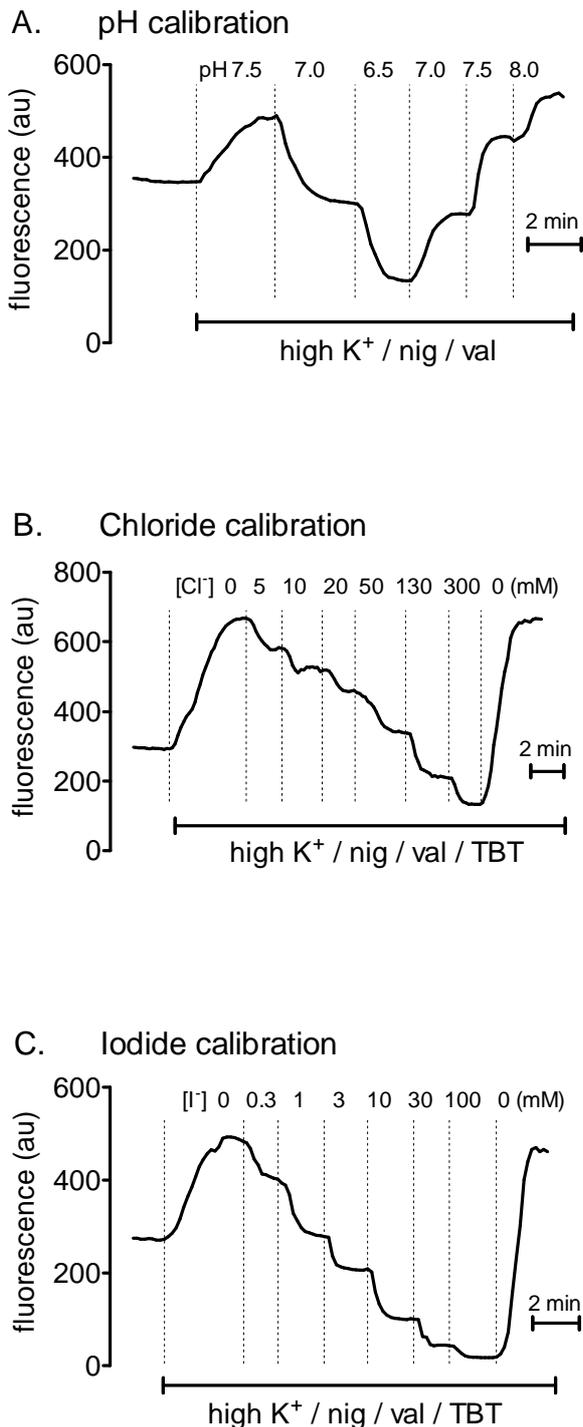


Figura 11: Effetto del pH, del Cl⁻ e dello I⁻ sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L intracellulare in tireociti integri permeabilizzati.

(A) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 perfuse inizialmente con PBS e poi esposte ad un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina.

Le cellule selettivamente permeabilizzate sono state esposte a *buffer* con pH compresi tra 6.5 e 8.0 per intervalli di tempo sufficienti al raggiungimento dell'equilibrio tra pH extracellulare e pH_i. Il tracciato sopra riportato è rappresentativo della classe di esperimenti eseguiti.

(B) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 perfuse inizialmente con PBS e poi esposte ad un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina addizionato con TBT per consentire un equilibrio rapido tra Cl⁻ intra ed extracellulare. Le cellule sono state esposte a *buffer* contenenti concentrazioni crescenti di Cl⁻ da 0 a 300 mM, a pH=7.0 costante. Il tracciato sopra riportato è rappresentativo della classe di esperimenti eseguiti.

(C) Il tracciato rappresentativo mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 perfuse inizialmente con PBS ed esposte successivamente ad un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina addizionato con TBT per permeabilizzare le membrane allo I⁻. Le cellule sono state esposte a *buffer* contenenti concentrazioni crescenti di I⁻ da 0 a 100 mM, a pH = 7.0 costante ed in assenza di Cl⁻.

Da un esperimento all'altro è stato osservato un fenomeno di *carryover* del TBT, dunque già dai primi istanti degli esperimenti mostrati nei pannelli B e C le cellule risultano probabilmente parzialmente permeabilizzate.

(au) = unità di misura arbitraria.

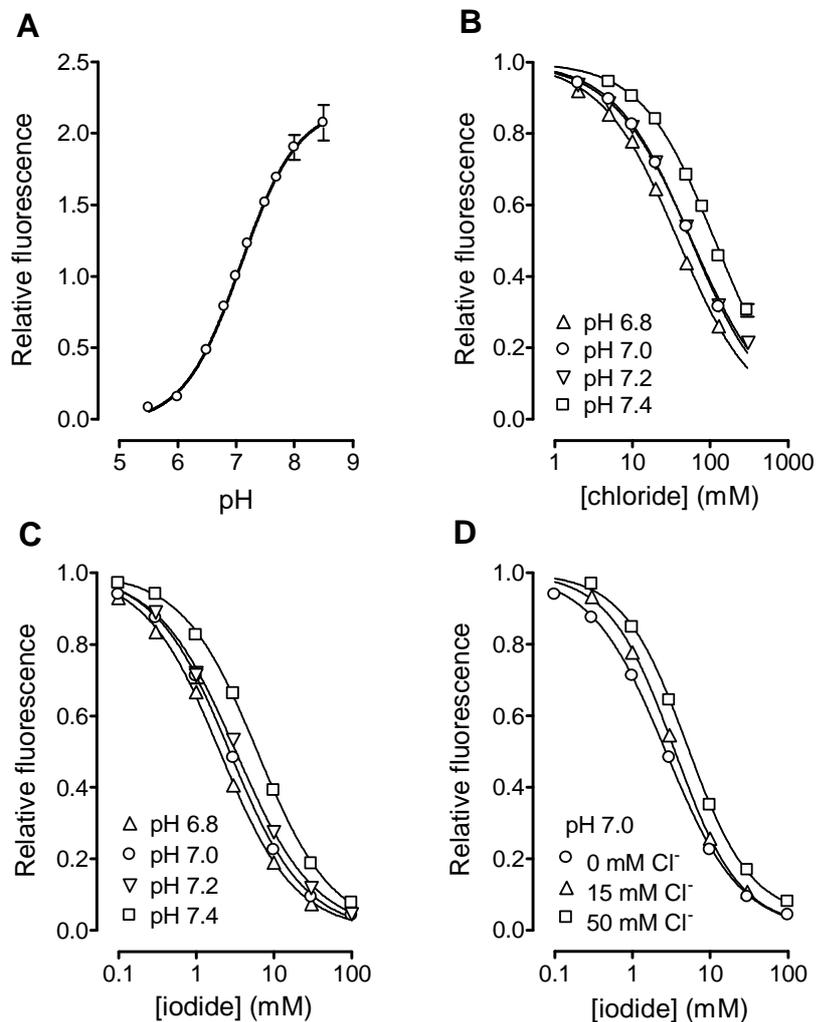


Figura 12: Curve di calibrazione della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L al variare del pH, del Cl^- e dello I^- intracellulari in tireociti permeabilizzati.

(A) Sensibilità al pH_i della YFP-H148Q/I152L in tireociti permeabilizzati. La fluorescenza è stata normalizzata rispetto al suo valore a $\text{pH} 7.0$. I punti rappresentano la media \pm errore *standard* di $n = 5-17$ esperimenti distinti.

(B) Effetto del pH sulla sensibilità al cloruro intracellulare ($[\text{Cl}^-]_i$) della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L in tireociti permeabilizzati. La fluorescenza, ad ogni valore di pH , è stata normalizzata rispetto al suo valore in assenza di Cl^- . Ogni punto rappresenta la media di $n = 13$ campioni con un errore *standard*, non mostrato, minore del 10% del valore medio per ogni punto.

(C) Effetto del pH sulla sensibilità allo I^- intracellulare ($[\text{I}^-]_i$) della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L in tireociti permeabilizzati. La fluorescenza, ad ogni valore di pH , è stata normalizzata rispetto al suo valore in assenza di I^- e di Cl^- . I punti rappresentano la media di $n = 4-6$ campioni con un errore *standard* (non mostrato) minore del 10% del valore medio per ogni punto.

(D) Effetto della concentrazione del cloruro intracellulare sulla sensibilità allo I^- intracellulare della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L in tireociti permeabilizzati mantenuti a $\text{pH} 7.0$ costante. La fluorescenza, ad ogni valore di $[\text{Cl}^-]_i$, è stata normalizzata rispetto al suo valore in assenza di I^- . I punti rappresentano la media di $n = 4-6$ campioni con un errore *standard* (non mostrato) minore del 10% del valore medio per ogni punto.

4.2.3. MISURE DEL pH_i INTRACELLULARE A RIPOSO IN CELLULE FRTL-5

Il pH intracellulare (pH_i) a riposo delle cellule FRTL-5 è stato misurato utilizzando la sonda fluorescente BCECF ed è risultato pari a 6.94 +/-0.04 (Figura 13). Le cellule, mantenute inizialmente in soluzione fisiologica, sono state successivamente permeabilizzate con un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina. Imponendo valori di pH_i compresi tra 6.5 e 8.0 sono state osservate corrispondenti variazioni nella fluorescenza emessa dalle cellule caricate con BCECF (Figura 13A). Ciò ha permesso la costruzione di una curva di calibrazione (Figura 13B) che riporta la sensibilità della fluorescenza del BCECF alle variazioni di pH_i in cellule FRTL-5. Il valore del pH_i iniziale delle cellule FRTL-5 a riposo è stato quindi calcolato in numerosi esperimenti distinti (Figura 13C) convertendo i valori della fluorescenza a riposo (Figura 13A) in termini di pH_i tramite la curva riportata nella Figura 13B.

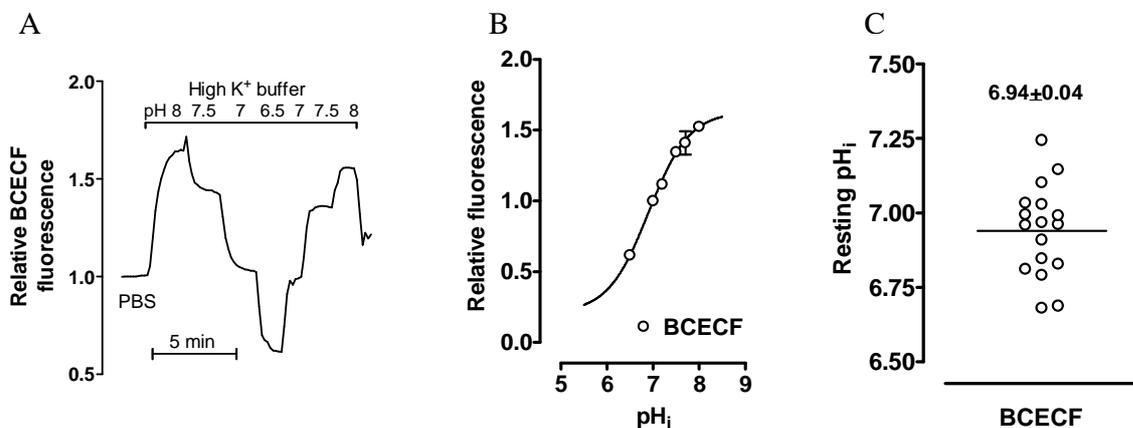


Figura 13: Misura del pH_i con BCECF in cellule FRTL-5.

(A) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza del BCECF in cellule FRTL-5 mantenute prima in PBS (a riposo) e poi esposte ad un *buffer* ad alta concentrazione di K⁺/nigericina/valinomicina, imponendo valori di pH_i tra 6.5 e 8.0. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore a pH 7.0.

(B) Sensibilità al pH del BCECF in tireociti integri permeabilizzati. La fluorescenza è stata normalizzata rispetto al suo valore a pH 7.0. I simboli rappresentano la media +/- errore *standard* di n = 4-11 misure ottenute in esperimenti indipendenti.

(C) I simboli rappresentano i valori di pH_i a riposo in n = 17 esperimenti indipendenti. La barra orizzontale rappresenta il valore medio del pH_i in cellule FRTL-5.

4.2.4. STIMA DEL Cl^- INTRACELLULARE IN CELLULE FRTL-5

La concentrazione di cloruro intracellulare $[\text{Cl}^-]_i$ nelle cellule FRTL-5 a riposo (Figura 14) è stata stimata monitorando le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in seguito alla rimozione di Cl^- extracellulare (e dunque di quello intracellulare). Per un dato livello di espressione della YFP-H148Q/I152L la fluorescenza a riposo riflette un bilanciamento tra la concentrazione intracellulare di Cl^- ed il pH_i . Dal momento che la rimozione del Cl^- può alterare il pH_i , l'effetto del *buffer* privo di Cl^- sul pH_i è stato determinato indipendentemente usando come sonda il BCECF (Figura 14A). Il contributo della variazione di pH indotta dalla rimozione del Cl^- alla variazione della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è stato estrapolato dalla curva di calibrazione del pH per la YFP-H148Q/I152L (Figura 12A). Il pH_i a riposo in cellule FRTL-5, misurato con BCECF, è risultato pari a 6.94 ± 0.04 (Figura 13C) ed aumenta di 0.17 ± 0.01 unità durante la perfusione con PBS privo di Cl^- ($n = 3$; Figura 14A). La perfusione delle FRTL-5 con PBS privo di Cl^- ha provocato un aumento del $47 \pm 3\%$ nella fluorescenza a riposo ($n = 14$; Figura 14B), presumibilmente dovuta sia ad un aumento del pH_i sia alla perdita del Cl^- intracellulare. Secondo la curva di sensibilità al pH della YFP-H148Q/I152L riportata in Figura 12A cap.4.2.2, l'aumento del pH_i di 0.17 unità, da solo, può rendere conto di un aumento della fluorescenza relativa a riposo di circa il 16%. Sottraendo la variazione di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L dovuta al pH ed esprimendo la fluorescenza relativamente al suo valore in assenza di Cl^- (Figura 14B, scala di destra) è possibile leggere la concentrazione intracellulare di Cl^- nella curva di calibrazione di Cl^- mostrata in Figura 12B, cap.4.2.2. Usando questo approccio, il Cl^- intracellulare nelle cellule FRTL-5 è stato stimato circa pari a 14 mM (14.3 ± 1.8 mM dalla curva di calibrazione di Cl^- a pH 7.0; 13.7 ± 1.8 mM dalla curva di calibrazione di Cl^- a pH 7.2).

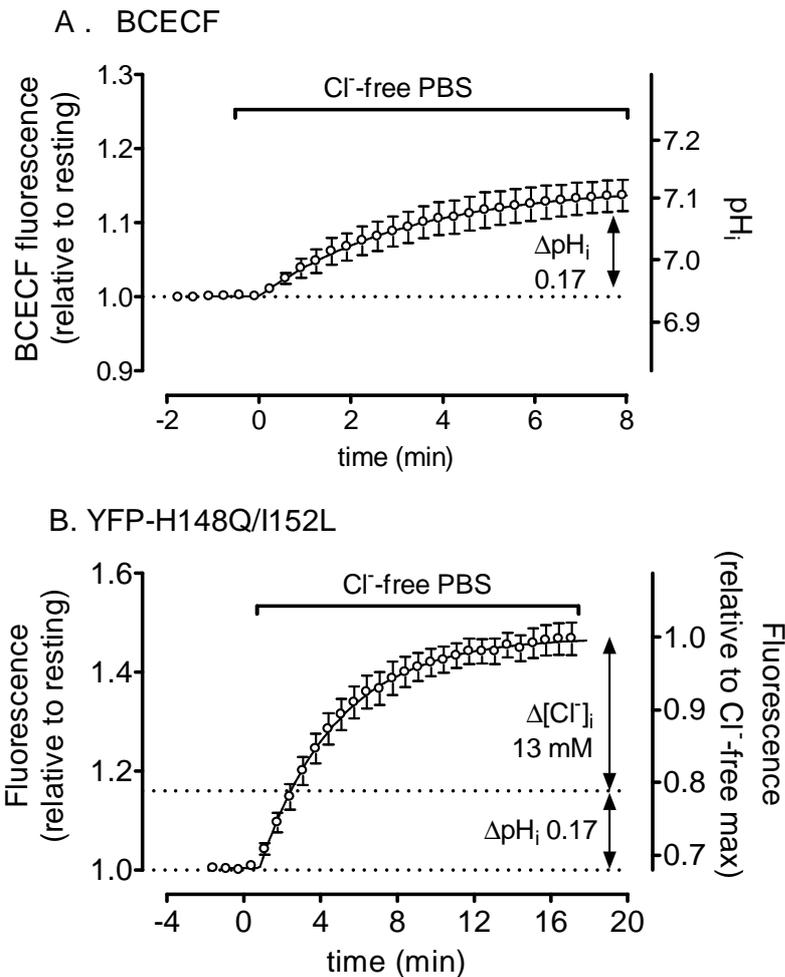


Figura 14: Stima della concentrazione intracellulare di Cl⁻ in cellule FRTL-5.

(A) Effetto della rimozione del Cl⁻ extracellulare sul pH_i. Il tracciato mostra le variazioni di intensità di fluorescenza del BCECF (scala a sinistra) in cellule FRTL-5 mantenute a partire da t = 0 in un *buffer* privo di Cl⁻. Nella scala a destra la fluorescenza relativa è stata convertita in termini di pH intracellulare utilizzando la curva di calibrazione riportata in Figura 13B, cap.4.2.3. I simboli e le barre rappresentano la media +/- l'errore *standard* di n = 3 esperimenti distinti. Nel grafico è riportata la variazione del pH intracellulare (ΔpH_i) pari a 0.17 unità. Si rammenta che la concentrazione di Cl⁻ non influenza direttamente la fluorescenza del BCECF, che risponde soltanto a variazioni del pH_i.

(B) Effetto della rimozione del Cl⁻ extracellulare sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5. Il tracciato mostra le variazioni di intensità di fluorescenza delle cellule FRTL-5 mantenute a partire da t = 0 in un *buffer* privo di Cl⁻. Nella scala a sinistra è riportata la fluorescenza relativa calcolata rispetto alla fluorescenza a riposo (per t < 0). Nella scala a destra è riportata la fluorescenza relativa calcolata rispetto al suo valore massimo in assenza di Cl⁻ (t > 16). I simboli e le barre rappresentano la media +/- l'errore *standard* di n = 14 esperimenti distinti. L'aumento di fluorescenza osservato può essere spiegato dalla combinazione di due effetti: l'aumento di pH_i (ΔpH_i) stimato in 0.17 unità (A) e la diminuzione del Cl⁻ intracellulare che lega la YFPH148Q/I152L. L'aumento del pH_i di 0.17 unità, da 6.94 a 7.11, secondo la curva di sensibilità al pH della YFP-H148Q/I152L riportata in Figura 12A cap.4.2.2, può rendere conto di un aumento della fluorescenza relativa di circa il 16% (linea punteggiata nel grafico, scala di sinistra). Il residuo aumento di fluorescenza, da 0.8 a 1.0 nella scala di destra, può essere attribuito alla fuoriuscita del Cl⁻ intracellulare e può essere espresso in termini di variazione della concentrazione di Cl⁻ ($\Delta[\text{Cl}^-]_i$) facendo riferimento alle curve di calibrazione riportate in Figura 12B, cap.4.2.2.

4.2.5. QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI Γ IN CELLULE FRTL-5

Lo Γ 1-300 μM induce una diminuzione concentrazione-dipendente della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 (Figura 15A). Questo effetto è mediato dall'influsso di Γ tramite il NIS. Le variazioni indotte da Γ nella fluorescenza della YFP-H148Q/I152L possono essere convertite in termini di variazioni assolute della concentrazione intracellulare di Γ , a patto che si utilizzi un appropriato valore costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per lo Γ (K_{Γ}). Il valore appropriato della K_{Γ} da usare nella conversione può essere individuato tra i valori riportati in Tabella 1 cap.4.2.2, disponendo delle stime di Cl^{-} intracellulare e di pH_i . Considerando quanto riportato nei paragrafi precedenti ($\text{pH}_i = 6.94 \pm 0.04$; $[\text{Cl}^{-}]_i$ 14 mM) il valore di K_{Γ} da utilizzare è pari a 3.5 mM (K_{Γ} a pH 7.0 in presenza di Cl^{-} 15 mM). La figura 15B mostra le variazioni di fluorescenza riportate in Figura 15A espresse in termini di $[\Gamma]_i$. La velocità iniziale di influsso di Γ nelle cellule è stata quindi calcolata ed espressa in termini di $\mu\text{M/s}$ al variare della concentrazione extracellulare di Γ (Figura 15C). Infine è stata stimata l'effettiva concentrazione di Γ intracellulare raggiunta in prossimità dell'equilibrio, in seguito all'esposizione alle diverse concentrazioni di Γ extracellulare (Figura 15D). La figura riporta inoltre il rapporto tra le concentrazioni di Γ intracellulari ed extracellulari raggiunte in prossimità dell'equilibrio.

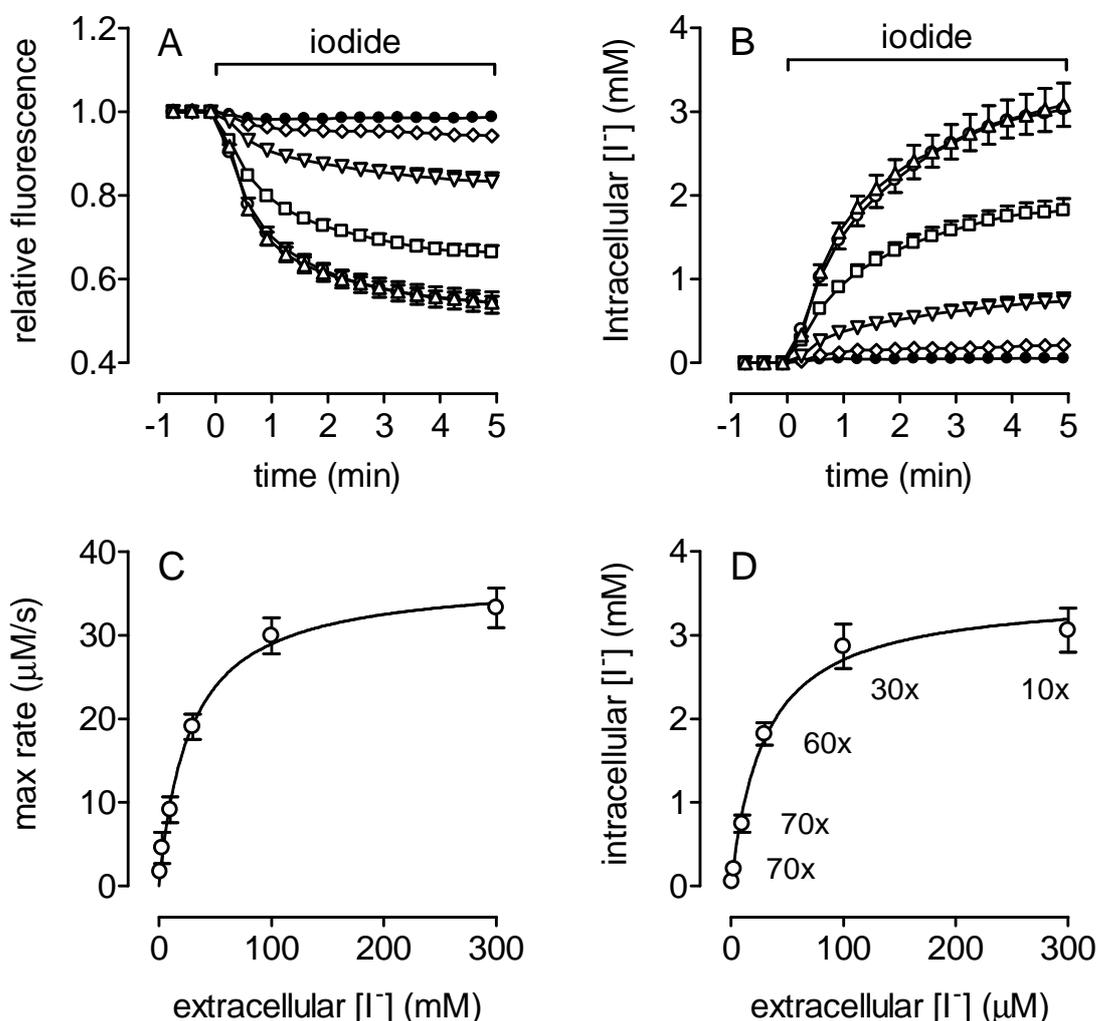


Figura 15: Quantificazione della concentrazione intracellulare di I^- in cellule FRTL-5.

(A) Effetto dell'esposizione a I^- extracellulare 1-300 μM sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L. I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti. La fluorescenza è stata calcolata rispetto al suo valore iniziale (a riposo).

(B) Effetto dell'esposizione a I^- extracellulare 1-300 μM sulla concentrazione intracellulare di I^- calcolata a partire dai tracciati riportati nel pannello A, utilizzando nella conversione un valore della K_1 pari a 3.5 mM (costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per I^- in cellule FRTL-5). I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti.

(C) Dipendenza della velocità iniziale (*max rate*) di influsso di I^- nelle cellule (espressa in termini di $\mu\text{M/s}$) dalla concentrazione di I^- extracellulare. I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti. La linea continua rappresenta l'interpolazione dei dati con una funzione iperbolica.

(D) Dipendenza della $[I^-]_i$ dalla $[I^-]_o$ extracellulare.

La concentrazione di I^- intracellulare è stata calcolata dopo 5 minuti di esposizione a I^- extracellulare, ossia in prossimità dell'equilibrio. Vicino ai punti sperimentali è riportato il rapporto tra le concentrazioni di I^- intra ed extra cellulare. I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti. La linea continua rappresenta l'interpolazione dei dati con una funzione iperbolica.

4.3. MISURA DEL TRASPORTO DI ClO_4^-

Il ClO_4^- è il più potente inibitore noto del trasporto dello I^- nei follicoli tiroidei, nonché un diffuso contaminante ambientale. Ad oggi non è del tutto chiaro se venga o meno trasportato dal NIS e dunque accumulato nella tiroide. Gli obiettivi di questa sezione sono pertanto:

- Verificare la possibilità che la YFP-H148Q/I152L possa funzionare come sensore per la concentrazione di ClO_4^- intracellulare ($[\text{ClO}_4^-]_i$). A tal fine è stata calcolata l'affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^- in tireociti selettivamente permeabilizzati;
- Verificare che la YFP-H148Q/I152L espressa in tireociti possa funzionare come biosensore per il trasporto di ClO_4^- tramite l'esposizione delle cellule FRTL-5, mantenute in condizioni fisiologiche, a concentrazioni μM di ClO_4^- extracellulare;
- Valutare un eventuale trasporto ed accumulo del ClO_4^- mediato dal NIS sulla base di specifici criteri quali l'affinità μM del NIS per il ClO_4^- , la dipendenza del trasporto dall' Na^+ , la verifica del trasporto in un modello cellulare ricombinante, l'indipendenza degli effetti misurati dal pH_i e dal $[\text{Cl}^-]_i$.

4.3.1. SENSIBILITÀ DELLA YFP-H148Q/I152L AL ClO_4^- INTRACELLULARE: CURVA DI CALIBRAZIONE IN TIREOCITI INTEGRATI PERMEABILIZZATI

Per indagare la possibilità che la YFP-H148Q/I152L potesse funzionare come sensore per il ClO_4^- è stata realizzata una curva di calibrazione intracellulare.

La fluorescenza della YFP-H148Q/I152L, espressa in tireociti, è risultata quantitativamente correlata alla concentrazione di ClO_4^- nel citoplasma, come mostra la curva di calibrazione intracellulare in Figura 16. Le cellule FRTL-5 esprimenti la YFP-H148Q/I152L sono state selettivamente permeabilizzate con *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina addizionato di TBT in modo da poter controllare il pH_i e le concentrazioni intracellulari di Cl^- e ClO_4^- durante le calibrazioni.

Le cellule mantenute a pH_i e $[\text{Cl}^-]_i$ costanti ($\text{pH}_i = 7.0$ e $[\text{Cl}^-]_i = 15 \text{ mM}$) sono state esposte a concentrazioni crescenti di ClO_4^- . L'esposizione a ClO_4^- 0-100 mM ha provocato una diminuzione proporzionale della fluorescenza intracellulare (Figura 16A).

La curva di calibrazione ottenuta ha permesso di stimare la costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^- . La K_{ClO_4} risulta essere pari a 2.7 mM, ai valori fisiologici di $\text{pH}_i = 7.0$ e $[\text{Cl}^-]_i = 15 \text{ mM}$. Questa curva può essere confrontata con la calibrazione per lo I^- ottenuta nelle stesse condizioni.

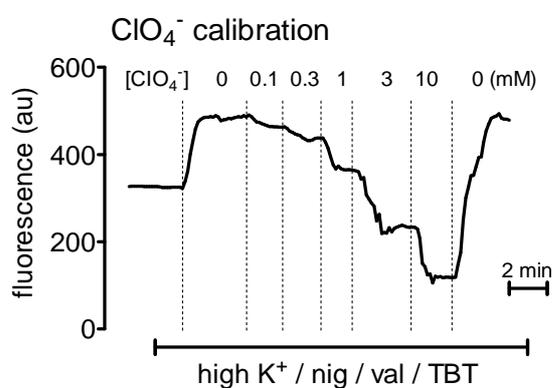
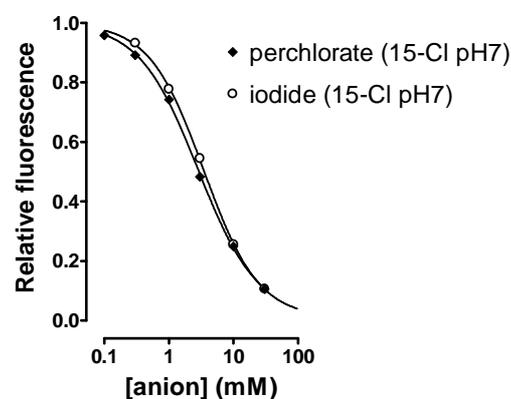
A**B**

Figura 16: Effetto del ClO_4^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L intracellulare in tireociti integri permeabilizzati; curva di calibrazione intracellulare del ClO_4^- .

(A) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 perfuse inizialmente con PBS ed esposte successivamente ad un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina addizionato con TBT per permeabilizzare le membrane al $\text{ClO}_4^-/\text{Cl}^-/\text{OH}^-$. Le cellule sono state esposte, a pH costante pari a 7.0 ed in presenza di Cl^- 15 mM, a *buffer* contenenti concentrazioni crescenti di ClO_4^- da 0 a 10 mM. Il tracciato sopra riportato è rappresentativo della classe di esperimenti eseguiti. (au) = unità di misura arbitraria.

(B) Curva di sensibilità della YFP-H148Q/I152L al ClO_4^- in tireociti permeabilizzati mantenuti a $\text{pH}_i = 7.0$ ed in presenza di Cl^- intracellulare 15 mM. La fluorescenza, ad ogni valore di ClO_4^- , è stata normalizzata rispetto al suo valore in assenza di ClO_4^- . Per confronto è stata riportata in figura la curva di calibrazione dello I^- ottenuta nelle stesse condizioni ($K_i = 3.5$ mM con $\text{pH}_i = 7.0$ e $[\text{Cl}^-]_i = 15$ mM).

4.3.2. EFFETTO DEL ClO_4^- SULLA FLUORESCENZA DI YFP-H148Q/I152L IN CELLULE FRTL-5

Un clone di cellule FRTL-5 che esprime stabilmente la proteina fluorescente YFP-H148Q/I152L è stato esposto sotto perfusione ad una concentrazione di perclorato (ClO_4^-) extracellulare pari a 1mM. Il ClO_4^- ha provocato una rapida diminuzione della fluorescenza cellulare a partire da 10 secondi dall'esposizione. La fluorescenza ha raggiunto un livello prossimo all'equilibrio in circa 5 minuti.

Il decremento della fluorescenza è risultato reversibile, con un recupero completo della fluorescenza iniziale entro 10 minuti dalla rimozione del ClO_4^- extracellulare. Una successiva esposizione a Γ 10 μM ha indotto una risposta reversibile di ampiezza comparabile (Figura 17).

Le variazioni di fluorescenza indotte dal ClO_4^- sono risultate riproducibili all'interno di uno stesso esperimento: tre applicazioni consecutive di ClO_4^- hanno provocato risposte simili (non mostrato in figura).

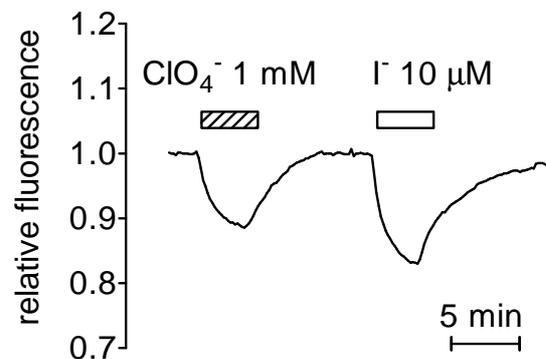


Figura 17: Quantificazione dei cambiamenti indotti dal ClO_4^- nella fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5.

Un clone di cellule FRTL-5 è stato esposto a ClO_4^- extracellulare 1 mM. Dopo il recupero della fluorescenza seguito alla rimozione del ClO_4^- extracellulare, lo stesso clone è stato esposto a Γ extracellulare 10 μM . L'intensità di fluorescenza, rappresentata dalla linea continua, è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (Relative Fluorescence). Le barre orizzontali rappresentano le esposizioni a ClO_4^- 1 mM e a Γ 10 μM .

4.3.3. EFFETTO DEL ClO_4^- SUL pH_i E RUOLO DEL Cl^- NELLA RISPOSTA A ClO_4^- IN CELLULE FRTL-5

Come riportato, la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L è sensibile al pH ed alla concentrazione di Cl^- . È stato quindi investigato il possibile ruolo del pH_i nella mediazione o modulazione delle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L osservate in cellule FRTL-5 esposte a ClO_4^- . Dapprima è stato valutato l'effetto dell'esposizione a ClO_4^- extracellulare sul pH_i per escludere l'ipotesi che il ClO_4^- potesse produrre un decremento del pH_i e dunque ridurre la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indipendentemente dall'influsso dell'anione nella cellula e dall'interazione diretta con la proteina fluorescente. Il pH_i è stato monitorato con BCECF in cellule FRTL-5 che non esprimono YFP-H148Q/I152L. L'esposizione a ClO_4^- extracellulare 1 mM non ha provocato effetti sulla fluorescenza emessa dalla sonda per il pH BCECF (Figura 18A).

Al contrario, permeabilizzando selettivamente le stesse cellule con un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina e imponendo valori di pH_i di 7.5 e 6.5 è stato osservato un aumento e poi una diminuzione della fluorescenza del BCECF, a conferma della sua sensibilità al pH.

Successivamente è stato esaminato il ruolo del Cl^- intracellulare nella risposta al ClO_4^- in cellule FRTL-5 che esprimono YFP-H148Q/I152L. Le risposte della fluorescenza di YFP-H148Q/I152L a ClO_4^- extracellulare 1 mM sono state misurate in cellule FRTL-5 pre-incubate (15-20 min.) in un *buffer* contenente Cl^- (PBS) o in PBS privo di Cl^- . La rimozione del Cl^- dal *medium* e quindi dal citoplasma non ha provocato variazioni significative nel profilo e nell'ampiezza delle risposte al ClO_4^- extracellulare 1 mM (Figura 18B).

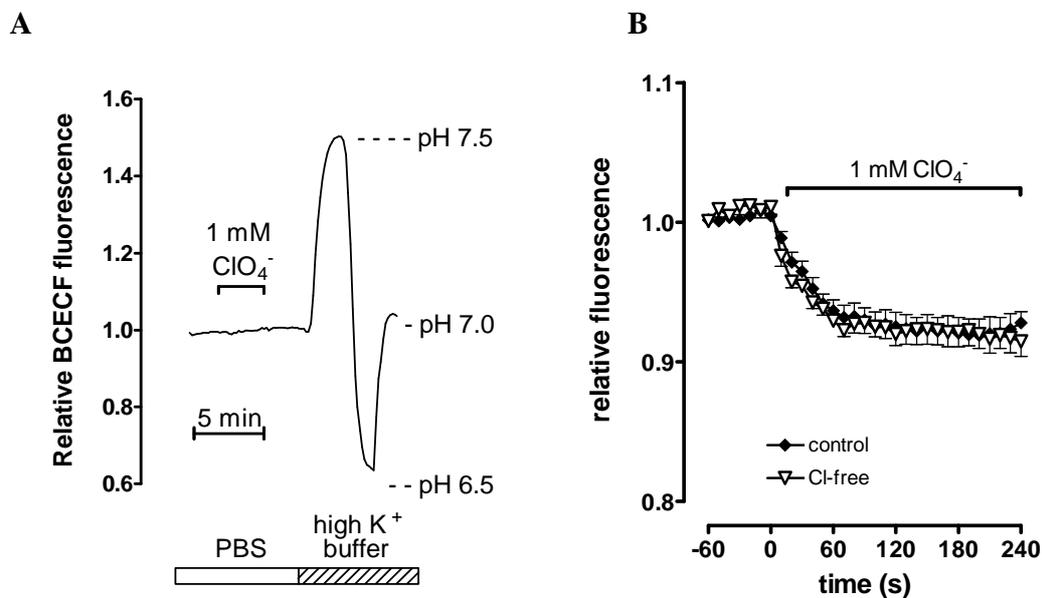


Figura 18: Effetto del ClO_4^- 1mM sulla fluorescenza del BCECF e della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5; ruolo del Cl^- intracellulare nella risposta a ClO_4^- .

(A) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza del BCECF in cellule FRTL-5 esposte prima a ClO_4^- extracellulare 1 mM, poi ad un *buffer* ad alta concentrazione di K^+ /nigericina/valinomicina, imponendo valori di pH_i tra 6.5 e 7.5. La fluorescenza è stata calcolata relativamente al suo valore iniziale (a riposo).

(B) Il tracciato mostra le variazioni dell'intensità di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte da ClO_4^- extracellulare 1 mM in cellule FRTL-5 preincubate e mantenute in PBS (controllo) o in PBS privo di Cl^- . La fluorescenza è stata normalizzata rispetto al suo valore iniziale (a riposo). I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore standard di $n = 8$ esperimenti distinti.

4.3.4. CRITERI PER L'IDENTIFICAZIONE DI UN TRASPORTO DI ClO_4^- MEDIATO DAL NIS

Di seguito sono descritti alcuni criteri che suggeriscono un trasporto di ClO_4^- nelle cellule che esprimono NIS.

Dipendenza dalla concentrazione di ClO_4^-

Il ClO_4^- ha provocato una diminuzione reversibile della fluorescenza in cellule FRTL-5 a concentrazioni extracellulari comprese tra 1 μM e 1 mM (Figura 19). L'esposizione a concentrazioni crescenti di ClO_4^- ha provocato una diminuzione proporzionale della fluorescenza. Un rapido iniziale decremento di fluorescenza è stato misurato entro 1 minuto dall'esposizione (Figura 19A).

Utilizzando un opportuno valore per la costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^- (Figura 16), le risposte sono state convertite in termini di concentrazione di ClO_4^- intracellulare (Figura 19B). La concentrazione intracellulare di ClO_4^- calcolata ha superato la concentrazione dell'anione extracellulare entro 1 minuto dall'esposizione a ClO_4^- 1, 10, 100 μM (Figura 19B).

Dipendenza dal Na^+ Extracellulare

I cambiamenti indotti dal ClO_4^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 sono risultati dipendenti dalla presenza di Na^+ extracellulare (Figura 20A). Una riduzione della concentrazione di Na^+ nel mezzo extracellulare (da 145 mM a 5 mM) ha causato una inibizione del 90% della velocità massima di diminuzione della fluorescenza indotta dal ClO_4^- 1 mM (Figura 21B).

Effetto del ClO_4^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule COS-7 trasfettate con hNIS

Le variazioni della fluorescenza indotte dal ClO_4^- in cellule COS-7 sono state esaminate dopo 48-72 ore dalla cotrasfezione con il cDNA per la YFP-H148Q/I152L associato alternativamente o al cDNA per hNIS o al vettore vuoto (le cellule COS-7 *wild-type* nelle normali condizioni di coltura non esprimono il NIS). L'esposizione a ClO_4^- extracellulare 100 μM e 1mM ha provocato un decremento della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L nelle cellule trasfettate col cDNA per hNIS, mentre non ha indotto alcun effetto in cellule cotrasfettate con il vettore vuoto (Figura 21A-21B).

Le cellule COS-7, dopo 48-72 ore dalla cotrasfezione con i cDNA per la YFP-H148Q/I152L e per hNIS, sono state esposte a concentrazioni extracellulari di ClO_4^- comprese tra 1 μM e 1 mM. L'esposizione a concentrazioni crescenti di ClO_4^- ha provocato una proporzionale diminuzione della fluorescenza, (Figura 21C). Valutando queste variazioni in termini di stima della concentrazione intracellulare di ClO_4^- è stato osservato un rapido e proporzionale aumento del ClO_4^- intracellulare in seguito all'esposizione a concentrazioni crescenti di ClO_4^- (il valore della costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^- , K_{ClO_4} , è stato assunto pari a 2.7 mM). La concentrazione intracellulare di ClO_4^- , così stimata, ha superato la concentrazione di ClO_4^- extracellulare entro 1 minuto dall'esposizione a ClO_4^- 1, 10, 100 μM (Figura 21D).

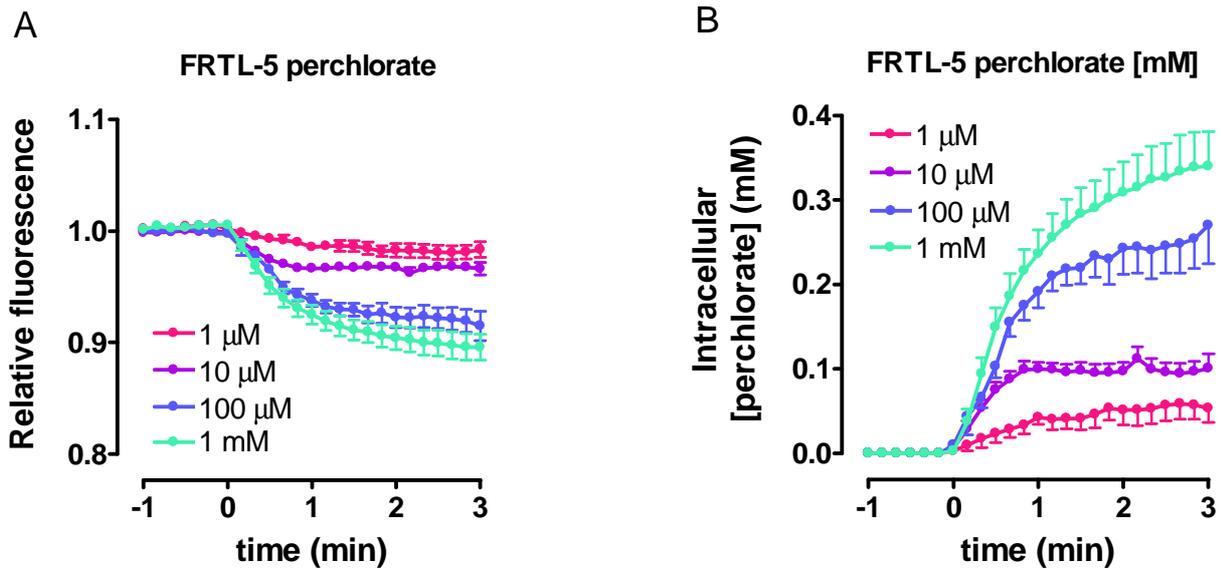


Figura 19: Relazione tra concentrazione di ClO_4^- extracellulare e le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5; relazione tra la concentrazione extra ed intracellulare di ClO_4^- .

(A) Effetto dell'esposizione a ClO_4^- extracellulare 1-1000 μM sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5. I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-9$ esperimenti distinti. La fluorescenza è stata calcolata rispetto al suo valore iniziale a riposo (Relative Fluorescence).

(B) Effetto dell'esposizione a ClO_4^- extracellulare 1-1000 μM sulla concentrazione intracellulare di ClO_4^- calcolata a partire dai tracciati riportati nel pannello A. Nella conversione è stato utilizzato un valore della K_{ClO_4} (costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^-) pari a 2.7 mM (misurata a $\text{pH}_i = 7.0$ e $[\text{Cl}^-]_i = 15$ mM). I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-9$ esperimenti distinti.

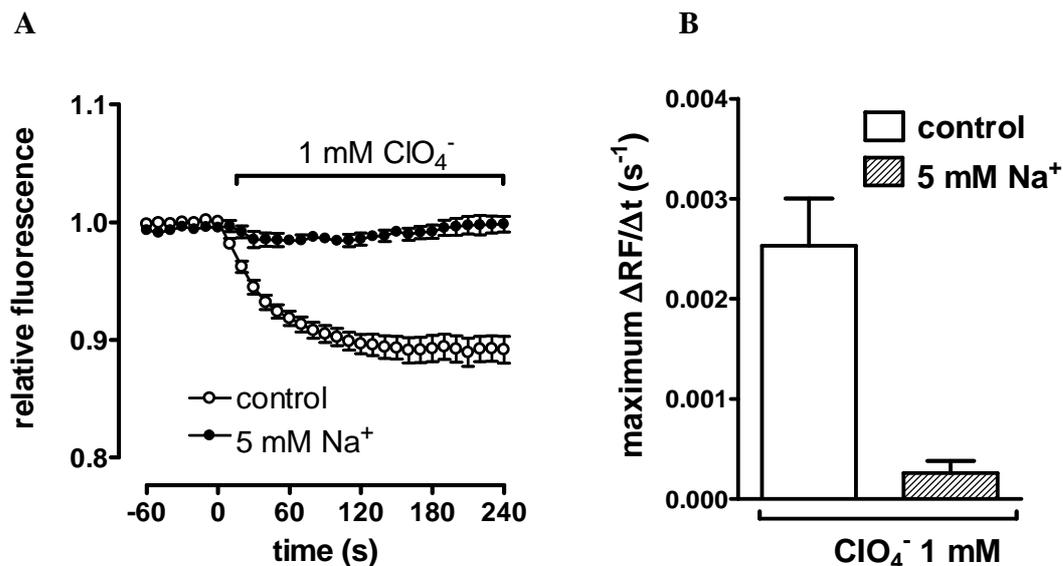


Figura 20: Effetto di una bassa concentrazione extracellulare di Na^+ sulle variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte dal ClO_4^- in cellule FRTL-5.

(A) I tracciati mostrano la risposta al ClO_4^- 1 mM in una soluzione tamponata con HEPES contenente una concentrazione *standard* di Na^+ (145 mM) e la risposta al ClO_4^- dopo una riduzione del Na^+ a 5 mM rimpiazzato da una quantità equimolare di colina. La fluorescenza (Relative Fluorescence) è stata calcolata, per ogni esperimento, relativamente al suo valore iniziale (a riposo). I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 7$ esperimenti distinti.

(B) Effetto di una bassa concentrazione extracellulare di Na^+ (5 mM) sulla massima velocità di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta t$) indotta dal ClO_4^- . Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 7$ esperimenti distinti.

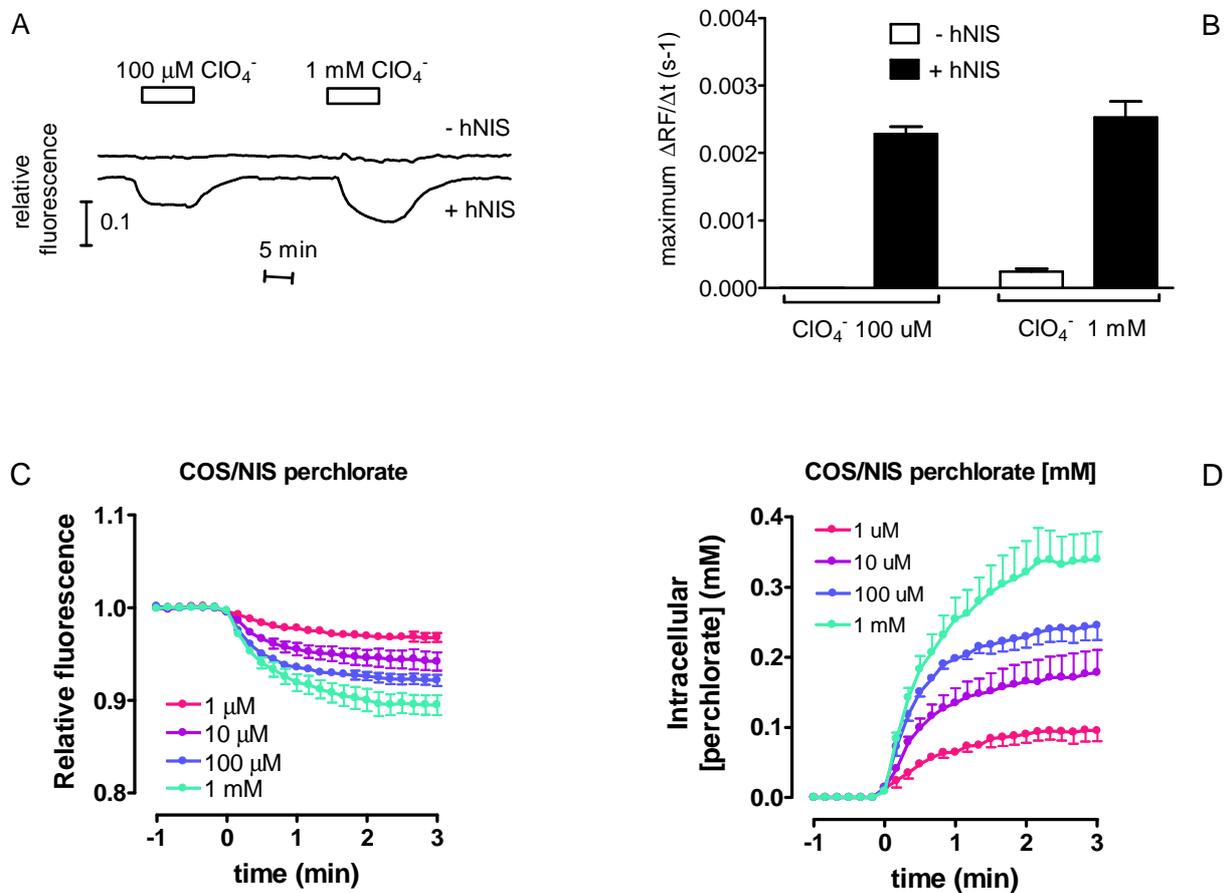


Figura 21: Effetto del ClO_4^- sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule COS-7 cotrasfettate con il cDNA per hNIS. Relazione tra la concentrazione extra ed intracellulare di ClO_4^-

(A) I tracciati mostrano l'effetto del ClO_4^- 100 μM e 1 mM sull'emissione di fluorescenza in cellule COS-7 48-72 ore dopo la cotrasfezione con il cDNA per hNIS (+hNIS) o con un vettore vuoto (-hNIS). La fluorescenza relativa è stata calcolata rispetto al suo valore iniziale (a riposo). Il tracciato sopra riportato è rappresentativo della classe di esperimenti eseguiti.

(B) Velocità massima di variazione della fluorescenza ($\Delta\text{RF}/\Delta t$) indotta da ClO_4^- 100 μM e 1 mM in cellule COS-7, 48-72 ore dopo la cotrasfezione con il cDNA per hNIS (+hNIS) o con un vettore vuoto (-hNIS). Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti.

(C) Effetto dell'esposizione a ClO_4^- extracellulare 1-1000 μM sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule COS-7 48-72 ore dopo la cotrasfezione con il cDNA per hNIS. I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti. La fluorescenza è stata calcolata rispetto al suo valore iniziale a riposo (Relative Fluorescence).

(D) Effetto dell'esposizione a ClO_4^- extracellulare 1-1000 μM sulla concentrazione intracellulare di ClO_4^- , calcolata a partire dai tracciati riportati nel pannello C ed utilizzando nella conversione un valore della K_{ClO_4} (costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per il ClO_4^- intracellulare) pari a 2.7 mM . I simboli e le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* di $n = 4-6$ esperimenti distinti.

4.3.5. VELOCITÀ DI TRASPORTO DI I^- E ClO_4^- IN CELLULE FRTL-5 ED IN CELLULE COS-7 CHE ESPRIMONO hNIS

Le cellule FRTL-5, che esprimono stabilmente la YFP-H148Q/I152L, e le cellule COS-7, 48-72 ore dopo costrazione con il cDNA per YFP-H148Q/I152L e alternativamente per hNIS o con un vettore vuoto, sono state esposte a diverse concentrazioni di extracellulari di I^- e ClO_4^- comprese tra 1 e 1000 μM . I valori della velocità iniziale di influsso (*influx rate*) per lo I^- ed il ClO_4^- sono stati calcolati per i diversi tipi cellulari (Figura 22). Come costanti di affinità della YFP-H148Q/I152L per lo I^- ed il ClO_4^- (K_I e K_{ClO_4}) sono stati utilizzati nel calcolo rispettivamente i valori di 3.5 e 2.7 mM (misurati con le curve di calibrazione intracellulare a pH_i 7.0 e $[Cl^-]_i$ 15 mM riportate nei paragrafi precedenti). Per le cellule COS-7 sono state utilizzate nel calcolo le stesse costanti (considerando tipici valori fisiologici di pH e Cl). Le cellule che esprimono NIS (FRTL-5 e COS-7 +hNIS) hanno mostrato una capacità di trasporto sia di I^- sia di ClO_4^- nel medesimo *range* μM . Le costanti di affinità del NIS stimate per il trasporto di I^- risultano pari a 35 μM per le FRTL-5 e intorno a 10 μM per le COS-7 +hNIS, quest'ultimo valore è consistente con quanto riportato da Van Sande *et al.* (169). Quelle per il ClO_4^- , nelle FRTL-5 e nelle COS-7 +hNIS risultano intorno o di poco inferiori a 10 μM . L'affinità del NIS per il trasporto di ClO_4^- è risultata circa pari o un poco superiore a quella per lo I^- nei due modelli cellulari considerati. Nelle cellule che esprimono NIS le velocità iniziali di influsso di ClO_4^- sono risultate tuttavia 3-6 volte inferiori a quelle stimate per lo I^- ad ogni concentrazione testata.

Le cellule che non esprimono NIS non hanno mostrato un influsso misurabile di I^- o ClO_4^- nel *range* μM (un piccolo trasporto è stato rilevato solamente nel *range* mM).

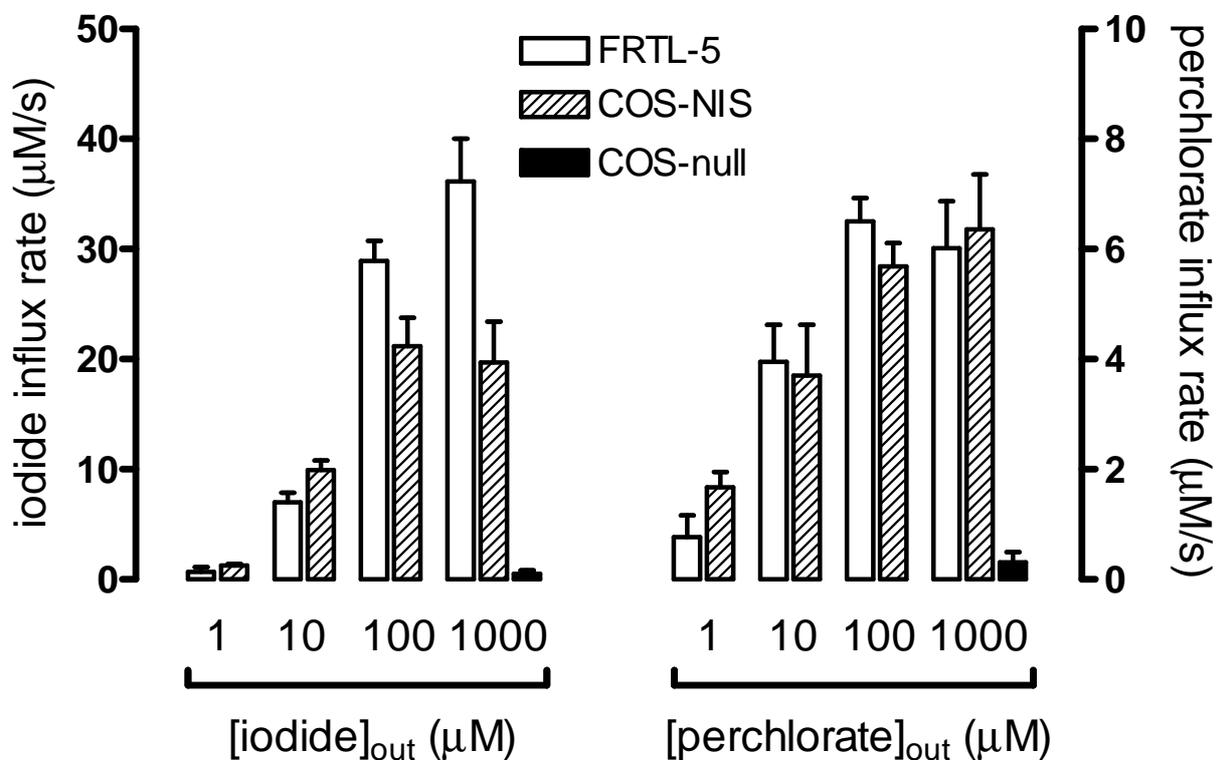


Figura 22: Velocità di ingresso di I^- e ClO_4^- in cellule FRTL-5 ed in cellule COS-7 cotrasfettate con hNIS.

Le cellule FRTL-5 qui utilizzate esprimono stabilmente YFP-H148Q/I152L. Le cellule COS-7 +hNIS sono state esaminate 48-72 ore dopo cotrasfezione con i cDNA per YFP-H148Q/I152L e hNIS (*human NIS*). Le cellule COS-7-NULLE sono state esaminate 48-72 ore dopo cotrasfezione con il cDNA per YFP-H148Q/I152L ed un vettore vuoto.

Le barre rappresentano la media \pm l'errore *standard* della velocità iniziale di ingresso di I^- e ClO_4^- di $n = 4-6$ esperimenti distinti.

Le cellule sono state esposte ad un *range* di concentrazioni di I^- e ClO_4^- extracellulare di 1-1000 μM . Le variazioni della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L sono state monitorate e convertite in termini di variazione della concentrazione intracellulare di I^- e ClO_4^- . Per la conversione sono stati assunti un valore di K_I pari a 3.5 mM e di K_{ClO_4} pari a 2.7 mM. La figura riporta le corrispondenti stime della velocità iniziale di ingresso di I^- e ClO_4^- alle diverse concentrazioni e per i diversi tipi cellulari. Nel lato sinistro sono riportati i valori di velocità di ingresso per lo I^- , a destra i valori per il ClO_4^- . Per facilitare il confronto la scala del ClO_4^- a destra è stata allargata di 5 volte rispetto alla scala a sinistra per lo I^- .

4.4. BREVE SINTESI DEI RISULTATI SPERIMENTALI

Sezione prima: sviluppo del saggio a fluorescenza

La proteina fluorescente YFP-H148Q/I152L si è dimostrata un efficace biosensore per il trasporto di Γ in cellule che esprimono NIS.

Le variazioni di fluorescenza indotte dall'esposizione a Γ in cellule tiroidee sono delle misure dell'attività del NIS, in accordo a specifici criteri: affinità μM per lo Γ extracellulare, dipendenza dal gradiente di Na^+ , dipendenza dall'ormone TSH, inibizione specifica del trasporto di Γ con ClO_4^- .

Le variazioni di fluorescenza indotte dallo Γ extracellulare sono state confermate in un sistema ricombinante (cellule COS-7 trasfettate con YFP-H148Q/I152L +/- NIS).

Le misure sono riproducibili all'interno di un singolo esperimento ed è possibile apprezzare le differenze nelle cinetiche di trasporto in singole cellule ed in tempo reale.

Sezione seconda: quantificazione dell'*uptake* di Γ

La sensibilità della YFP-H148Q/I152L agli alogenuri ed al pH è stata determinata in soluzione e all'interno dei tireociti per consentire la quantificazione dell'*uptake* di Γ .

Le stime di pH_i e di $[\text{Cl}^-]_i$ in cellule FRTL-5 sono pari rispettivamente a 7.08 ± 0.05 e 14 mM .

A valori di pH_i e di $[\text{Cl}^-]_i$ fisiologici ($\text{pH} = 7.0$, $\text{Cl}^- = 15 \text{ mM}$) la costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per lo Γ (K_I) è pari a 3.5 mM .

Concentrazioni elevate di Cl^- intracellulare o pH_i più basici tendono a diminuire l'affinità della YFP-H148Q/I152L per lo Γ . Tuttavia le variazioni di pH_i non alterano significativamente la

selettività della YFP-H148Q/I152L per lo I^- rispetto al Cl^- . Il rapporto tra K_{Cl^-} e K_{I^-} della YFP-H148Q/I152L si mantiene circa pari a 20, in un ampio *range* di pH fisiologici (Tabella1).

Le cellule tiroidee FRTL-5 concentrano 60-70 volte lo I^- nel citoplasma quando sono esposte a concentrazioni di I^- extracellulare nel *range* basso μM .

Sezione terza: misure del trasporto di ClO_4^-

La proteina fluorescente YFP-H148Q/I152L ha mostrato un'elevata affinità per il ClO_4^- , ossia un'affinità simile a quella per lo I^- in condizioni fisiologiche. La K_{ClO_4} calcolata dalla curva di calibrazione intracellulare è pari a 2.7 mM (pH = 7.0, Cl^- = 15 mM).

L'esposizione a concentrazioni μM di ClO_4^- extracellulare induce delle risposte reversibili nella fluorescenza delle cellule FRTL-5. Queste risposte, che non coinvolgono variazioni del pH_i e del $[Cl^-]_i$, suggeriscono un'interazione diretta tra la YFP-H148Q/I152L ed il ClO_4^- nel citoplasma.

Il trasporto di ClO_4^- è mediato dal NIS, come evidenziato dalle risposte di fluorescenza in presenza di concentrazioni μM di ClO_4^- in cellule che esprimono NIS endogeno o ricombinante.

Il trasporto è inoltre dipendente dal gradiente di Na^+ .

In cellule FRTL-5 l'affinità del NIS per il trasporto di ClO_4^- appare maggiore di quella per lo I^- , tuttavia le velocità iniziali di influsso misurate per il ClO_4^- sono in confronto sensibilmente inferiori (per ogni concentrazione testata).

CAPITOLO V

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano l'utilità della YFP-H148Q/I152L come biosensore cellulare per il trasporto e l'accumulo dello ioduro mediato dal NIS, sia in cellule tiroidee che in cellule non tiroidee sottoposte a trasferimento genico. Il saggio di fluorescenza descritto è sensibile e consente di monitorare in tempo reale le rapide variazioni dello ioduro intracellulare, nonché di quantificare l'effettiva concentrazione dello ioduro accumulato nel citoplasma. Le variazioni di fluorescenza indotte dallo ioduro sono reversibili e riproducibili e questo consente di misurare facilmente gli effetti acuti di farmaci o di altre manipolazioni sulle cinetiche di trasporto.

La presente ricerca ha dimostrato inoltre la possibilità di utilizzare la YFP-H148Q/I152L come biosensore per il perchlorato ed ha permesso di chiarire le controversie circa il trasporto e l'accumulo mediato dal NIS di questo agente antitiroideo nel citoplasma dei tireociti.

Il saggio inoltre può essere eseguito su cellule singole e può rilevare le differenze nell'attività dei trasportatori di ioduro all'interno di una popolazione cellulare.

5.1. VALIDAZIONE DEL NUOVO METODO

Le variazioni indotte dallo ioduro nella fluorescenza della YFP-H148Q/I152L rispondono a specifici criteri che indicano un trasporto di ioduro mediato da NIS.

Questi criteri sono:

1. la sensibilità a concentrazioni μM di ioduro extracellulare;
2. l'effetto inibitorio del perclorato;
3. la dipendenza dal gradiente di sodio;
4. la regolazione da parte dell'ormone TSH.

Lo ioduro extracellulare provoca un decremento della fluorescenza in cellule FRTL-5 che esprimono YFP-H148Q/I152L, con una dipendenza dalla concentrazione bifasica e con costanti di affinità rispettivamente di $35 \mu\text{M}$ e $> 1 \text{ mM}$.

Secondo misure elettrofisiologiche delle correnti indotte da ioduro in cellule FRTL-5 o in cellule non tiroidee trasfettate con NIS e secondo gli studi di *uptake* con ioduro ^{125}I , la K_m del NIS per lo ioduro è in effetti circa pari a $30 \mu\text{M}$ (9, 14, 168, 170).

In questo studio le esposizioni a ioduro sono state effettuate isotonicamente, sostituendo l' NaCl extracellulare con NaI equimolare. Per soluzioni contenenti ioduro $< 1 \text{ mM}$ la sostituzione di NaCl con NaI non provoca che variazioni trascurabili nella concentrazione di cloruro e gli effetti sulla fluorescenza possono essere attribuiti soltanto all'accumulo di ioduro. Tuttavia le soluzioni che contengono concentrazioni di ioduro $> 1 \text{ mM}$ presentano una ridotta concentrazione di cloruro e le variazioni di fluorescenza riflettono gli effetti combinati dell'influsso di ioduro e dell'efflusso di cloruro (scambio I/Cl^-). La componente ad alta affinità delle variazioni di fluorescenza indotte da ioduro μM è quindi consistente con un influsso di ioduro tramite il NIS,

mentre la componente a bassa affinità attivata da ioduro mM può riflettere uno scambio I/Cl attraverso altri canali o trasportatori.

L'inibizione del NIS mediata dal perclorato o dalla rimozione del sodio extracellulare previene i decrementi di fluorescenza indotti da basse concentrazioni di ioduro (<1 mM) nelle cellule FRTL-5. Queste osservazioni sono consistenti con l'inibizione dell'*uptake* di ioduro e delle correnti indotte da ioduro in cellule FRTL-5 (o in cellule non tiroidee trasfettate con NIS) che abbiano subito le stesse manipolazioni (9, 14, 168, 170, 27, 28).

Il perclorato, inoltre, provoca la perdita dello ioduro radioattivo accumulato in cellule FRTL-5 (170) e nel presente studio causa una reversione nei cambiamenti di fluorescenza indotti dallo ioduro.

In assenza di organificazione dello ioduro l'esposizione a perclorato provoca la fuoriuscita dello ioduro dalla ghiandola tiroidea *in vivo*: questo fenomeno è alla base del "ClO₄⁻ discharge test", utilizzato per individuare nei pazienti eventuali difetti di organificazione dello ioduro (22).

Il TSH è il principale ormone capace di regolare le funzioni della ghiandola tiroidea: è proprio l'attivazione dei recettori del TSH che nelle cellule follicolari provoca la sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei. Il TSH è necessario per mantenere la capacità delle cellule FRTL-5 di accumulare e concentrare ioduro nel citoplasma e la rimozione dell'ormone dal terreno per una settimana provoca una perdita di questa capacità, come dimostrato da studi di *uptake* con ¹²⁵I (170). Il TSH regola l'*uptake* di ioduro tramite meccanismi trascrizionali, e post trascrizionali che includono la regolazione della trascrizione dell'mRNA di NIS, la sintesi della proteina stessa, l'indirizzamento e la ritenzione del trasportatore sulla membrana plasmatica (37, 41). I risultati del presente studio sono in accordo con gli effetti riportati sull'attività per il TSH sul NIS. La rimozione del TSH dal mezzo di coltura delle cellule FRTL-5 per 7 giorni provoca una

perdita pressoché completa della risposta della YFP-H148Q/I152L a ioduro 100 μ M, ossia ad una concentrazione di ioduro selettiva per il trasporto mediato da NIS.

La specificità dei cambiamenti mediati dal NIS nella fluorescenza cellulare della YFP-H148Q/I152L è stata ulteriormente confermata in cellule COS-7 che esprimono hNIS ricombinante. Le cellule, cotrasfettate transientemente con i cDNA di hNIS e YFP-H148Q/I152L, hanno mostrato un decremento (sensibile al perclorato) della fluorescenza in risposta a ioduro 100 μ M, mentre le cellule trasfettate soltanto con YFP-H148Q/I152L non hanno mostrato alcuna risposta. Questi risultati sono in accordo con la dimostrazione di un trasporto di 125 I inibibile con perclorato in cellule COS-7 trasfettate con hNIS (11).

Le risposte a ioduro nelle cellule COS-7 che esprimono NIS e YFP-H148Q/I152L sono risultate minori di quelle in cellule FRTL-5, suggerendo un livello di espressione inferiore e /o una minore attività di NIS nel sistema eterologo.

Le misure di pH_i in cellule FRTL-5 con BCECF (non sensibile agli alogenuri) dimostrano che lo ioduro extracellulare di per sé non altera il pH_i (pH intracellulare) confermando che la soppressione della fluorescenza cellulare della YFP-H148Q/I152L in presenza di ioduro extracellulare non è dovuta ad un effetto indiretto (alterazione del pH citoplasmatico) ma è evidentemente dovuta all'interazione diretta tra la proteina fluorescente e l'anione.

5.2. DALLE VARIAZIONI DI FLUORESCENZA ALLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE

Calibrazioni intracellulari della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L

Le proteine YFP sono sensibili al pH, dato che risentono della protonazione dell'estremità fenolica del cromoforo triaminoacidico (153). Questa caratteristica può essere sfruttata per monitorare il pH citoplasmatico e degli organelli in cellule singole (141, 147). Tuttavia, nel saggio qui sviluppato, questa proprietà rappresenta un aspetto potenzialmente delicato, poiché apre alla possibilità che eventuali perturbazioni del pH_i alterino le risposte di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte dallo ioduro. I meccanismi tramite i quali le variazioni del pH o il legame agli alogenuri perturbano la fluorescenza delle YFP sono strettamente collegati. Difatti è stata osservata un'interazione cooperativa positiva tra l'alogenuro ed il protone: il legame dell'alogenuro sembrerebbe facilitare la protonazione e vice versa (153). Gli alogenuri, in effetti, sopprimono la fluorescenza delle varianti YFP legandosi ad un unico sito vicino al cromoforo, alterandone l'ambiente elettrostatico e producendo un cambiamento nella pK_a apparente (153, 148). Utilizzando la YFP-H148Q/I152L come sensore citoplasmatico è dunque opportuno effettuare dei controlli (misure indipendenti del pH_i), poiché alcuni trattamenti con farmaci o altre manipolazioni volte ad alterare l'attività del NIS o di altri trasportatori per lo ioduro potrebbero indirettamente modificare le risposte all'anione alterando il pH_i . Inoltre anche le variazioni fisiologiche (tra diversi cloni o linee cellulari) del pH_i o della concentrazione intracellulare di cloruro potrebbero esercitare un'influenza sulle misure effettuate con la variante YFP-H148Q/I152L. In particolare, è opportuno tener conto di tali influenze qualora si intenda quantificare accuratamente l'effettiva concentrazione di ioduro intracellulare sia per valutare

l'effetto di un trattamento farmacologico sul trasporto dell'anione che per confrontare modelli cellulari differenti o semplicemente diverse condizioni di coltura. A tale scopo sono state realizzate le curve di calibrazione della YFP-H148Q/I152L al variare di questi parametri singolarmente ed in combinazione, all'interno di *range* fisiologici.

Le misure di pK_a e K_I , effettuate dapprima in soluzione su lisati di tireociti, sono risultate compatibili con le osservazioni precedenti su YFP-H148Q/I152L purificata da *E. coli* (163) e con l'ipotesi di un legame cooperativo alogenuro-anione nella cavità di *binding* (153). Volendo però tenere conto anche dell'effetto di una matrice complessa come il citoplasma di cellule di mammifero, si è ritenuto opportuno eseguire misure di calibrazione intracellulari direttamente in tireociti intatti, permeabilizzati selettivamente con specifici ionofori. All'interno delle cellule FRTL-5 la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L viene repressa da cloruro e ioduro in modo pH-dipendente. La sensibilità della YFP-H148Q/I152L diminuisce all'aumentare del pH per entrambi gli alogenuri, tuttavia la selettività ioduro *vs* cloruro non dipende dal pH e si mantiene costante con un valore circa pari a 20 (entro un *range* di pH intracellulare tra 6.8 e 7.4). Questi risultati, assieme all'osservazione che l'affinità della YFP-H148Q/I152L per lo ioduro tende a diminuire in presenza di concentrazioni crescenti di cloruro, sono consistenti con la competizione per uno stesso sito di legame dei due alogenuri.

La YFP-H148Q/I152L purificata da *E. coli* mostra una selettività per lo ioduro maggiore di 40 volte, con costanti di affinità di 1.9 mM per lo ioduro e 85 mM per il cloruro a pH 7.35 (163). La minore selettività osservata in cellule FRTL-5 per lo ioduro *vs* cloruro (circa 20) potrebbe riflettere una modulazione delle proprietà di fluorescenza dovuta all'ambiente intracellulare delle cellule di mammifero. Questo sottolinea ulteriormente l'importanza di effettuare calibrazioni intracellulari dei sensori per ioni.

In conclusione, un qualsiasi farmaco, capace ad esempio di provocare una variazione del pH intracellulare di 0.2 unità o di raddoppiare la concentrazione intracellulare di cloruro, potrebbe provocare una variazione del 15-20% dell'intensità di fluorescenza a prescindere dagli effetti sul trasporto di ioduro. In un protocollo di *screening* per individuare farmaci capaci di modulare i flussi di ioduro, questa eventualità dovrebbe essere affrontata prevedendo controlli indipendenti (testando l'effetto del farmaco sulla fluorescenza cellulare della YFP-H148Q/I152L o del BCECF prima dell'esposizione a ioduro).

Le perturbazioni sopra menzionate ($\Delta\text{pH} = 0.2$ unità, raddoppio del $[\text{Cl}^-]_i$), qualora presenti, produrrebbero variazioni intorno al 30% anche nel valore della K_I (costante di affinità per lo ioduro) in cellule FRTL-5, volendo tener conto di questo tipo di *bias* sarebbe quindi opportuno quantificare i valori $[\text{Cl}^-]_i$ o pH_i nelle specifiche condizioni di lavoro.

Concentrazione intracellulare di cloruro e pH_i

La concentrazione intracellulare di cloruro in cellule FRTL-5 è stata stimata monitorando le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in seguito alla rimozione del cloruro extracellulare (e di conseguenza di quello intracellulare), tenendo sempre in considerazione l'effetto (misurato indipendentemente) che la rimozione del Cl^- può provocare sul pH_i . Questo approccio è stato utilizzato per stimare la concentrazione intracellulare di cloruro in cellule HEK 293 Phoenix, che esprimono il canale anionico pendrina e la variante della YFP EYFP (183).

Per un dato livello di espressione della YFP-H148Q/I152L la fluorescenza a riposo riflette un bilanciamento tra la concentrazione intracellulare di cloruro ed il pH_i . Dal momento che la rimozione del cloruro può alterare il pH_i , l'effetto di un *medium* privo di cloruro sul pH_i è stato determinato indipendentemente, utilizzando come sonda BCECF. Il pH_i delle cellule FRTL-5

misurato con BCECF è risultato circa pari a 6.94, ed aumenta di 0.17 unità durante la perfusione con un *buffer* privo di cloruro. Le misure riportate in letteratura del pH_i in cellule FRTL-5 eseguite con la sonda BCECF forniscono stime di pH_i compresi tra 7.1 e 7.6 (184, 185, 186). Questa variabilità probabilmente è dovuta a differenze nelle condizioni di coltura delle cellule e nella composizione del *medium* durante le misure di pH_i . L'aumento del pH_i in cellule private del cloruro potrebbe essere il riflesso dell'attività di uno scambiatore Cl^-/base (probabilmente uno scambiatore Cl^-/OH^- , dato che gli esperimenti sono stati condotti in una soluzione priva della ione HCO_3^-). Un possibile candidato è proprio SLC26A4 (pendrina), che viene espresso nelle cellule FRTL-5 (2) ed è capace di scambiare cloruro e OH^- (4). Difatti le cellule HEK-293 che esprimono la pendrina, se mantenute in un *medium* privo di HCO_3^- , rispondono alla rimozione di cloruro con un aumento del pH_i di approssimativamente 0.2 unità (4). Altri trasportatori capaci di mediare lo scambio cloruro/ OH^- includono SLC26A3 (187) e SLC26A6 (188), tuttavia la loro presenza nelle cellule tiroidee non è stata al momento riportata.

La perfusione di cellule FRTL-5 che esprimono YFP-H148Q/I152L con un *medium* privo di cloruro ha provocato un notevole incremento della fluorescenza a riposo (pari circa al 50%). Tale incremento riflette dunque un aumento del pH_i come pure una perdita del cloruro intracellulare. Sottraendo a tale incremento il contributo dato dall'aumento del pH_i e attribuendo l'effetto residuo alla fuoriuscita di Cl^- , il cloruro intracellulare in cellule FRTL-5 a riposo è stato stimato circa pari a 14 mM. Il potenziale a riposo della membrana delle cellule tiroidee follicolari è compreso tra -60 e -70 mV (189, 190), suggerendo che la concentrazione intracellulare di cloruro è in effetti pari o poco superiore al suo equilibrio elettrochimico secondo l'equazione di Nernst. Questa misura è consistente anche con i valori riportati per le attività del cloruro cellulare nelle ghiandole tiroidee di tartaruga (tra 12.6 e 17.0 mM) misurate con microelettrodi ione-selettivi (191). Il valore calcolato nel presente lavoro è inoltre assai simile alle stime di concentrazione

intracellulare di cloruro nelle ghiandole tiroidee di roditori (192) effettuate utilizzando radioisotopi (14 mM).

Quantificazione dell'accumulo di ioduro in cellule FRTL-5

Lo ioduro extracellulare induce una diminuzione concentrazione-dipendente della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in cellule FRTL-5 che, come riportato, è dovuta all'influsso di ioduro tramite il NIS. Disponendo delle stime di pH_i e di cloruro intracellulare le variazioni di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte dallo ioduro possono essere convertite in variazioni assolute di concentrazione di ioduro, utilizzando un appropriato valore della costante di affinità della YFP-H148Q/I152L per lo ioduro. Il valore della costante può essere scelto tra quelli calcolati grazie alle curve di calibrazione intracellulare costruite ($K_I = 3.5$ mM a pH 7 e di presenza di cloruro 15 mM, per le FRTL-5). Le risposte di fluorescenza a concentrazioni di ioduro selettive per un trasporto mediato dal NIS (una volta convertite in termini di variazione della concentrazione di ioduro intracellulare) permettono il calcolo della K_m e della V_{max} espressa in termini di $\mu\text{M/s}$.

La velocità iniziale di influsso dello ioduro mostra una cinetica di saturazione rispetto alla concentrazione extracellulare di ioduro, con una K_m pari a 28 μM e consistente con i valori di K_m compresi tra 27 e 36 μM riportati per l'*uptake* di ^{125}I in cellule FRTL-5 ed in cellule non tiroidee trasfettate con NIS (9, 168, 170).

Anche la concentrazione intracellulare di ioduro in prossimità dell'equilibrio aumenta iperbolicamente con la concentrazione di ioduro extracellulare, raggiungendo nelle FRTL-5 un livello massimo pari a 3 mM. Questo livello di equilibrio riflette il bilanciamento tra l'influsso

mediato dal NIS saturato e l'efflusso che a questa concentrazione dovrebbe essere efficacemente mediato dalla pendrina (71, 2) ed eventualmente da altri canali o trasportatori.

In presenza di basse concentrazioni di ioduro extracellulare ($>100 \mu\text{M}$), ossia a concentrazioni più vicine ai tipici valori plasmatici di $0.1-0.5 \mu\text{M}$, lo ioduro viene concentrato nelle cellule FRTL-5 60-70 volte rispetto alla concentrazione esterna dopo appena 5 minuti dall'esposizione.

Il valore del rapporto tra le concentrazioni intra ed extracellulari riportato da Weiss *et al.* 1984, ottenuto tramite misure di *uptake* di ioduro radioattivo, è pari a 30 (171). A tal proposito è però opportuno ricordare che le misure effettuate con radioisotopi necessitano di una fase di lavaggio delle cellule per rimuovere la radioattività extracellulare prima della misura. Nel intervallo di tempo che trascorre si può avere un efflusso di una frazione non trascurabile dello ioduro intracellulare. Inoltre per convertire l'attività misurata in termini di concentrazione è necessaria anche una stima del volume cellulare. Questi fattori possono giustificare la differenza con la misura più diretta ottenuta utilizzando la sonda intracellulare fluorescente YFP-H148Q/I152L ed il saggio qui descritto.

5.3. LA YFP-H148Q/I152L COME BIOSENSORE PER IL TRASPORTO DI PERCLORATO

Il perclorato è il più potente agente antitiroideo, nonché un diffuso contaminante ambientale. I sali di perclorato sono utilizzati nel propellente per missili, nei fuochi d'artificio e nei fertilizzanti. Il perclorato risulta essere un contaminante delle acque potabili, superficiali e di falda in diversi Stati americani, con concentrazioni comprese tra i 4 e i 18 ug/litro (194, 195). Queste osservazioni hanno sollecitato l'interessamento di diverse agenzie regolatorie negli Stati Uniti. La dose ingerita giornalmente tramite le acque risulta essere considerevolmente inferiore alle dosi un tempo utilizzate per il trattamento dell'ipertiroidismo (centinaia di milligrammi), tuttavia l'elevata sensibilità del NIS al perclorato è stata chiaramente dimostrata nella tiroide: una bassa dose pari a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{die}$ somministrata a volontari sani per 14 giorni diminuisce significativamente l'accumulo di ioduro radioattivo nella tiroide (196).

La dose limite per il perclorato (RfD, Reference Dose) indicata dalla National Academy of Science (NAS) è di 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$ (197) ed è circa 20 volte meno stringente di quella indicata dall'EPA (Environmental Protection Agency) (194). Nel caso di acque potabili particolarmente contaminate da perclorato (18 $\mu\text{g}/\text{l}$) questa dose può essere assunta da un adulto che consumi 2 litri di acqua (circa 400 nmoli). Si consideri per confronto che la dose giornaliera di ioduro consigliata per una gestante è pari circa a 200 μg ossia 1-2 μ moli (202) e che le normali concentrazioni plasmatiche di ioduro sono pari a 50-300 nM (3). E' tuttavia opportuno ricordare che anche altri inibitori competitivi del trasporto di ioduro *via* NIS, come NO_3^- e SCN^- , presenti nei cibi e nelle acque potabili a concentrazioni anche superiori possono esercitare un'azione antitiroidea certamente non trascurabile (202).

Si è ritenuto a lungo che il perclorato fosse trasportato attraverso il NIS all'interno delle cellule follicolari tiroidee (17, 25). La possibilità che il perclorato venga trasportato nelle cellule tiroidee follicolari è però ancora materia di ipotesi e questione di dibattito (169, 28). Infatti, mentre diversi anioni, quali ClO_3^- , SCN^- , SeCN^- , NO_3^- , Br^- , BF_4^- , IO_4^- , BrO_3^- (14), inducono una corrente elettrica continua entrante negli oociti di *Xenopus laevis* che esprimono NIS, il perclorato non è in grado di generare correnti. Ciò sembra suggerire che il perclorato non sia traslocato all'interno degli oociti, anche se non può essere escluso un trasporto elettroneutro. E' stato suggerito che gli esperimenti condotti con radioisotopi (^{36}Cl -perclorato), dove appare chiaro il trasporto all'interno delle cellule (17), siano stati male interpretati: dato che il clorato è un sottoprodotto della reazione impiegata per sintetizzare chimicamente il perclorato e, visto che il clorato è certamente traslocato dal NIS nella cellula (26, 14), sarebbe quest'ultimo, piuttosto che il perclorato, a render conto della presenza di radioattività nel citosol dei tireociti.

Poiché il perclorato non induce correnti entranti neppure in cellule FRTL-5 (27) o in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells) che esprimano stabilmente NIS (28) è stato suggerito che il perclorato non venga trasportato attraverso il NIS nelle cellule e che agisca più come un bloccante che come substrato (28).

La possibilità di utilizzare la YFP-H148Q/I152L come sensore intracellulare per il trasporto del perclorato è stata sostenuta dall'osservazione che alcune varianti delle YFP possono legare nella cavità di legame per gli alogenuri anche altri grossi anioni (153). Ad esempio, per la variante YFP-H148Q è stata riportata una costante di affinità per il perclorato pari a circa 20 mM (148), ossia dello stesso ordine di grandezza della costante di affinità di questa variante per lo ioduro. La sensibilità della YFP-H148Q/I152L per il perclorato misurata con una curva di calibrazione intracellulare realizzata in tireociti selettivamente permeabilizzati, è risultata sorprendentemente

elevata e persino superiore, seppur di poco, alla sensibilità misurata per lo ioduro nelle stesse condizioni ($K_{\text{ClO}_4} = 2.7 \text{ mM}$; $K_{\text{I}} = 3.5 \text{ mM}$, a pH 7 e in presenza di cloruro 15 mM). Questo dato consente di definire la YFP-H148Q/I152L come sensore per la concentrazione di perclorato, con una sensibilità in condizioni fisiologiche superiore a quella per gli alogenuri stessi (ioduro o cloruro). Tuttavia, per dimostrare l'efficacia della YFP-H148Q/I152L come biosensore per il trasporto cellulare del perclorato, è stato necessario verificare che il nuovo saggio rispondesse a determinati criteri. Questi criteri includono l'evidenza di risposte misurabili rapide (entro 30 s: $t_{1/2}$ risposta $\ll t_{1/2}$ *photobleaching*), riproducibili e completamente reversibili in seguito ad esposizione a basse concentrazioni extracellulari di perclorato (μM) in due modelli cellulari distinti, ovvero in cellule FRTL-5 e COS-7 trasfettate con hNIS.

L'ampiezza delle risposte di fluorescenza della YFP-H148Q/I152L indotte da perclorato risulta tuttavia sensibilmente inferiore in confronto all'ampiezza delle risposte indotte da ioduro alle stesse concentrazioni extracellulari e a parità di condizioni. Questa minor risposta suggerisce una ridotta capacità delle cellule di accumulare il perclorato (in altre parole un trasporto con cinetica differente) o più banalmente un possibile effetto indiretto del perclorato sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L intracellulare, ossia un effetto mediato da una diminuzione del pH_i o da un aumento del cloruro intracellulare. Quest'ultima ipotesi è stata vagliata con particolare attenzione, poiché, in preparati ottenuti a partire da tiroide di tartaruga, il perclorato parrebbe provocare un aumento proprio della concentrazione intracellulare di cloruro tramite un meccanismo non noto (191). Poiché le risposte indotte da perclorato 1 mM in cellule FRTL-5 incubate e mantenute alternativamente in *buffer* contenete cloruro o in *buffer* privo di cloruro presentano ampiezze e profili pressoché identici, è stato possibile escludere un effetto del perclorato sulla fluorescenza della YFP-H148Q/I152L mediato da un aumento del cloruro

intracellulare. I test effettuati su cellule FRTL-5 che non esprimono YFP-H148Q/I152L, caricate con la sonda per il pH BCECF e successivamente esposte a perclorato, hanno permesso di escludere d'altra parte un effetto sulla fluorescenza mediato da variazioni del pH_i .

E' dunque possibile concludere che nelle cellule FRTL-5 esposte a concentrazioni extracellulari di perclorato 1-1000 μM operi un meccanismo capace di trasportare l'anione contro gradiente elettrochimico all'interno del citoplasma. Nel citoplasma il perclorato lega direttamente e reversibilmente la YFP-H148Q/I152L con una K_{ClO_4} pari a 2.7 mM, sopprimendone la fluorescenza. Per stabilire se anche questo trasporto sia mediato dal NIS sono stati valutati gli specifici criteri descritti di seguito.

- Sensibilità a concentrazioni μM di ClO_4^- extracellulare

Come riportato il perclorato è uno dei più potenti inibitori competitivi del trasporto di ioduro mediato dal NIS con una costante di inibizione K_i tra 1.5 e 2 μM , misurata in una varietà di sistemi *in vivo* e *in vitro* (17, 19, 14, 9, 27, 28). Il meccanismo di inibizione, la similitudine di carica e del raggio ionico con lo ioduro suggeriscono che il perclorato, come pure altri inibitori, condividano lo stesso sito di interazione sulla molecola del NIS, rendendo consistente l'ipotesi che un eventuale trasporto del perclorato abbia affinità nell'ordine del μM col NIS.

La costante di affinità apparente per il trasporto osservato in cellule FRTL-5 esposte a perclorato 1-1000 μM è risultata in effetti circa pari a 10 μM . Inoltre, convertendo le risposte di fluorescenza in termini di concentrazione intracellulare di perclorato, si può osservare come la concentrazione intracellulare superi quella extracellulare già entro 1 minuto dall'esposizione. Questa osservazione è consistente con l'ipotesi di un trasporto attivo.

- Dipendenza dall' Na^+ extracellulare

Per gli anioni di cui si sia dimostrato un trasporto mediato dal NIS mediante *voltage clamp* è stata osservata una corrente compatibile con una stechiometria di cotrasporto di 2 Na^+ per 1 anione (14). La riduzione della concentrazione extracellulare di Na^+ da 145 a 5 mM ha causato una forte inibizione della risposta indotta da perclorato 1 mM in cellule FRTL-5, dimostrando la dipendenza di questo trasporto dal gradiente di Na^+ .

Si ricorda che l'esposizione ad anioni come perrenato e perclorato non induce alcuna corrente in linee cellulari modello che esprimono NIS studiate con metodi elettrofisiologici (27, 28). E' quindi possibile ipotizzare nelle cellule FRTL-5 un trasporto attivo di perclorato dipendente dal gradiente di Na^+ ma non elettrogenico.

- Trasporto di perclorato in cellule COS-7 trasfettate con hNIS

Per aver conferma che il trasporto di perclorato osservato sia effettivamente mediato dal NIS, piuttosto che da altri eventuali trasportatori Na^+ dipendenti, è stata esaminata la specificità dei cambiamenti nella fluorescenza cellulare della YFP-H148Q/I152L in cellule COS-7 che esprimono hNIS ricombinante. Le cellule cotrasfettate transientemente con i cDNA di hNIS e YFP-H148Q/I152L hanno mostrato un decremento della fluorescenza in risposta a perclorato 100 μM , mentre le cellule trasfettate soltanto con YFP-H148Q/I152L non hanno mostrato alcuna risposta. Questi risultati sono compatibili con la dimostrazione riportata in letteratura di un trasporto di altri ossianioni simili al perclorato (169) misurato con radioisotopi in cellule COS-7 trasfettate con hNIS.

I risultati riportati nel presente lavoro forniscono dunque delle evidenze dirette di un trasporto di perclorato Na^+ -dipendente ad alta affinità mediato da NIS. Questo trasporto permette di concentrare efficacemente il perclorato nel citoplasma dei tireociti.

Le costanti cinetiche del trasporto di perclorato e ioduro sono state calcolate e confrontate in due modelli cellulari distinti (NIS endogeno nelle FRTL-5 e ricombinante nelle COS-7). L'affinità stimata per il trasporto di perclorato è risultata pari o superiore a quella per lo ioduro in entrambi i sistemi cellulari. Tuttavia la velocità apparente di influsso di perclorato è risultata significativamente inferiore alla velocità di influsso per lo ioduro, sistematicamente e per ogni concentrazione testata in entrambi i modelli cellulari ed a parità di ogni altra condizione. In alcuni casi le misure di trasporto di perclorato e ioduro sono state effettuate letteralmente nelle stesse cellule durante uno stesso esperimento a distanza di pochi minuti, con esposizioni successive ai due anioni. Queste evidenze rafforzano l'ipotesi di un differente meccanismo di trasporto di perclorato mediato da NIS e sono senz'altro compatibili con l'ipotesi avanzata in precedenza di un trasporto elettroneutro di perclorato attraverso questo stesso cotrasportatore (198).

La conferma del trasporto e dell'accumulo contro gradiente di perclorato nel citoplasma dei tireociti, ed in generale in cellule che esprimono NIS, suggerisce che questo anione possa competere col trasporto e l'accumulo di ioduro non solo a livello dei follicoli tiroidei. E' infatti possibile che il perclorato competa col trasporto e l'accumulo di ioduro anche a livello di altri distretti, come le ghiandole salivari e la mucosa gastrica, che si ipotizza regolino l'assorbimento e la disponibilità dello ioduro garantendone il ricircolo enterotiroideo (48). In altre parole anche questi distretti potrebbero essere interessati da un accumulo di perclorato nel citoplasma.

Il dibattito circa il livello massimo accettabile di questo contaminante ambientale nelle acque potabili e dell'eventuale trasporto mediato da NIS è acceso dai maggiori rischi potenziali per il feto, il cui sviluppo neuronale corretto è particolarmente sensibile ai livelli di T4 circolante

materno (199), e per il neonato che sarebbe esposto al perclorato tramite il latte materno (200, 201). La ghiandola mammaria, infatti, esprime NIS durante la lattazione (47), quindi il neonato potrebbe ricevere una dose inferiore di ioduro per effetto dell'inibizione del perclorato a livello della ghiandola mammaria (201) e, allo stesso tempo, una quantità di perclorato capace di interferire con il successivo utilizzo dello ioduro ricevuto.

5.4. VANTAGGI ED APPLICAZIONI DEL NUOVO METODO

L'acquisizione di immagini di fluorescenza con YFP-H148Q/I152L consente di monitorare le rapide variazioni della concentrazione intracellulare di ioduro o perclorato nelle cellule FRTL-5. Nelle cellule FRTL-5 l'esposizione a ioduro o perclorato extracellulare provoca la diminuzione della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L entro 10-20 s. Gli studi effettuati con traccianti radioattivi misurano tipicamente l'*uptake* di ioduro o di altri analiti su periodi che vanno da pochi minuti a più di un'ora (9, 168, 169, 170) e sono inaccurati per intervalli di tempo inferiori, poiché richiedono la rimozione della radioattività extracellulare. Il saggio a fluorescenza qui sviluppato è quindi particolarmente utile per effettuare misure nei primi istanti dall'esposizione a ioduro, che difficilmente potrebbero essere studiati con radioisotopi.

I saggi basati su tecniche di *imaging* cellulare consentono misure su singole cellule e permettono di evidenziare eventuali differenze funzionali tra le cellule di una popolazione. In una popolazione di cellule FRTL-5 è stata infatti misurata una variazione di 3 volte nella velocità iniziale di influsso di ioduro tramite il NIS (misurata come $\Delta RF / \Delta t$) e una variazione di 2 volte nello ioduro accumulato nel citoplasma (misurata come ΔRF_{5min}), a concentrazioni costanti di ioduro extracellulare. Queste variazioni non sono correlate con la fluorescenza a riposo e ciò suggerisce che l'espressione della YFP-H148Q/I152L non influenza di per sé le cinetiche di trasporto.

Benché sia la fluorescenza della YFP-H148Q/I152L a riposo che le variazioni di fluorescenza indotte dallo ioduro siano entrambe influenzate dal pH, è piuttosto improbabile che le differenze di pH_i fisiologiche tra cellula e cellula possano rendere conto delle notevoli differenze tra le singole cellule nella fluorescenza a riposo, nel $\Delta RF / \Delta t$ e nel ΔRF_{5min} misurati.

La capacità di monitorare l'accumulo di ioduro in singole cellule può risultare utile per la caratterizzazione del trasporto di ioduro in colture primarie di tireociti umani, dove il numero di cellule disponibili da studiare risulta spesso limitante. Le colture primarie rappresentano infatti una popolazione eterogenea di fenotipi cellulari e l'espressione transiente di YFP-H148Q/I152L potrebbe consentire la caratterizzazione nell'attività dei trasportatori di ioduro in una popolazione di cellule con capacità eterogenea di accumulo di questo anione. Ad esempio, nella ghiandola tiroidea *in vivo* l'espressione di NIS non è uniforme: nel tessuto normale circa il 20-30% delle cellule follicolari appare immunoreattivo al NIS (86). Il saggio potrebbe essere efficacemente utilizzato anche per distinguere se un eventuale trattamento farmacologico sia in grado di aumentare l'attività specifica dei tireociti che già esprimono NIS piuttosto che modificare la percentuale delle cellule che esprimono il trasportatore. L'ostacolo principale nell'applicazione del saggio a fluorescenza a colture primarie risiede nella difficoltà di trasfezione presentata da queste cellule. Tuttavia questa difficoltà potrebbe essere superata utilizzando per il trasferimento genico un vettore virale: per esempio con un vettore adenovirale per l'espressione del gene *LacZ* in cellule tiroidee umane normali è stata riportata un'efficienza di trasduzione del 95% (175). Il trasferimento mediato da vettori adenovirali permetterebbe inoltre l'espressione tipo-cellulare specifica per le cellule tiroidee in colture primarie di tireociti umani, utilizzando il promotore per la tireoglobulina ed un sistema Cre/loxP (176). Dato che l'*imaging* cellulare consente di monitorare il trasporto e l'accumulo di ioduro nelle sole cellule che esprimono YFP-H148Q/I152L è necessaria un'elevata efficienza di trasduzione per assicurare che le cellule fluorescenti siano rappresentative dell'intera popolazione. L'espressione transiente della YFP-H148Q/I152L, mediata da vettori virali in colture primarie derivate da carcinomi

tiroidei, potrebbe consentire la caratterizzazione dei cambiamenti nell'attività di NIS nelle cellule neoplastiche.

Questo aspetto riveste una particolare rilevanza, considerando che circa il 33% dei tumori tiroidei metastatici e la totalità dei tumori anaplastici perdono la capacità di accumulare ioduro radioattivo (216, 207) ed al momento non sono disponibili trattamenti efficaci per i pazienti con queste forme tumorali aggressive.

I meccanismi che provocano una riduzione o addirittura l'assenza di attività del NIS nelle cellule tumorali possono essere diversi. Questi infatti sembrano includere pressoché tutti i passaggi che portano all'espressione della proteina attiva, ossia dalle alterazioni epigenetiche fino ad alterazioni dell'indirizzamento sulla membrana plasmatica. Sono state riportate infatti per tumori tiroidei alterazioni dello stato di metilazione del gene codificante NIS (87), riduzioni dell'espressione dei fattori di trascrizione (213, 211, 215, 212), decrementi o comunque alterazioni dei livelli di mRNA (85, 89, 91) ed anche alterazioni nella glicosilazione (91). Tuttavia, da studi di espressione e localizzazione, uno dei meccanismi che potrebbe avere un impatto particolarmente rilevante nella riduzione dell'attività del NIS nei tumori più aggressivi parrebbe essere proprio il *targeting* non corretto verso la membrana plasmatica (214). L'utilizzo del trasferimento genico di NIS per rendere diversi tipi di tumori sensibili alla terapia con iodio radioattivo sta quindi ricevendo un'attenzione crescente (177).

E' stato inoltre proposto l'impiego del NIS come *reporter* per l'*imaging* dell'espressione genica *in vivo* tramite scintigrafia (178), per valutare il successo nei trapianti di mioblasti (179) e per monitorare la migrazione delle cellule staminali (193).

L'*imaging* cellulare con YFP-H148Q/I152L potrebbe rivelarsi utile anche per un saggio *in vitro* attraverso cui stimare la percentuale di successo nel trasferimento genico del NIS tramite la misura della proporzione di cellule che effettivamente presentano un'attività mediata dal

trasportatore. Questo non è possibile utilizzando radioisotopi, poiché misurano l'*uptake* di ioduro in campioni contenenti migliaia di cellule di cui può essere studiato solamente il comportamento medio.

Il saggio di fluorescenza qui presentato potrebbe inoltre essere utile nel testare la capacità di promotori tessuto-specifici di indurre selettivamente l'espressione del NIS in specifici tipi cellulari. Per esempio l'espressione mirata del NIS è necessaria per la terapia genica del cancro per limitare la radioablazione con ^{131}I alle sole cellule maligne.

Inoltre la YFP-H148Q/I152L può essere utilizzata non soltanto per studiare il trasporto di ioduro tramite il NIS, ma anche per caratterizzare i percorsi di efflusso dell'anione. Il livello della fluorescenza all'equilibrio, in presenza di ioduro extracellulare, riflette il bilanciamento tra influsso ed efflusso di ioduro nella cellula. Bloccando l'ulteriore influsso di ioduro con un'aggiunta di perclorato o in alternativa rimuovendo lo ioduro extracellulare, si osserva il recupero della fluorescenza dovuto all'efflusso di ioduro. Diversi possono essere i percorsi che mediano l'efflusso di ioduro, tra questi si possono citare la pendrina (2), un'efflusso Ca^{+2} dipendente stimolato dal TSH (15), e un canale Cl^-/I^- attivato dal TSH/cAMP (180). Inoltre i tireociti esprimono trasportatori per il cloruro, come il CFTR (181) e CICC-5 (182), che potrebbero direttamente o indirettamente influenzare l'efflusso dello ioduro. La misura in tempo reale della concentrazione intracellulare di ioduro permette di quantificare le velocità di influsso ed efflusso nel corso di uno stesso esperimento ed eventualmente nella medesima cellula (cosa che non è possibile con i traccianti radioattivi), e questo può effettivamente facilitare la caratterizzazione dei percorsi di efflusso nelle cellule in coltura.

Il ruolo di specifici canali e trasportatori può essere studiato utilizzando inibitori farmacologici o modificando l'espressione genica con tecniche molecolari come l'*RNA interference*.

Visto che la YFP-H148Q/I152L consente misure di trasporto cellulare anche del perclorato, è possibile che la YFP-H148Q/I152L stessa o varianti diverse possano essere sviluppate per lo studio del trasporto di altri anioni di rilevanza biologica.

Una delle principali applicazioni dei saggi a fluorescenza nasce dalla loro adattabilità alle piattaforme *high-throughput* per lo *screening* di farmaci. Lo *screening* di una libreria combinatoriale di piccole molecole organiche con un saggio cellulare basato sulla YFP-H148Q/I152L ha consentito l'identificazione di nuove molecole capaci di correggere il processamento cellulare e la funzionalità del canale difettivo $\Delta F508$ -CFTR. Queste molecole potrebbero rivelarsi utili nel trattamento della fibrosi cistica, causata dalla mutazione $\Delta F508$ (174, 173).

Composti che favoriscono l'accumulo di ioduro nella tiroide attraverso l'aumento dell'espressione, dell'indirizzamento in membrana o dell'attività di NIS potrebbero essere utili nel ripristinare l'efficacia della terapia con ^{131}I in pazienti con tumori tiroidei non responsivi.

Il NIS nei tumori extratiroidei, quando è espresso, risulta prevalentemente intracellulare (172) e gli agenti che ne promuovano la localizzazione in superficie potrebbero essere utili nel rendere questi tumori suscettibili all'*imaging* e all'ablazione con iodio radioattivo. Inoltre i composti che inibiscono l'efflusso di ioduro potrebbero essere utili nell'aumentare la ritenzione dello ^{131}I nelle cellule tumorali tiroidee metastatiche e nelle cellule non tiroidee che esprimono NIS endogeno (tumori della mammella) o che esprimono NIS in seguito a terapia genica. In queste cellule l'assenza della struttura del follicolo e quindi dell'organificazione dello ioduro provoca una rapida perdita della radioattività cellulare, limitando perciò l'efficacia della radioterapia.

L'identificazione di composti che alterino le risposte indotte dallo ioduro in un saggio cellulare basato sulla YFP-H148Q/I152L dovrebbe essere seguita da *test* successivi per eliminare gli

eventuali falsi positivi. Questi saggi includono la misura del pH_i , per escludere cambiamenti della sensibilità della YFP-H148Q/I152L allo ioduro mediati da alterazioni del pH, e misure della fluorescenza della YFP-H148Q/I152L in soluzione, per escludere eventuali interazioni dirette del composto con la proteina fluorescente. Considerate queste precauzioni, lo *screening high-throughput* con YFP-H148Q/I152L potrebbe essere utile per identificare i composti capaci di modulare i flussi di ^{131}I nelle cellule bersaglio per la diagnosi ed il trattamento dei tumori tiroidei ed extra tiroidei.

In conclusione la YFP-H148Q/I152L rappresenta un promettente biosensore per lo studio dei trasportatori dello ioduro nonché uno strumento innovativo per investigare l'attività del NIS e identificare nuovi composti terapeutici per il trattamento del trasporto difettivo di ioduro.

BIBLIOGRAFIA

1. **Rodriguez AM., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart JM., Pourcher T.,** 2002, Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 3500-3503.
2. **Royaux IE., Suzuki K., Mori A., Katoh R., Everett LA., Kohn LD., Green ED.,** 2000, Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141, 839–845.
3. **Carrasco N.,** 1993, Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1154, 65-82.
4. **Soleimani M., Greeley T., Petrovic S., Wang Z., Amlal H., Kopp P., Burnham CE.,** 2001, Pendrin: an apical $\text{Cl}^-/\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in the kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F356-364.
5. **Scott DA., Karniski LP.,** 2000, Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278, C207-211.
6. **Cahmann HJ., Pommier J., Nunez J.,** 1977, Spatial requirement for coupling of iodotyrosine residues to form thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5333-5335.
7. **Virion A., Pommier J., Deme D., Nunez J.,** 1981, Kinetics of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis catalyzed by peroxidase: the role of H_2O_2 . *Eur J Biochem* 117, 103-109.
8. **De La Vieja A., Dohan O., Levy O., Carrasco N.,** 2000, Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 80, 1083-1105.
9. **Dai G., Levy O., Carrasco N.,** 1996, Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379, 458-460.
10. **Levy O., De la Vieja A., Ginter CS., Riedel C., Dai G., Carrasco N.,** 1998, N-linked glycosylation of the thyroid Na^+/I^- symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 273, 22657-22663.
11. **Smanik PA., Liu Q., Furminger TL., Ryu K., Xing S., Mazzaferri EL., Jhiang SM.,** 1996, Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 339-345.

12. **Smanik PA., Ryu KY., Theil KS., Mazzaferri EL., Jhiang SM.,** 1997, Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 138, 3555-3558.
13. **Gerard C., Gabrion J., Verrier B., Reggio H., Mauchamp J.,** 1985, Localization of the Na⁺/K⁺-ATPase and of an amiloride sensitive Na⁺ uptake on thyroid epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 38, 134-141.
14. **Eskandari S., Loo DD., Dai G., Levy O., Wright EM., Carrasco N.,** 1997, Thyroid Na⁺/I symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272, 27230-27238.
15. **Weiss SJ., Philp NJ., Grollman EF.,** 1984, Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by Ca²⁺. *Endocrinology* 114, 1108-1113.
16. **Halmi NS., Suelke RG.,** 1956, Problems of thyroidal self-regulation. *Metabolism* 5, 646-651.
17. **Wolff J.,** 1964, Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol Rev* 44, 45-90.
18. **Barker HM.,** 1936, The blood cyanates in the treatment of hypertension. *JAMA* 106, 762-767.
19. **Soldin OP., Braverman LE., Lamm SH.,** 2001, Perchlorate clinical pharmacology and human health: a review. *Ther Drug Monit* 23, 316-331.
20. **Martino E., Bartalena L., Bogazzi F., Braverman LE.,** 2001, The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocr Rev* 22, 240-254.
21. **Lawrence JE., Lamm SH., Pino S., Richman K., Braverman LE.,** 2000, The effect of short-term low-dose perchlorate on various aspects of thyroid function. *Thyroid* 10, 659-663.
22. **Hilditch TE., Horton PW., McCruden DC., Young RE., Alexander WD.,** 1982, Defects in intrathyroid binding of iodine and the perchlorate discharge test. *Acta Endocrinol (Copenh)* 100, 237-244.
23. **McCruden DC., Hilditch TE., Connell JM., McLellan AR., Robertson J., Alexander WD.,** 1987, Duration of antithyroid action of methimazole estimated with an intravenous perchlorate discharge test. *Clin Endocrinol (Oxf)* 26, 33-39.

24. **McDougall R., Cavalieri RR.**, 2000, *In vivo* radionuclide tests and imaging. *In: Braverman LE, Utiger R, eds. The thyroid: a fundamental and clinical text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 355–375.*
25. **Wolff J.**, 1998, Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev* 50, 89–105.
26. **Dohan O., De la Vieja A., Paroder V., Riedel C., Artani M., Reed M., Ginter CS., Carrasco N.**, 2003, The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24, 48-77.
27. **Yoshida A., Sasaki N., Mori A., Taniguchi S., Ueta Y., Hattori K., Tanaka Y., Igawa O., Tsuboi M., Sugawa H., Sato R., Hisatome I., Shigemasa C., Grollman EF., Kosugi S.**, 1998, Differences in the electrophysiological response to Γ and the inhibitory anions SCN^- and ClO_4^- , studied in FRTL-5 cells. *Biochim Biophys Acta* 1414, 231–237.
28. **Yoshida A., Sasaki N., Mori A., Taniguchi S., Mitani Y., Ueta Y., Hattori K., Sato R., Hisatome I., Mori T., Shigemasa C., Kosugi S.**, 1997, Different electrophysiological character of Γ , ClO_4^- , and SCN^- in the transport by Na^+/Γ symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 731–734.
29. **Verkhusha V.V., Lukyanov K.A.**, 2004, The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnology* 22, 289-296.
30. **Melikian HE., McDonald JK., Gun H., Rudnickn G., Moore KR., Blakely RD.**, 1994, Human Norepinephrine Transporter: biosynthetic studies using a site-directed polyclonal antibody. *J Biol Chem* 269, 12290-12297.
31. **Newman MJ., Foster DL., Wilson TH., Kaback HR.**, 1981, Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256, 11804-11808.
32. **Spitzweg C., Joba W., Morris JC., Heufelder AE.**, 1999, Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 9, 821-830.
33. **Ajjan RA., Watson PF., Findlay C., Metcalfe RA., Crisp M., Ludgate M., Weetman AP.**, 1998, The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol* 158, 351-358.
34. **Pekary AE., Levin SR., Johnson DG., Berg L., Hershman JM.**, 1997, Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the

expression and activity of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Interferon Cytokine Res* 17, 185-95.

35. **Rasmussen AK., Kayser L., Feldt-Rasmussen U., Bendtzen K.,** 1994, Influence of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-beta and interferon-gamma, separately and added together with interleukin-1 beta, on the function of cultured human thyroid cells. *J Endocrinol* 143, 359-365.
36. **Dumont JE., Jauniaux JC., Roger PP.,** 1989, The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci* 14, 67-71.
37. **Kogai T., Endo T., Saito T., Miyazaki A., Kawaguchi A., Onaya T.,**1997, Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 138, 2227-2232.
38. **Levy O., Dai G., Riedel C., Ginter CS., Paul EM., Lebowitz AN., Carrasco N.,** 1997, Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci* 94, 5568-5573.
39. **Paire A., Bernier-Valentin F., Selmi-Ruby S., Rousset B.,** 1997, Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. *J Biol Chem* 272, 18245-18249.
40. **Kaminsky SM., Levy O., Salvador C., Dai G., Carrasco N.,** 1994, Na⁺/I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non -I⁻-transporting cultures thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci* 91, 3789-3793.
41. **Riedel C., Levy O., Carrasco N.,** 2001 Post-transcriptional regulation of the Sodium/Iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 276, 21458-21463.
42. **Wolff J., Chiakoff IL.,** 1948, Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* 174, 555-564.
43. **Raben MS.,** 1949, The paradoxical effect of thiocyanate and of thyrotropin on the inorganic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide. *Endocrinology* 45, 296-304.
44. **Panneels V., Van Sande J., Van den Bergen H., Jacoby C., Braekman JC., Dumont JE., Boeynaems JM.,** 1994, Inhibition of human thyroid adenylyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol Cell Endocrinol* 106, 41-50.

45. **Eng PHK., Cardona GR., Fang SL., Previti MC., Alex S., Carrasco N., Chin WW., Braverman LE.,** 1999, Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140, 3404-3410.
46. **Suzuki K., Mori A., Saito J., Moriyama E., Ullianich L., Kohn LD.,** 1999, Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology* 140, 5422-5430.
47. **Tazebay UH., Wapnir IL., Levy O., Dohan O., Zuckier LS., Zhao QH., Deng HF., Amenta PS., Fineberg S., Pestell RG., Carrasco N.,** 2000, The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 6, 871-878.
48. **Josefsson M., Grunditz T., Ohlsson T., Ekblad E.,** 2002, Sodium /iodide –symporter: distribution in different mammals and role in entero-thyroid circulation of iodide. *Acta Physiol Scand* 175, 129-137.
49. **Brown-Grant K.,** 1961, Extra thyroidal iodide concentrating mechanisms. *Physiol Rev* 41, 189-213.
50. **Bidart JM., Lacroix L., Evain-Brion D., Caillou B., Lazar V., Frydman R., Bellet D., FIlletti S., Schlumberger M.,** 2000, Expression of Na⁺/I⁻ symporter and pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4367-4372.
51. **Toublanc JE.,** 1992, Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res* 38, 230-235.
52. **Bikker H., Vulsma T., Baas F., De Vijlder JJ.,** 1995, Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 6, 9-16.
53. **Ieiri T., Cochaux P., Targovnik HM., Suzuki M., Shimoda S., Perret J., Vassart G.,** 1991, A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest* 88, 1901-1905.
54. **Abramowicz MJ., Duprez L., Parma J., Vassart G., Heinrichs C.,** 1997, Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 99, 3018-3024.

55. **Fujiwara H., Tatsumi K., Miki K., Harada T., Miyai K., Takai S., Amino N.,** 1997, Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Genet* 16, 124-125.
56. **Matsuda A., Kosugi S.,** 1997, A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3966-3971.
57. **Kosugi S., Sato Y., Matsuda A., Ohyama Y., Fujieda K., Inomata H., Kameya T., Isozaki O., Jhiang SM.,** 1998, High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4123-4129.
58. **Levy O., Ginter CS., De la Vieja A., Levy D., Carrasco N.,** 1998, Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett* 429, 36-40.
59. **Pohlenz J., Rosenthal IM., Weiss RE., Jhiang SM., Burant C., Refetoff S.,** 1998, Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 101, 1028-1035.
60. **De La Vieja A., Ginter CS., Carrasco N.,** 2004, The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number. *J Cell Sci* 117, 677-687.
61. **Pohlenz J., Medeiros-Neto G., Gross JL., Silveiro SP., Knobel M., Refetoff S.,** 1997, Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 240, 488-491.
62. **Pohlenz J., Duprez L., Weiss RE., Vassart G., Refetoff S., Costagliola S.,** 2000, Failure of membrane targeting causes the functional defect of two mutant sodium iodide symporters. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2366-2369.
63. **Kosugi S., Bhayana S., Dean HJ.,** 1999, A novel mutation in the sodium/iodide symporter gene in the largest family with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3248-3253.

64. **Dohan O., Gavrielides MV., Ginter C., Amzel LM., Carrasco N.,** 2002, Na⁺/I⁻ symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395. *Mol Endocrinol* 16, 1893-1902.
65. **Kosugi S., Inoue S., Matsuda A., Jhiang SM.,** 1998, Novel, missense and loss-of-function mutations in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3373-3376.
66. **Fujiwara H., Tatsumi K., Tanaka S., Kimura M., Nose O., Amino N.,** 2000, A novel V59E missense mutation in the sodium iodide symporter gene in a family with iodide transport defect. *Thyroid* 10, 471-474.
67. **Tonacchera M., Agretti P., de Marco G., Elisei R., Perri A., Ambrogini E., De Servi M., Ceccarelli C., Viacava P., Refetoff S., Panunzi C., Bitti ML., Vitti P., Chiovato L., Pinchera A.,** 2003, Congenital hypothyroidism due to a new deletion in the sodium/iodide symporter protein. *Clin Endocrinol* 59, 500-506.
68. **Everett LA., Glaser B., Beck JC., Idol JR., Buchs A., Heyman M., Adawi F., Hazani E., Nassir E., Baxevanis AD., Sheffield VC., Green ED.,** 1997, Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17, 411-422.
69. **Scott DA., Wang R., Kreman TM., Sheffield VC., Karniski LP.,** 1999, The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 21, 440-443.
70. **Kraiem Z., Heinrich R., Sadeh O., Shiloni E., Nassir E., Hazani E., Glaser B.,** 1999, Sulfate transport is not impaired in pendred syndrome thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2574-2576.
71. **Yoshida A., Taniguchi S., Hisatome I., Royaux I. E., Green E. D., Kohn L. D., Suzuki K.,** 2002, Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3356–3361.
72. **Yoshida A., Hisatome I., Taniguchi S., Sasaki N., Yamamoto Y., Miake J., Fukui H., Shimizu H., Okamura T., Okura T., Igawa O., Shigemasa C., Green ED., Kohn LD., Suzuki K.,** 2004, Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology* 145, 4301-4308.
73. **Rillema J., Melissa AH.,** 2003, Pendrin transporter carries out iodide uptale into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med* 288, 1078-1082.

74. **Bidart JM., Mian C., Lazar V., Russo D., Filetti S., Caillou B., Schlumberger M.,** 2000, Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2028-2033.
75. **Kohn LD., Suzuki K., Nakazato M., Royaux I., Green ED.,** 2001, Effects of thyroglobulin and pendrin on iodide flux through the thyrocyte. *Trends Endocrinol Metab* 12, 10-16.
76. **Lacroix L., Mian C., Caillou B., Talbot M., Filetti S., Schlumberger M., Bidart JM.,** 2001, Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol* 144, 297-302.
77. **Fraser GR.,** 1965, Association of congenital deafness with goitre (Pendred's syndrome) a study of 207 families. *Ann Hum Genet* 28, 201-249.
78. **Royaux IE., Wall SM., Karniski LP., Everett LA., Suzuki K., Knepper MA., Green ED.,** 2001, Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci* 98, 4221-4226.
79. **Patterson GH., Lippincott-Schwartz J.,** 2002, A photoactivable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873-1877.
80. **Taylor JP., Metcalfe RA., Watson PF., Weetman AP., Trembath RC.,** 2002, Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 87, 1778-1784.
81. **Rotman-Pikielny P., Hirschberg K., Maruvada P., Suzuki K., Royaux IE., Green ED., Kohn LD., Lippincott-Schwartz J., Yen PM.,** 2002, Retention of pendrin in the endoplasmic reticulum is a major mechanism for Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 11, 2625-2633.
82. **Palm G. J., Zdanov A., Gaitanaris G.A., Stauber R., Pavlakis G.N., Wlodawer A.,** 1997, The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nature Struct Biol* 4, 361-365.
83. **Schlumberger MJ.,** 1998, Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 338, 297-306.

84. **Jhiang SM., Cho JY., Ryu KY., DeYoung BR., Smanik PA., McGaughy VR., Fischer AH., Mazzaferri EL.,** 1998, An immunohistochemical study of Na⁺/I symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* 139, 4416-4419.
85. **Lazar V., Bidart JM., Caillou B., Mahe C., Lacroix L., Filetti S., Schlumberger M.,** 1999, Expression of the Na⁺/I symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3228-3234.
86. **Caillou B., Troalen F., Baudin E., Talbot M., Filetti S., Schlumberger M., Bidart JM.,** 1998, Na⁺/I symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4102-4106.
87. **Venkataraman GM., Yatin M., Marcinek R., Ain KB.,** 1999, Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2449-2457.
88. **Arturi F., Russo D., Schlumberger M., Du Villard JA., Caillou B., Vigneri P., Wicker R., Chiefari E., Suarez HG., Filetti S.,** 1998, Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2493-2496.
89. **Saito T., Endo T., Kawaguchi A., Ike M., Katoh R., Kawaoi A., Murumatsu A., Onaya T.,** 1998, Increased expression of the Sodium Iodide Symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 101, 1296-1300.
90. **Dohan O., Baloch Z., Banreivi Z., Livolsi V., Carrasco N.,** 2001 Predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2697-2700.
91. **Trouttet-Masson S., Selmi-Ruby S., Bernier-Valentin F., Porra V., Berger-Dutrieux N., Decaussin M., Peix JL., Perrin A., Bournaud C., Orgiazzi J., Borson-Chazot F., Franc B., Rousset B.,** 2004, Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol* 165, 25-34.
92. **Russo D., Manole D., Arturi F., Suarez HG., Schlumberger M., Filetti S., Derwahl M.,** 2001, Absence of sodium/iodide symporter gene mutations in differentiated human thyroid carcinomas. *Thyroid* 11, 37-39.

93. **Porra V., Bernier-Valentin F., Trouttet-Masson S., Berger-Dutrieux N., Peix JL., Perrin A., Selmi-Ruby S., Rousset B.,** 2002, Characterization and semiquantitative analyses of pendrin expressed in normal and tumoral human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1700-1707.
94. **Thorpe SM.,** 1976, Increased uptake of iodide by hormone-responsive compared to hormone-independent mammary tumors in GR mice. *Int J Cancer* 18, 345-350.
95. **Kogai T., Schultz JJ., Johnson LS., Huang M., Brent GA.,** 2000, Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci* 97, 8519-8524.
96. **Kogai T., Kanamoto Y., Che LH., Taki K., Moatamed F., Schultz JJ., Brent GA.,** 2004, Systemic retinoic acid treatment induces sodium/ iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Cancer Res* 64, 415-422.
97. **Spitzweg C., O'Connor MK., Bergert ER., Tindall DJ., Young CY., Morris JC.,** 2000, Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Research* 60, 6526-6530.
98. **Sawano A., Miyawaki A.,** 2000, Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 28, E78.
99. **Griesbeck O., Baird G. S., Campbell R. E., Zacharias D. A., Tsien, R. Y.,** 2001, Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276, 29188-29194.
100. **Ormo M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J.,** 1996, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-5.
101. **Yang F., Moss L. G., Phillips G. N Jr.,** 1996, The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14, 1246-1251.
102. **Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y.,** 1994, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12501-4.
103. **Cormack B. P., Valdivia R. H., Falkow S.,** 1996, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

104. **Zhang G., Gurtu V., Kain S. R.,** 1996, An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 707-711.
105. **Cubitt A. B., Heim R., Adams SR., Boyd AE., Gross LA., Tsien RY.,**1995, Understanding, using and improving green fluorescent protein. *Trends Biochem Sci* 20, 448-455.
106. **Gonzalez C., Bejarano L. A.,** 2000, Protein traps: using intracellular localization for cloning. *Trends Cell Biol.* 10, 162-165.
107. **Bassell G. J., Oleynikov Y., Singer R. H.,** 1999, The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J* 13, 447-454.
108. **Zhang HL., Eom T., Oleynikov Y., Shenoy SM., Liebelt DA., Dichtenberg JB., Singer RH., Bassell GJ.,** 2001, Neurotrophin-induced transport of a β -actin mRNP complex increases β -actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31, 261-275.
109. **Theurkauf W. E., Hazelrigg T. I.,** 1998, *In vivo* analyses of cytoplasmic transport and cytoskeletal organization during *Drosophila* oogenesis: characterization of a multi-step anterior localization pathway. *Development* 125, 3655-3666.
110. **Hadjantonakis A. K., Nagy A.,** 2001, The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem. Cell Biol.* 115, 49-58.
111. **Zlokarnik G., Negulescu PA., Knapp TE., Mere L., Burren N., Feng L., Whitney M., Roemer K., Tsien RY.,** 1998, Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells using β -lactamase as reporter. *Science* 279, 84-88.
112. **Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang CC., Kain SR.,** 1998, Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription. *J Biol Chem* 273, 34970-34975.
113. **Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zarausky A., Tan P., Kajava AV., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Sieert P.,** 2000, 'Fluorescent timer': protein that changes color with time. *Science* 290, 1585-1588.
114. **Rudolf R., Salm T., Rustom A., Gerdes H. H.,** 2001, Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* 12, 1353-1365.

115. **Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y.,** 1997, Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
116. **Truong K., Sawano A., Mizuno H., Hama H., Tong KI., Mal TK., Miyaawaki A., Ikura M.,** 2001, FRET-based *in vivo* Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nature Struct Biol* 8, 1069-1073.
117. **Kurokawa K., Mochizuki N., Ohba Y., Mizuno H., Miyawaki A., Matsuda M.,** 2001, A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein *in vivo*. *J Biol Chem* 276, 31305-31310.
118. **Zhang J., Ma Y., Taylor S. S., Tsien R. Y.,** 2001, Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14997-15002.
119. **Mahajan N. P., Harrison-Shostak D. C., Michaux J., Herman B.,** 1999, Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chem Biol* 6, 401-409.
120. **Luo K. Q., Yu V. C., Pu Y., Chang D.,** 2001, C. Application of the fluorescence resonance energy transfer method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 1054-1060.
121. **Janetopoulos C., Jin T., Devreotes P.,** 2001, Receptor-mediated activation of heterotrimeric G proteins in living cells. *Science* 291, 2408-2411.
122. **Kuner T., Augustine G.J.,** 2000, A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27, 447–459.
123. **Fehr M., Frommer WB., Lalonde S.,** 2002, Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9846–9851.
124. **Fehr M., Lalonde S., Lager I., Wolff MW., Frommer WB.,** 2003, *In vivo* imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *J Biol Chem* 278, 19127–19133.

125. **Ye K., Schultz J.S.**, 2003, Genetic engineering of an allosterically based glucose indicator protein for continuous glucose monitoring by fluorescence resonance energy transfer. *Anal. Chem.* 75, 3451–3459.
126. **DiPilato LM., Cheng X., Zhang J.**, 2004, Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16513–16518.
127. **Zaccolo M., De Giorgi F., Cho CY., Feng L., Knapp T., Negulescu PA., Taylor SS., Tsien RY., Pozzan T.**, 2000, A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature Cell Biol.* 2, 25–29.
128. **Griesbeck O.**, 2004, Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr Opin Neurobiol* 14, 636–641.
129. **Pologruto T.A., Yasuda R., Svoboda K.**, 2004, Monitoring neural activity and $[Ca^{2+}]$ with genetically encoded Ca^{2+} indicators. *J Neurosci* 24, 9572–9579.
130. **Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y.**, 1999, Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11241–11246.
131. **Rapizzi E., Pinton P., Szabadkai G., Wieckowski MR., Vandecasteele G., Baird G., Tuft RA., Fogarty KE., Rizzuto R.**, 2002, Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca^{2+} microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 159, 613–624.
132. **Yu D., Baird G., Tsien R. Y., Davis R. L.**, 2003, Detection of calcium transient in *Drosophila* mushroom body neurons with camgaroo. *J Neurosci* 21, 597–610.
133. **Nagai T., Sawano A., Park ES., Miyawaki A.**, 2001, Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3197–3202.
134. **Kawai Y., Sato M., Umezawa Y.**, 2004, Single color fluorescent indicators of protein phosphorylation for multicolor imaging of intracellular signal flow dynamics. *Anal Chem* 76, 6144–6149.
135. **Siegel MS., Isacoff EY.**, 1997, A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19, 735–741.
136. **Guerrero G., Siegel MS., Roska B., Loots E., Isacoff EY.**, 2002, Tuning FlaSh: redesign of the dynamics, voltage range, and color of the genetically encoded optical sensor of membrane potential. *Biophys J* 83, 3607–3618.

137. **Gorokhovatsky AY., Marchenkov VV., Rudenko NV., Ivashina TV., Ksenzenko VN., Burkhardt N., Semisotnov GV., Vikurov LM., Alakhov YB.,** 2004, Fusion of *Aequorea victoria* GFP and aequorin provides their Ca²⁺-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 703–711.
138. **Ostergaard H., Henriksen A., Hansen F. G., Winther J. R.,** 2001, Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J* 20, 5853-5862.
139. **Zhang J., Campbell RE., Ting AY., Tsien RY.,** 2002, Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906-918.
140. **Barondeau D. P., Kassmann C. J., Tainer J. A., Getzoff E. D.,** 2002, Structural chemistry of a green fluorescent protein Zn biosensor. *J Am Chem Soc* 124, 3522-3524.
141. **Kneen M., Farinas J., Li Y., Verkman A. S.,** 1998, Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* 74, 1591-1599.
142. **Miesenböck G., De Angelis D. A., Rothman J. E.,** 1998, Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
143. **Matsuyama S., Llopis J., Deveraux Q. L., Tsien R. Y., Reed J. C.,** 2000, Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2, 318-325.
144. **Wachter R. M., Elsliger M.-A., Kallio K., Hanson G. T., Remington S. J.,** 1998, Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6, 1267-1277.
145. **Tsien R. Y., Miyawaki A.,** 1998, Seeing the Machinery of Live Cells. *Science* 280, 1954-1955.
146. **Green G., Kain S. R., Angres B.,** 2000, Dual color detection of cyan and yellow derivatives of green fluorescent protein using conventional fluorescence microscopy and 35-mm photography. *Methods Enzymol* 327, 89-94.

147. **Llopis J., McCaffery J. M., Miyawaki A., Farquhar M. G., Tsien R. Y.,** 1998, Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6803-6808.
148. **Jayaraman S., Haggie P., Wachter R. M., Remington S. J., Verkman A. S.,** 2000, Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor. *J Biol Chem* 275, 6047-6050.
149. **Niwa H., Inoué S., Hirano T., Kojima S., Kubota M., Ohashi M., Tsuji F.I.,** 1996, Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93, 13617-13622.
150. **Brejč K., Sixma T.K., Kitts P.A., Kain S.R., Tsien R.Y., Ormö M., Remington S.J.,** 1997, Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2306-2311.
151. **Wachter R.M., Remington S.J.,** 1999, Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr Biol* 9, R628-R629.
152. **Elslinger M.A., Wachter R.M., Hanson G.T., Kallio K., Remington S.J.,** 1999, Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* 38, 5296-5301.
153. **Wachter R.M., Yarbrough D., Kallio K., Remington S.J.,** 2000, Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein. *J Mol Biol* 301, 157-171.
154. **Burley S.K., Petsko G.A.,** 1988, Weakly polar interactions in proteins. *Advan. Protein Chem.* 39, 125-189.
155. **Feller G., Le Bussy O., Houssier C., Gerday C.,** 1996, Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase. *J Biol Chem* 271, 23836-23841.
156. **Wang Z., Asenjo A.B., Oprian D.D.,** 1993, Identification of the Cl⁻ binding site in the human red and green color vision pigments. *Biochemistry* 32, 2125-2130.
157. **Pikkemaat M.G., Ridder I.S., Rozeboom H.J., Kalk K.H., Dijkstra B.W., Janssen D.B.,** 1999, Crystallographic and kinetic evidence of a collision complex formed during halide import in haloalkane dehalogenase. *Biochemistry* 38, 12052-12061.

158. **Yuan C., Kuwata O., Liang J., Misra S., Balashov S.P., Ebrey T.G.,** 1999, Chloride binding regulates the Schiff base pK in Gecko P521 cone-type visual pigment. *Biochemistry* 38, 4649–4654.
159. **Wright E.M., Diamond J.M.,** 1977, Anion selectivity in biological systems. *Physiol Rev* 57, 109–156.
160. **Mansoura M., Biwersi J., Ashlock M., Verkman A. S,** 1999, Fluorescent Chloride Indicators to Assess the Efficacy of CFTR cDNA Delivery, *Hum Gene Ther* 10, 861-875.
161. **Verkman A. S,** 1990, Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. *Am J Physiol* 259, C375-C388.
162. **Galiotta L.J., Jayaraman S., Verkman AS.,** 2001, Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, 1734-1742.
163. **Galiotta L.J., Haggie PM., Verkman AS.,** 2001, Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett* 499, 220-224.
164. **Rhoden K.J., Cianchetta S., Stivani V., Portulano C., Galiotta L., Romeo G.,** 2007, Cell-based imaging of sodium iodide symporter activity with the yellow fluorescent protein variant YFP-H148Q/I152L. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, 814-823.
165. **Honda A. et al.,** 2001, Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2437–2442.
166. **Sato M., Hida N., Ozawa T., Umezawa Y.,** 2000, Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase I α and green fluorescent proteins. *Anal Chem* 72, 5918–5924.
167. **Scharnagl C., Raupp-Kossmann R., Fischer S.F.,** 1999, Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. *Biophys J* 77, 1839–1857.
168. **Kosugi S., Sasaki N., Hai N., Sugawa H., Aoki N., Shigemasa C., Mori T., Yoshida A.,** 1996, Establishment and characterization of a Chinese Hamster Ovary cell line, CHO-4J, stably expressing a number of Na⁺/I⁻ symporters. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 94-101.

169. **Van Sande J., Massart C., Beauwens R., Schoutens A., Costagliola S., Dumont JE., Wolff J.**, 2003, Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* 144, 247-252.
170. **Weiss SJ., Philp NJ., Grollman EF.**, 1984, Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* 114, 1090-1098.
171. **Endo T., Kaneshige M., Nakazato M., Kogai T., Saito T., Onaya T.**, 1996, Autoantibody against thyroid iodide transporter in the sera from patients with Hashimoto's thyroiditis possesses iodide transport inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 199-202.
172. **Wapnir IL., Van de Rijn M., Nowels K., Amenta PS., Walton K., Montgomery K., Greco RS., Dohan O., Carrasco N.**, 2003, Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1880-1888.
173. **Yang H., Shelat AA., Guy RK., Gopinath VS., Ma T., Du K., Lukacs GL., Taddei A., Folli C., Pedemonte N., Galiotta LJ., Verkman AS.**, 2003, Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating. *J Biol Chem* 278, 35079-35085.
174. **Pedemonte N., Lukacs GL., Du K., Caci E., Zegarra-Moran O., Galiotta LJ., Verkman AS.**, 2005, Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 115, 2564-2571.
175. **Nagayama Y., Yokoi H., Takeda K., Hasegawa M., Nishihara E., Namba H., Yamashita S., and Niwa M.**, 2000, Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4081-4086.
176. **Lin X., Fischer AH., Ryu KY., Cho JY., Sferra TJ., Kloos RT., Mazzaferri EL., Jhiang SM.**, 2004, Application of the Cre/loxP system to enhance thyroid-targeted expression of sodium/iodide symporter. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2344-2350.
177. **Spitzweg C., Morris JC.**, 2001, Approaches to gene therapy with sodium/iodide symporter. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 56-59.
178. **Barton KN., Tyson D., Stricker H., Lew YS., Heisey G., Koul S., De la Zerda A., Yin FF., Yan H., Nagaraja TN., Randall KA., Jin GK., Fenstermacher JD., Jhiang**

- S., Ho Kim J., Freytag SO., and Brown SL.,** 2003, GENIS: gene expression of sodium iodide symporter for noninvasive imaging of gene therapy vectors and quantification of gene expression in vivo. *Mol Ther* 8, 508-518.
179. **Bouchentouf M., Benabdallah BF., Dumont M., Rousseau J., Jobin L., Tremblay JP.,** 2005, Real-time imaging of myoblast transplantation using the human sodium iodide symporter. *Biotechniques* 38, 937-942.
180. **Yoshida A., Hattori K., Hisatome I., Taniguchi S., Ueta Y., Hukui H., Santo Y., Igawa O., Shigemasa C., Kosugi S., Grollman EF.,** 1999, A TSH/dibutyryl cAMP activated Cl⁻/I⁻ channel in FRTL-5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 631-635.
181. **Devuyst O., Golstein PE., Sanches MV., Piontek K., Wilson PD., Guggino WB., Dumont JE., and Beauwens R.,** 1997, Expression of CFTR in human and bovine thyroid epithelium. *Am J Physiol* 272, C1299-1308.
182. **Van den Hove MF., Croizet-Berger K., Jouret F., Guggino SE., Guggino WB., Devuyst O., Courtoy PJ.,** 2006, The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* 147, 1287-1296.
183. **Dossena S., Rodighiero S., Vezzoli V., Bazzini C., Sironi C., Meyer G., Furst J., Ritter M., Garavaglia ML., Fugazzola L., Persani L., Zorowka P., Storelli C., Beck-Peccoz P., Botta G., Paulmichl M.,** 2006, Fast fluorometric method for measuring pendrin (SLC26A4) Cl⁻/I⁻ transport activity. *Cell Physiol Biochem* 18(1-3), 67-74.
184. **Smallridge RC., Gist ID., Kiang JG.,** 1992, Na⁺-H⁺ antiport and monensin effects on cytosolic pH and iodide transport in FRTL-5 rat thyroid cells. *Am J Physiol* 262(6 Pt 1), E 834-839.
185. **Tornquist K., Alinen S.,** 1992, Characterization of Na⁺/H⁺ exchange in FRTL-5 thyroid cells. Evidence for dependence on activation of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1106(1), 221-226.
186. **Wood AM., Warhurst G., Bidey SP., Soden J., Taylor R., Robertson WR.,** 1992, Identification of exchange mechanisms for the regulation of intracellular pH in rat thyroid FRTL-5 cells. *J Mol Endocrinol* 9(3), 301-308.

187. **Melvin JE., Park K., Richardson L., Schultheis PJ., Shull GE.,** 1999, Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na^+/H^+ exchanger. *J Biol Chem* 274(32), 22855-22861.
188. **Xie Q., Welch R., Mercado A.,** 2002, Romero MF. Mount DB. Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 283(4), F 826-838.
189. **Green ST., Petersen OH.,** 1981, Thyroid follicular cells: the resting membrane potential and the communication network. *Pflugers Arch* 391(2), 119-124.
190. **Martin SC.,** 1992, ATP activates a Ca^{2+} -dependent Cl^- current in the rat thyroid cell line, FRTL-5. *J Membr Biol* 125(3), 243-253.
191. **Chow SY., Woodbury DM., Yen-Chow YC.,** 1983, Distribution of chloride and potassium in cellular and luminal compartments of control and drug-treated turtle thyroid. *J Physiol* 339, 439-452.
192. **Chow SY., Woodbury DM.,** 1971, Water and electrolyte distribution in rat and guinea-pig thyroid glands. *J Endocrinol* 50(4), 561-576.
193. **Kim YH., Lee DS., Kang JH., Lee YJ., Chung JK., Roh JK., Kim SU., Lee MC.,** 2005, Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking. *J Nucl Med* 46, 305-311.
194. **U.S. EPA,** 2002, Perchlorate Environmental Contamination: toxicological review and risk characterization. External Review Draft. NCEA-1-0503. Washington, DC: U.S. Environmental Assessment, Office of Research and Development.
195. **CDHS,** 2005, Perchlorate in California Drinking Water: Overview and Links. Sacramento: California Department of Health Services.
196. **Greer MA., Goodman G., Pleus RC., Greer SE.,** 2002, Health effects of assessment for environmental perchlorate contamination: the dose response for inhibition of thyroidal radioiodine uptake in humans. *Environ Health Perspect* 110, 927-937.
197. **NAS (National Academy of Science),** 2005, Health implication of perchlorate ingestion. Washington, DC: National Academies Press.
198. **Wolff J.,** 2002, A miss for NIS? *Thyroid* 12, 295-297.

199. **Lavado-Autric R., Auso E., Garcia-Velasco J., Arufe. del C., Escobar del Rey F. Berbel P., et al.**, 2003, Early maternal hypothyroidism alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J Clin Invest* 111 (7), 1073-1082.
200. **Gibbs JP.**, 2004, Chronic environmental exposure to perchlorate in drinking water and thyroid function during pregnancy and the neonatal period. *Letter to Richard Johnston, Chair NAS Perchlorate Committee, from John P. Gibbs, Kerr-McGee Corp.*
201. **Kirk AB., Martinelango PK., Tian K., Dutt A., Smith EE., Dasgupta PK.**, 2005, Perchlorate and iodide in dairy and breast milk. *Environ Sci Technol* 39, 2011-2017.
202. **De Groef B., Decallonne B. R., Van der Geyten S., Darras V. M., Bouillon R.**, 2006, Perchlorate *versus* other environmental sodium/iodide symporter inhibitors: potential thyroid-related health effects. *European Journal of Endocrinology* 155, 17-25.
203. **Eng PHK., Cardona GR., Previti MC., Chin WW., Braverman LE.**, 2001, Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol* 141, 139-144.
204. **Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y.**, 1962, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-39.
205. **Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J.**, 1992, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-33.
206. **Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C.**, 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
207. **Robbins J., Merino MJ., Boice JD., Jr Ron E., Ain KB., Alexander HR., Norton JA., Reynolds J.**, 1991, Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Annals of Internal Medicine* 115, 133-147.
208. **Gerdes H.H., Kaether C.**, 1996, Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* 389, 44-47.
209. **Weiss SJ., Philp NJ., Ambesi-Impiombato FS., Grollman EF.**, 1984 Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 114, 1099-1107.

210. **Reid B. G., Flynn G. C.,** 1997, Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36, 6786-6791.
211. **Luciani P., Buci L., Conforti B., Tonacchera M., Agretti P., Elisei R., Vivaldi A., Cioppi F., Biliotti G., Manca G., Vitti P., Serio M., Peri A.,** 2003, Expression of cAMP response element-binding protein and sodium iodide symporter in benign non-functioning and malignant thyroid tumours. *European Journal of Endocrinology* 148, 579–586.
212. **Taki K., Kogai T., Kanamoto Y., Hershman Jerome M., Brent Gregory A.,** 2002, A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide Symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. *Molecular Endocrinology* 16 (10), 2266-2282.
213. **Fabbro D., Di Loreto C., BeltramiCA., Di Lauro A., DamanteG.,** 1994, Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Research* 54, 4744–4749.
214. **Dohan O., Baloch Z., Banrevi Z., Livolsi V., Carrasco N.,** 2001, Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2697–2700.
215. **Kogai T., Hershman JM., Motomura K., Endo T., Onaya T., Brent GA.,** 2001, Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells. *Endocrinology* 142, 3369–3373.
216. **Schlumberger M., Challeton C., De Vathaire F., Travagli JP., Gardet P., Lumbroso JD., Francese C., Fontaine F., Ricard M., Parmentier C.,** 1996, Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 37, 598–605.

GLOSSARIO

BCECF: derivato della fluorescina sensibile al pH

BCECF-AM: precursore esterificato del BCECF

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CHO: Chinese Hamster Ovary cells

COS-7: African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells

F_0 : intensità di fluorescenza a riposo

FP: Fluorescent Protein

FRTL-5: Fischer Rat Thyroid cells

GFP: Green Fluorescent Protein

HBS: HEPES Buffered Saline

hNIS: Human Sodium Iodide Symporter

Nigericina: ionoforo per K^+ / H^+

NIS: Sodium Iodide Symporter

PBS: Phosphate-Buffered Saline

pH_i : pH intracellulare

RF: fluorescenza relativa per ogni istante temporale ($RF(t) = F(t) / F_0(t)$)

TBT: tributilstagno, ionoforo per alogenuri/ OH^- / ClO_4^-

TSH: Thyroid- Stimulating Hormone

Valinomicina: ionoforo per K^+

YFP-H148Q/I152L variante della Yellow Fluorescent Protein sensibile agli alogenuri

$\Delta RF / \Delta t$: velocità iniziale (massima velocità) di variazione di fluorescenza

ΔRF_{5min} : decremento della fluorescenza in prossimità dell'equilibrio misurato dopo 5 min