

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare



**“INTERAZIONI MOLECOLARI DELLA PROTEINA VGF
E SUO INDIRIZZO NEI GRANULI SECRETORI ”**

**Coordinatore:
Ch.mo Prof. Carmelo Bruno Bruni**

**Candidato:
Dott. Annunziata Corteggio**

Anno 2007

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L.
Califano**

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare

Coordinatore Prof. Carmelo Bruno Bruni

**Sede amministrativa:
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “Luigi Califano”**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L.
Califano**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare
XIX ciclo**

**“INTERAZIONI MOLECOLARI DELLA PROTEINA VGF
E SUO INDIRIZZO NEI GRANULI SECRETORI ”**

Canidato:

Dott. Annunziata Corteggio

Docente guida:

Ch.mo Prof. Lucio Nitsch

INDICE

INTRODUZIONE

Secrezione	7
Secrezione regolata	8
Secrezione polarizzata	10
Segnali di indirizzo nella via secretoria regolata	11
I rafts come meccanismo di smistamento	13
Scopo del lavoro	16

MATERIALI E METODI

Colture cellulari e trasfezioni	20
Misurazione della resistenza transepiteliale (RTE)	21
Plasmidi	22
Anticorpi e Reagenti	23
Immunofluorescenza	23
SDS PAGE e Western Blot	25
Precipitazione di proteine con acido tricloroacetico (TCA)	26
Esperimenti di estrazione in Triton X-100	26
Inibizione sintesi proteica	27
Stimolazione della secrezione con Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA)	28
Gradiente di saccarosio	28
Gradiente a due step di OptiPrep	29
Gradiente di OptiPrep senza l'uso di detergenti	30
Dot-Blot	30
Inibizione sintesi degli sfingolipidi	31
Trattamento di deplezione di colesterolo	31
Saggio per quantizzare il colesterolo presente in un lisato	32
Secrezione di VGF dopo trattamento di deplezione di colesterolo o sfingolipidi	33
Secrezione regolata di VGF dopo trattamento di deplezione di colesterolo o sfingolipidi	33
Esperimenti di espressione e di secrezione polarizzata	33
Analisi dell'aggregazione di proteine	34
Velocity gradient in saccarosio	35
Velocity gradient in glicerolo	36
Gel filtration o cromatografia ad esclusione molecolare	36

RISULTATI

VGF si associa a rafts ma non la Tireoglobulina	38
Ruolo del colesterolo e degli sfingolipidi	42
VGF e' associata a rafts quando e' in granuli di secrezione	45
La deplezione di colesterolo altera il sorting di VGF	47
La deplezione degli sfingolipidi altera il sorting di VGF	50
VGF contiene segnali per indirizzare proteine in rafts	52
Nella proteina VGF non vi è un singolo dominio responsabile della sua associazione a rafts	53
In cellule FRT la proteina VGF aggrega, al contrario della Tg	55
Solo la proteina VGF si ritrova in aggregati ad alto peso molecolare	57
VGF in forma di aggregati comigra con GM1 nelle frazioni pesanti del gradiente	60
VGF colocalizza con GM1	62
Perturbando i rafts non si altera la capacita' di aggregare di VGF	64
Modello per la biogenesi dei granuli secretori	66

DISCUSSIONE

VGF si associa a rafts	69
Perturbando la composizione lipidica dei rafts si altera la capacita' di VGF di flottare	72
VGF e' associata a rafts quando e' in granuli secretori	73
Ruolo dei rafts nel sorting di VGF	74
VGF intracellulare si ritrova in aggregati	75
Meccanimo molecolare di interazione con rafts	77
Conclusioni	79

BLIBLIOGRAFIA	81
----------------------	-----------

Introduzione

Le cellule eucariotiche sono circondate da una membrana plasmatica che ha la funzione di barriera fisica, per il mantenimento dell'integrità della cellula, e di racchiudere il citoplasma dove vengono svolte le funzioni cellulari. La membrana plasmatica è una struttura altamente differenziata, costituita da un doppio strato lipidico in cui sono immerse proteine. Le cellule eucariotiche contengono anche estese membrane interne, non connesse con la membrana plasmatica, che racchiudono e separano specifiche regioni dal resto del citoplasma definendo una serie di strutture subcellulari chiamate organelli. Gli organelli sono compartimenti intracellulari destinati a funzioni specifiche.

SECREZIONE

Nelle cellule eucariotiche è possibile individuare un sistema di membrane interne organizzate in un compartimento secretorio che permette a proteine, lipidi e carboidrati neosintetizzati di raggiungere la superficie cellulare. Questo sistema è costituito da organelli (reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi e membrana plasmatica) e intermedi di trasporto tubulo vescicolari. Il traffico delle vescicole secretorie alla membrana plasmatica è essenziale per le normali funzioni cellulari come crescita ed omeostasi e rappresenta la base per la comunicazione intercellulare mediante il rilascio di molecole che agiscono come mediatori extracellulari. Il traffico di membrane all'interno di questo sistema segue un percorso con una precisa direzionalità.

La sintesi proteica avviene nel reticolo endoplasmatico, da cui intermedi di trasporto tubulo vescicolari trasportano le proteine verso il complesso del Golgi. Attraversando il complesso del Golgi le proteine vengono processate e modificate per trasformarsi nella loro forma matura e

raggiungono il Trans Golgi Network (TGN) dove vengono impacchettate in carriers membranosi post-Golgi che attraversano il citoplasma per poi fondersi con la superficie cellulare e riversare il loro contenuto all'esterno della cellula.

SECREZIONE REGOLATA

Si conoscono due modalità di secrezione delle proteine: costitutiva e regolata (Burgess e Kelly,1987; Arvan e Lee,1991; Moore et al.,1989). La secrezione costitutiva è presente in tutte le cellule ed avviene mediante vescicole di piccole dimensioni, in cui sono contenute le proteine, che raggiungono rapidamente la superficie cellulare con un flusso continuo.

La modalità regolata invece è presente solo in cellule secretorie specializzate, come cellule endocrine, neuroendocrine e neuronali. Queste cellule concentrano specifiche proteine in vescicole di dimensioni maggiori chiamate granuli secretori. I granuli secretori sono compartimenti intracellulari specializzati che hanno la funzione di immagazzinare grosse quantità di proteine destinate alla secrezione, si accumulano nel citoplasma e la loro esocitosi è controllata da stimoli esterni che ne innescano la fusione con la membrana plasmatica (Chanat et al., 1998; Miller e Moore, 1990). La modalità di secrezione regolata permette che una grande quantità di secreto sia disponibile quando è necessario, come ad esempio nel momento in cui è necessaria una quantità maggiore di proteine rispetto alle capacità biosintetiche della cellula. Ne sono un esempio gli ormoni accumulati nei granuli secretori delle ghiandole endocrine pronti ad essere secreti quando un opportuno stimolo fisiologico lo richieda (Farquhar et al., 1978).

Il complesso del Golgi occupa una posizione centrale nel pathway secretorio. Un compartimento specializzato presente dal lato trans del complesso del Golgi, il TGN (Trans Golgi Network), è riconosciuto come punto di diramazione da cui si generano i due pathway anterogradi (Griffiths e Simons, 1986; Chanat, 1991). Il rilascio di proteine dal TGN non è un processo aspecifico bensì un processo specializzato che consente l'inclusione delle proteine in distinti pathway (Keller e Simons, 1997). Nel TGN avviene la segregazione delle proteine di via regolata da quelle di via costitutiva. Sono stati proposti due modelli per spiegare come specifiche molecole destinate ai granuli secretori, e quindi alla via di secrezione regolata, sono segregate da altre proteine secretorie. I due modelli non si escludono tra loro.

Un primo modello, conosciuto come 'sorting by entry', propone che le proteine di via regolata, in modo particolare le granine, siano incluse in granuli di secrezione mediante un processo che prevede la loro selettiva aggregazione nel TGN, favorita dall'alta concentrazione di Ca^{2+} e dal pH basso, inferiore a 6.5, caratteristica di regioni specializzate del lume del TGN (Chanat et al., 1991; Borgonovo et al., 2006). Le interazioni tra granine, pro-ormoni ed enzimi proteolitici determinerebbero la ritenzione nei granuli secretori delle proteine regolate. Solo successivamente avviene l'interazione dell'aggregato con la membrana del TGN a cui segue la gemmazione del granulo. Il secondo modello di biogenesi dei granuli secretori è conosciuto come 'sorting by retention', e propone che proteine che non sono destinate alla secrezione regolata vengano trattenute ovvero riportate al TGN. Esse verrebbero progressivamente rimosse dai granuli immaturi mediante vescicole rivestite di clatrina e dirette verso il pathway secretorio costitutivo (Tooze, 1998; Thiele e Huttner, 1998; Tooze e Huttner, 1990). Recentemente è stato dimostrato che la proteina adattatore

GGA recluta clatrina dai granuli immaturi ed è coinvolta nella maturazione dei granuli secretori in cellule neuroendocrine (Kakhlon et al., 2006).

SECREZIONE POLARIZZATA.

Una proprietà fondamentale delle cellule epiteliali è la polarità cellulare, ossia la capacità di queste cellule di stabilire e mantenere domini funzionalmente specializzati nel citoplasma e nella membrana plasmatica (Drubin e Nelson, 1996).

Come conseguenza della polarizzazione di una cellula epiteliale si ha la formazione nella membrana plasmatica di domini morfologicamente, funzionalmente e biochimicamente distinti, ma contigui fisicamente (Rodriguez-Boulan e Powell, 1992). Infatti la membrana plasmatica delle cellule epiteliali può essere suddivisa in due domini: apicale e basolaterale (Simons e Fuller, 1985; Simons, 1993). I due domini hanno una differente composizione di lipidi e proteine. Il dominio apicale, che è quello che occupa la superficie libera della cellula e si affaccia nel lume degli organi, è ricco di sfingolipidi (glicosfingolipidi e sfingomieline). Il dominio basolaterale, che è quello in contatto con le cellule vicine e con la matrice extracellulare, contiene invece specifiche proteine che formano le giunzioni cellulari, proteine di adesione cellula-substrato ed è ricco in glicerolipidi e fosfatidilcolina. I due domini sono separati dalle giunzioni strette che circondano l'apice della cellula consentendo a due cellule adiacenti di aderire tra loro e generare una barriera impermeabile anche a piccole molecole così da impedire il rimescolamento di proteine e lipidi che sono distribuiti asimmetricamente nei due suddetti domini (Matter e Mellman, 1994; Mostov et al., 2000).

Per l'instaurarsi ed il mantenimento della polarità la cellula necessita della presenza di specifici meccanismi che indirizzano proteine e lipidi neo-

sintetizzati al corretto dominio della membrana plasmatica (Zegers e Hoekstra, 1998). Infatti le cellule epiteliali possiedono meccanismi di smistamento di differenti proteine verso diverse destinazioni (Fiedler e Simons, 1995; Brown e Stow, 1996). Quindi anche le proteine destinate alla secrezione possono essere selettivamente indirizzate ad uno specifico dominio della membrana plasmatica. Nel TGN le proteine secretorie, in base alla propria destinazione vengono incorporate in diverse vescicole che sono poi smistate direttamente verso il dominio apicale o basolaterale della membrana plasmatica (Mostov et al., 2000; Wandinger-Ness e Simons, 1990).

SEGNALI DI INDIRIZZO NELLA VIA SECRETORIA REGOLATA

Lo smistamento di proteine secretorie necessita di un macchinario molecolare che permetta di riconoscere il segnale o i segnali presenti sulla proteina e di separare le proteine regolate da quelle costitutive. Il sorting delle proteine della via secretoria regolata in granuli secretori immaturi (ISG) comporta almeno due tappe: la loro selettiva aggregazione in condizioni di alte concentrazioni di Ca^{2+} e di pH acido, tipici del TGN, e la loro interazione con le proteine della membrana del TGN per la formazione del granulo secretorio. Alcuni studi hanno ipotizzato che le granine giocano un ruolo importante nell'aggregazione di proteine della via regolata nel TGN e, quindi, nella formazione del granulo secretorio immaturo. Proteine appartenenti a questa famiglia sono state studiate in vitro e si è visto che in presenza di un basso pH e di un'alta concentrazione di Ca^{++} esse aggregano. Queste condizioni si riscontrano nel TGN (Yoo S.H., 1995; Song L. and Fricker L.D., 1995). E' stato dimostrato che

Cromogranina A (CgA) e Cromogranina B (CgB) cambiano conformazione nel TGN esponendo regioni idrofobiche e che a pH 5.5 CgA è presente in forma tetramericata (Yoo S.H., 1995). Questi cambiamenti conformazionali e la capacità di legare il Ca^{++} permettono forse alle granine di interagire con la membrana del TGN e di iniziare la formazione del granulo secretorio, escludendo le proteine secrete per via costitutiva (Yoo S.H., 1996). E' stato dimostrato che se cromogranina A e B vengono iper-esprese in fibroblasti formano strutture che possono essere definite granuli secretori non solo perché hanno la tipica morfologia dei granuli secretori presenti in cellule endocrine e neuroendocrine, ma anche perché hanno la capacità di esocitare il proprio contenuto in seguito ad uno stimolo (Beuret N. et al., 2004). Oltre alla capacità di aggregare, la CgB e la CgA possiedono un ulteriore segnale costituito da un ponte disolfuro all'estremità amminica delle proteine (Kromer A. et al., 1998), segnale che ritroviamo anche nella pro-opiomelanocortina (POMC) e che consiste in due ponti disolfuro che determinano la formazione di una struttura anfipatica a forma di loop tra i residui di cisteina (Cys8 e Cys20, Cys 2 e Cys 24), (Cool et al., 1994).

Il ponte disolfuro rappresenta verosimilmente un segnale di indirizzo della proteina secretoria alla via regolata. Infatti la distruzione di entrambi i ponti, o solo del secondo ponte di cisteine, o ancora la rimozione del loop anfipatico, ha come risultato la secrezione costitutiva del mutante POMC dalle cellule e l'assenza di immunocolorazione dei granuli secretori all'interno delle cellule.

Un'altra ipotesi spiega lo smistamento delle proteine all'interno del pathway di secrezione regolata e postula l'esistenza di recettori di membrana che legano tali proteine a livello del TGN e le dirigono in granuli secretori (Cool et al., 1997). La carbosipeptidasi E (CPE), per esempio, è stata proposta come recettore di sorting non solo per la POMC

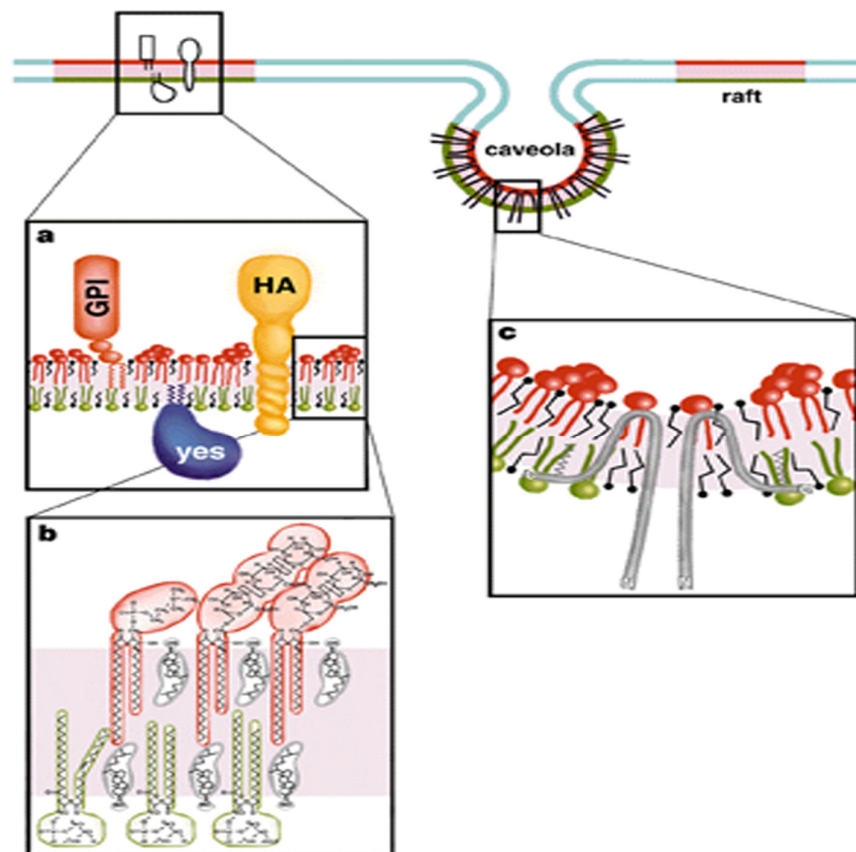
ma anche per altri pro-ormoni che includono la proinsulina e la proencefalina (Cool et al., 1997). CPE è un enzima coinvolto nel processing di molti peptidi, ormoni e neurotrasmettitori, ed è stata localizzata nei granuli secretori di vari tipi di cellule che includono cellule appartenenti al cervello, alla pituitaria ed al pancreas (Fricker, 1988). E' stato dimostrato che la deplezione di CPE in cellule neuroendocrine Neuro-2 causa la secrezione costitutiva di proinsulina e proencefalina, ma non di CgA, suggerendo l'esistenza di altri recettori di sorting per la via regolata (Normant E. and Loh P., 1998). E' stato anche attribuito un ruolo all'associazione con rafts come segnale di indirizzo nella via regolata: è stato infatti postulato che i rafts lipidici siano coinvolti nella formazione dei granuli secretori immaturi (Tooze et al, 2001)

Si va delineando un meccanismo di smistamento nella via regolata, complesso e vario, che implica anche l'interazione e il coinvolgimento di più proteine in più momenti.

I RAFTS COME MECCANISMO DI SMISTAMENTO.

Secondo il modello classico a mosaico fluido della membrana cellulare, lipidi e proteine sono distribuiti in maniera casuale nel doppio strato lipidico della membrana plasmatica e le singole molecole lipidiche sono capaci di diffondere liberamente all'interno del loro monostrato (Singer e Nicolson, 1972). In seguito è stato dimostrato che differenti specie lipidiche sono distribuite in maniera non casuale nei due foglietti lipidici della membrana (van Meer, 1989) e che le molecole lipidiche possono interagire tra loro lateralmente mediante interazioni deboli (Kusumi e Sako, 1996). Dall'interazione di specifici tipi di lipidi si possono generare microdomini di membrana denominati rafts (Simons e Ikonen, 1997;

Brown e London, 2000).I rafts sono specifici microdomini lipidici ricchi di sfingolipidi e colesterolo. Essi sono strutture piccole e dinamiche in cui sfingomieline e glicosfingolipidi interagiscono lateralmente tra loro e si assemblano a formare microdomini all'interno di una regione altamente fluida, ricca invece di fosfatidilcolina. Tra questi lipidi si intercala poi il colesterolo che con il suo anello steroideo interagisce con la catena acilica dei lipidi del microdominio. Si pensa che il colesterolo abbia la funzione di stabilizzare i rafts sia colmando gli spazi vuoti tra gli sfingolipidi, sotto le loro larghe teste polari, sia favorendo le interdigitazioni delle catene di acidi grassi di foglietti opposti della membrana. Questa forza coesiva tra colesterolo e sfingolipidi sembra opporsi alle forze entropiche che portano alla disposizione casuale dei lipidi nel doppio strato lipidico (Harder e Simons, 1997).



E' stato proposto che i rafts si formino nel foglietto citoplasmatico della membrana del Trans Golgi dove funzionano come piattaforma per la formazione di vescicole che raggiungono poi la membrana plasmatica. Una caratteristica fondamentale dei rafts è che essi sono in grado di concentrare solo alcune specifiche proteine. Le proteine possono associarsi con i rafts mediante un'ancora lipidica, come l'ancora GPI (Glicosil fosfatidil inositolo) (Brown e Rose, 1992; Benting et al., 1999; Lipardi et al., 1999), mediante una coda acilica, come nel caso della proteina Src (Casey, 1995) o attraverso il loro dominio transmembrana, come ad esempio la proteina emoagglutinina del virus influenza (Scheiffele et al., 1997). Dallo studio delle proteine associate a rafts è stato osservato che questi microdomini sono coinvolti in numerose funzioni cellulari come, per esempio, la trasduzione del segnale: numerose proteine coinvolte nella trasduzione del segnale sono state trovate associate a rafts (Parton e Simons, 1995; Lisanti et al., 1994; Anderson, 1993). La principale funzione svolta dai rafts presenti nella membrana plasmatica sembrerebbe essere quella di concentrare e separare diverse proteine di membrana. I rafts sarebbero capaci, infatti, di selezionare e concentrare in un microambiente della membrana plasmatica molecole coinvolte nella trasduzione del segnale rendendo più efficiente l'interazione bersaglio-effettore (Field et al., 1995). Un'altra importante funzione proposta per i rafts è quella di essere coinvolti nel traffico di membrana. Ci sono evidenze sperimentali che indicano che questi microdomini lipidici sono importanti nello smistamento polarizzato di alcune proteine della membrana apicale in cellule epiteliali (Simons e Ikonen, 1997). Alcuni esempi della letteratura recente, inoltre, suggeriscono che la secrezione regolata è mediata da interazioni con rafts, è stata infatti descritta la presenza di microdomini lipidici nei granuli secretori di cellule neuroendocrine ed è stato postulato che i rafts lipidici siano coinvolti nella formazione dei granuli secretori

immaturi (Tooze SA et al , 2001;Thiele, C. and Huttner, W.B.,1998; Wang, Y. *et al.* 2000).

Pertanto, a livello del TGN i rafts fungerebbero da piattaforma per selezionare e concentrare diverse proteine che poi sono indirizzate alla membrana plasmatica. I rafts sarebbero capaci di reclutare una specifica popolazione di proteine e di escluderne altre. Ciò implica che esistano determinanti nelle proteine che permettono la loro inclusione o la loro esclusione in questi microdomini.

I rafts sono caratterizzati dalla resistenza alla estrazione con detergenti non ionici come Triton X-100 a 4°C: l'estrazione di cellule in queste condizioni consente di isolare biochimicamente una frazione di membrane denominata complessi insolubili al detergente ricchi di glicolipidi (DIGs) che contiene aggregati di rafts cellulari (Brown e Rose, 1992; Kurzchalia et al., 1995). I DIGs, inoltre, a causa del loro alto contenuto di lipidi, sono caratterizzati dalla loro abilità a flottare nelle frazioni a bassa densità durante la centrifugazione su un gradiente di densità. Queste due caratteristiche consentono di isolare i rafts e determinare così le proteine ad essi associate (Simons e Ikonen, 1997).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della tesi é studiare i meccanismi molecolari ed i segnali di "sorting" che sono responsabili della secrezione di proteine solubili della via regolata in cellule epiteliali. Abbiamo utilizzato come modello sperimentale le cellule FRT, che sono cellule epiteliali di tiroide di ratto polarizzate ed indifferenziate, e le abbiamo trasfettate stabilmente con il cDNA delle proteine VGF e Tireoglobulina (Tg). VGF è una proteina espressa in cellule neuronali e neuroendocrine. In cellule PC12 è stato

dimostrato che la sua trascrizione è indotta dal fattore di crescita neurotrofico (NGF) (Possenti et al., 1989). La proteina VGF sembra avere un ruolo nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (Ferri et al., 1995). Nelle cellule neuronali questa proteina è coinvolta nella induzione della crescita dell'assone che porta alla polarizzazione della cellula neuronale (Lombardo et al., 1995). VGF è immagazzinata nei granuli di secrezione ed è rilasciata in risposta ad una varietà di stimoli secretori e ciò fa supporre che abbia una funzione neuromodulatoria (Possenti et al., 1989). Inoltre è secreta con modalità polarizzata: infatti nei neuroni di ippocampo di ratto è indirizzata verso l'assone (Benson e Salton, 1996). Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la proteina VGF è secreta con modalità polarizzata e regolata in cellule FRT (Gentile et al., 2004).

Tg è una proteina precursore per la biosintesi degli ormoni tiroidei, è espressa nei tireociti dove viene secreta dalla membrana apicale (Chambard et al., 1987) e sembra che la secrezione di Tg nei tireociti avvenga in modo regolato (Chambard et al., 1990). E' stato proposto che in cellule epiteliali di rene di cane, MDCK, la proteina Tg venga secreta dal compartimento apicale mediante associazione a rafts (Martin-Belmonte et al., 2000). In cellule FRT entrambe le proteine sono secrete dal polo apicale, ma solo VGF viene inclusa in granuli secretori.

Si ritiene che una tappa chiave nel processo di segregazione in granuli secretori delle proteine della via regolata al livello del TGN potrebbe essere la loro aggregazione selettiva che sembra dipendere dal pH leggermente acido e da concentrazioni millimolari di calcio. L'aggregazione delle proteine luminali non è sufficiente per la biogenesi dei granuli secretori, infatti è necessario che le proteine cargo interagiscano con specifici microdomini della membrana affinché il granulo secretorio possa formarsi.

La problematica specifica che è stata qui affrontata è quella relativa alle interazioni molecolari attraverso cui si realizza la segregazione delle due proteine e l'indirizzamento di VGF in granuli secretori. In particolare si è valutato se le interazioni proteina-lipide e proteina-proteina fossero rilevanti per la segregazione delle due proteine.

Materiali e metodi

Colture cellulari e trasfezioni

Cellule epiteliali di tiroide di ratto Fischer (FRT) sono state coltivate in piastre di plastica (Falcon) di 100 mm di diametro, mantenute in incubatore a 37°C, in un'atmosfera umidificata contenente il 95% di aria ed il 5% di CO₂. Coltivate in terreno Ham F12 modificato da Coon (Euroclone) contenente il 5% di siero fetale bovino (GIBCO).

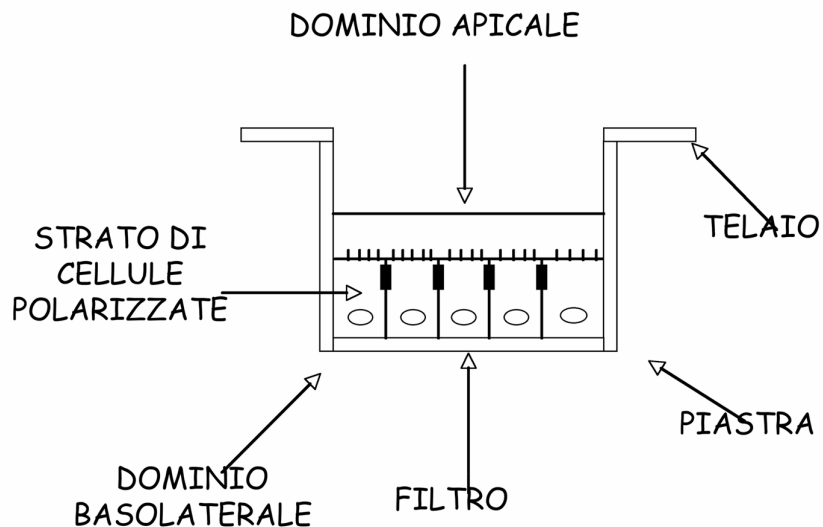
Le cellule FRT trasfettate stabilmente con i cDNA di VGF, VGF-P75 e Tg (tireoglobulina) sono state coltivate in presenza di G418 (250 µg/ml). Le cellule FRT-VGF sono state ottenute come descritto (Gentile et al, 2004).

Le cellule FRT-Tg sono state ottenute mediante trasfezione con FuGENE 6 del cDNA codificante per la Tg bovina (Muresan e Arvan, 1997).

Le cellule erano staccate dalla piastra a cui erano adese per metterle in coltura in contenitori idonei ad ogni tipologia di esperimento mediante l'uso di una soluzione di tripsina 0.3%, glucosio 0.1%, EGTA 2 mM in PBS pH 7.3 (KCl 13.7 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 7H₂O 8.06 mM).

Allo scopo di valutare la secrezione polarizzata le cellule sono state coltivate in sistemi bicamerali (Transwell, Costar). Questi sistemi sono costituiti da un telaio di plastica sul quale è montato un filtro di policarbonato permeabile con pori di 0.4 µm con diametro di 24 mm (Figura). Il telaio è situato all'interno di una piastra in modo tale da mantenere separato il filtro dal fondo. Questo sistema permette di creare due compartimenti sopra e sotto il filtro, il terreno di coltura viene aggiunto ad entrambi i compartimenti del sistema. Le cellule erano piastrate in numero di 2x10⁶ sul filtro e coltivate per 5 giorni fino alla completa polarizzazione dell'epitelio. Dopo questo periodo si misurava la resistenza transepiteliale che permette di determinare il grado di polarizzazione delle cellule. Uno strato di cellule polarizzate confluenti

infatti ha la capacità di opporre resistenza al passaggio di corrente. Solo quando si otteneva la completa polarizzazione dell'epitelio, le cellule venivano utilizzate per l'esperimento.



Misurazione della resistenza transepiteliale (RTE)

Cellule epiteliali polarizzate cresciute su filtro, giunte a confluenza, possono generare una barriera tra i due compartimenti, apicale e basolaterale, che esse separano. In queste condizioni esse oppongono resistenza al passaggio di corrente applicata mediante elettrodi collegati ad un voltmetro.

La RTE di un monostrato di cellule confluenti cresciute su un filtro in un sistema bicamerale si misura ponendo un elettrodo nel compartimento apicale e uno in quello basolaterale. Si applica una differenza di potenziale di circa 3 mV e si misura con un'altra coppia di elettrodi collegati ad un voltmetro la resistenza che il monostrato cellulare oppone al passaggio di corrente.

Le misurazioni sono state effettuate con l'apparecchio Millicell-ERS (Millipore), il quale fornisce direttamente i valori della resistenza in ohm. Il valore misurato deve essere moltiplicato per l'area del filtro sul quale poggia il monostrato per ottenere il valore assoluto di RTE.

Plasmidi

Il DNA che codifica per la forma completa di VGF è un frammento PvuII-XbaI del plasmide genomico VGF8 clonato nel vettore pcDNA.3 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) sotto il promotore CMV.

I vettori di espressione che codificano per i frammenti di VGF che presentano il Myc-Tag sono stati costruiti partendo dal plasmide pSecTag2 (Invitrogen), utilizzando siti di restrizione presenti nel cDNA di VGF. I vettori pSecTag2 (Frame A, B, C) hanno nella porzione N-terminale la sequenza leader per la traslocazione nel RER e all'estremità C-terminale l'epitopo di Myc. Ogni costrutto è in frame con il leader e il tag.

Sono stati creati i seguenti costrutti:

VGF 67-611 è un frammento EcoRI di VGF cDNA (dall'aa 67 all'aa 611) subclonato in pSecTag2 B. Nello stesso vettore in coda al frammento di VGF è stato aggiunto il segmento transmembrana del recettore P75 NTR (VGF-P75).

VGF 80-450 è un frammento BamHI di VGF cDNA (dall'aa 80 all'aa 450) subclonato in pSecTag2 A.

VGF 80-285 è un frammento XhoI del vettore di VGF 80-450 tagliato e rilegato nello stesso vettore.

VGF 286-450 è un frammento XhoI di VGF 80-450 subclonato in pSecTag2 C.

VGF 450-611 è un frammento BamHI-EcoRI di VGF cDNA (dall'aa 450 all'aa 611) subclonato in pSecTag2 A.

Il cDNA codificante per Tg bovina proviene dai laboratori di Peter Arvan all' Albert Einstein of Medicine, New York (Muresan e Arvan,1997).

Il DNA dei plasmidi è stato purificato con il kit Qiagen (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany).

Anticorpi e Reagenti

-Antisiero policlonale di coniglio contro il peptide carbossi-terminale di VGF (573-617) (Possenti et al.1999) è stato usato sia per immunofluorescenza (1:1000) che per immunoblotting (1:3000 o 1:20000).

-Anticorpi monoclonali di topo anti-c-Myc umano, clone 9E10 (Santa Cruz Biotechnology) usato 1:500 per immunoblotting.

-Anticorpi policlonali e monoclonali contro tireoglobulina (Neomarker).

-Anticorpi secondari per immunoblotting anti-mouse e anti-rabbit coniugati con la perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia-Buckinghamshire, UK).

-Anticorpi secondari per immunofluorescenza indiretta anti-mouse e anti-rabbit, ALEXA Fluor 488 o 543.

Tutti gli altri reagenti, se non diversamente specificato, sono della Sigma.

Immunofluorescenza

La tecnica dell'immunofluorescenza permette di localizzare una molecola di interesse all'interno di un campione biologico mediante riconoscimento di un epitopo della molecola da parte di un anticorpo specifico. L'anticorpo

primario viene poi rilevato da un altro anticorpo che può essere coniugato con un tracciante.

I traccianti utilizzati nella metodica dell'immunofluorescenza sono i fluorocromi, cioè molecole che, colpite da luce di una determinata lunghezza d'onda, emettono luce di lunghezza d'onda superiore. Se il tracciante è legato direttamente all'anticorpo specifico per l'antigene studiato si parla di immunofluorescenza diretta, se invece esso è legato a un secondo anticorpo diretto contro quello che si lega specificamente all'antigene in esame si parla di immunofluorescenza indiretta.

Cellule coltivate su vetrini coprioggetto di 12 mm di diametro sono state fissate in 4% paraformaldeide in PBS; lavate due volte per 5 minuti con una soluzione 50mM di NH₄Cl; permeabilizzate, a seconda delle esigenze sperimentali, o con una soluzione allo 0,075% (due lavaggi di 10 minuti) o con Triton X-100 0,3% in PBS (3 minuti). In alternativa le cellule sono state fissate e permeabilizzate con una miscela 1:1 di metanolo e acetone per 3 minuti a -20°C.

Dopo un'incubazione di 20 minuti in una soluzione contenente 0.2% gelatina o 1% BSA (Albumina serica bovina) in PBS, le cellule sono state incubate in camera umida con gli anticorpi primari; dopo tre lavaggi di 10 minuti le cellule sono state incubate in camera umida con gli anticorpi secondari coniugati ai fluorocromi Alexa Fluor 488 o 543 o con la subunità B della tossina del colera coniugata a FITC (CT_x-FITC).

Per gli esperimenti di copatching di VGF e GM1 in membrana le cellule FRT-VGF piastrate su vetrino coprioggetto di 12 mm di diametro, sono state incubate in Areal Medium (terreno F12 senza NaHCO₃ e con 20 mM HEPES, pH 7.5 e 0.2% albumina bovina) con CT_x-FITC 5µg/ml per 30 minuti a 4°C, poi fissate con 4% e lavate due volte per 5 minuti con una soluzione 50mM di NH₄Cl. Dopo un'incubazione di 20 minuti in una soluzione contenente 5% BSA (Albumina serica bovina) in PBS, le cellule

sono state incubate in camera umida con l' anticorpo primario anti-VGF ; dopo tre lavaggi le cellule sono state incubate in camera umida con anti-rabbit coniugato al fluorocromo Alexa Fluor 543.

Le osservazioni sono state effettuate ad un microscopio a scansione laser confocale Zeiss LSM 510. La lunghezza d'onda del laser ad Argon era settata a 488 nm; quella del laser HeNe era settata a 543 nm. L'emissione di fluorescenza è stata rivelata da un filtro BP 5205-530 per l'Alexa fluor 488 e da un filtro BP 560-615 per l'Alexa fluor 543. Doppie immunocolorazioni sono state acquisite simultaneamente nel canale verde ed in quello rosso alla risoluzione di 1024x1024 pixels.

SDS PAGE e Western Blot

I terreni senza siero venivano raccolti dopo i tempi di incubazione sperimentali, pipettati in tubi eppendorf, brevemente centrifugati per eliminare eventuali cellule morte e conservati in ghiaccio.

Le cellule venivano lavate due volte con PBS freddo; lisate 20 minuti a 4°C in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) contenente 1% Triton-X100 e inibitori di proteasi (leupeptin, antipain, pepstatin e aprotinin). Ai lisati ed ai terreni veniva aggiunto Laemmli sample buffer 5x. I campioni venivano bolliti per 5 minuti e corsi su SDS-PAGE al 10%. Dopo la corsa elettroforetica le proteine venivano elettrotrasferite su filtro o di nitrocellulosa o di PVDF. I filtri venivano bloccati in TBS 5% NFDM (Non Fat Dry Milk) per un'ora a temperatura ambiente, abbondantemente lavati in TTBS e in TBS e cimentati con gli anticorpi primari. Dopo abbondanti lavaggi in TTBS e in TBS i filtri venivano incubati con gli anticorpi secondari anti-coniglio o anti-topo coniugati alla perossidasi di rafano. Le bande proteiche specifiche immunodecorate dagli anticorpi

venivano rivelate per chemiluminescenza o con il sistema ECL (GE Amersham) o con quello Femto detection reagent (Pierce).

Precipitazione di proteine con acido tricloracetico (TCA).

Si portano i campioni sperimentali ad una concentrazione di TCA al 20%; si incubano in ghiaccio in camera fredda per 2 ore; si centrifugano a 14,000 rpm a 4°C per 30 minuti; si aspira il sovrnatante e si aggiunge 1ml di acetone freddo ai campioni che vengono agitati e centrifugati nuovamente a 14,000 rpm a 4°C per 15minuti. Questa operazione si ripete due volte.

Si aspira il sovrnatante e si lascia evaporare l'acetone residuo sotto un flusso d'aria; si risospende il pellet con Laemmli sample buffer 2X; si incubano i campioni in agitazione sul termomixer a 32°C per 5minuti; si neutralizza il pH con vapori di ammoniaca sotto campana.

Esperimenti di estrazione in Triton X-100.

Cellule, giunte a confluenza in piastre da 10 cm di diametro, sono state lisate per 20 min in ghiaccio con 1 ml di tampone TNE (NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, 5 mM EDTA) contenente 1% Triton-X100 e inibitori di proteasi (Brown e rose,1992) e centrifugate a 14000 rpm (20800 rcf) in centrifuga Eppendorf 5417R per 2 min. a 4°C per separare la proteine solubili da quella insolubili al detergente Triton X-100. I supernatanti, che rappresentano la fase solubile (S), sono stati raccolti in nuovi tubi eppendorf . I pellets, che rappresentano la frazione insolubile (I), sono stati poi solubilizzati in 100µl del tampone di solubilizzazione

(50mM Tris-HCl pH 8,8, 5mM EDTA e 1% SDS) e sono stati bolliti a 100°C per 3 min. Successivamente i pellets sono stati risospesi utilizzando una siringa da insulina munita di ago 22Ga e il lisato è stato poi diluito con 900µl di tampone TNE/TX-100 a cui erano stati aggiunti gli inibitori di proteasi. Uguale quantità di proteine della frazione solubile ed insolubile sono stati processati per elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE).

La determinazione della concentrazione proteica dei lisati è stata effettuata mediante il saggio Bradford usando lo spettrofotometro SmartSpek della Biorad.

Inibizione sintesi proteica.

Il trattamento di cellule con cicloesimide determina l'inibizione della sintesi proteica (Ma, Q. et al, 2000).

Nei nostri esperimenti le cellule FRT-VGF sono state piastrate in piastre da 60 mm di diametro, nella piastra è stato messo anche un vetrino coprioggetto da 12 mm per controllare morfologicamente che effettivamente si fosse bloccata la via biosintetica e che la colorazione per immunofluorescenza di VGF fosse ristretta solo al compartimento vescicolare. Dopo circa 24 ore di coltura le cellule sono state incubate con terreno senza siero contenente 150 µM cicloesimide a 37° C per un'ora. Terminato il trattamento il vetrino con le cellule è stato prelevato e processato per immunofluorescenza indiretta, mentre le cellule sono state lisate secondo il protocollo di estrazione in TX-100.

Stimolazione della secrezione con Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA).

E' stato dimostrato (Gentile et al., 2004) che il PMA determina la stimolazione della secrezione di VGF in cellule FRT.

Le cellule FRT-VGF sono state piastrate in piastre da 60 mm di diametro, contenenti un vetrino coprioggetto da 12 mm di diametro. Dopo circa 24 ore di coltura le cellule sono state incubate con terreno senza siero contenente 200ng/ml PMA a 37° C per 30 min. Terminato il trattamento, il vetrino con le cellule è stato prelevato e processato per immunofluorescenza indiretta per controllare, morfologicamente, che la stimolazione della secrezione di VGF fosse effettivamente avvenuta e che la colorazione di VGF fosse ristretta al compartimento RER-Golgi, mentre le cellule in piastra sono state lisate secondo il protocollo di estrazione in TX-100.

Gradiente di saccarosio.

Poiché le proteine in soluzione tendono a sedimentare quando sottoposte ad elevate forze centrifughe, superando così la tendenza opposta della diffusione, è possibile separare miscele di proteine per mezzo della centrifugazione. Nel nostro lavoro è stato utilizzato una centrifugazione in gradiente di saccarosio all'equilibrio di densità, che separa le proteine di una miscela in relazione alla loro densità. Infatti, le molecole migreranno lungo il gradiente e si arresteranno solo quando hanno raggiunto quel punto del gradiente corrispondente alla propria densità. E' stato realizzato un gradiente discontinuo di saccarosio 5-40%, con le soluzioni di

saccarosio a densità decrescente disposte dal fondo al punto più alto della provetta (Brown e Rose, 1992). Le cellule giunte a confluenza su piastra di 100 mm di diametro sono state lisate con 1 ml di tampone TNE/TX-100. I lisati, portati ad una concentrazione di saccarosio pari al 40% in un volume finale di 4 ml, sono stati posti in un tubo da ultra centrifuga. E' stato posto sopra un gradiente discontinuo di saccarosio 30-5% e i tubi contenenti il lisato sono stati ultra centrifugati in un'ultra centrifuga Beckman con rotore SW41 a 39000 rpm per 18 ore. Frazioni da 1 ml sono state raccolte dal punto più alto del tubo e numerate con modalità decrescente. Le frazioni sono state sottoposte a precipitazione con acido tricloroacetico (TCA), corsi su gel di poliacrilammide in SDS e rilevati mediante Western blot con lo specifico anticorpo.

Gradiente a due step di OptiPrep

Il gradiente è stato effettuato come descritto(Broquet et al., 2003).

Le cellule giunte a confluenza su piastra di 100 mm di diametro sono state lisate con 1 ml di tampone TNE/TX-100. I lisati, portati ad una concentrazione di OptiPrep pari al 40% in un volume finale di 4 ml, sono stati posti in un tubo da ultra centrifuga. Sopra sono stati posti 4ml di optiprep 30% in TNE e 4ml di OptiPrep 5% in TNE. I tubi contenenti il lisato sono stati ultra centrifugati in un'ultra centrifuga Beckman con rotore SW41 a 20000 rpm per 4 ore. Frazioni da 1 ml sono state raccolte dal punto più alto del tubo e numerate con modalità decrescente. Le frazioni sono state sottoposte a precipitazione con acido tricloroacetico (TCA), corsi su gel di poliacrilammide in SDS e rilevati mediante Western blot con lo specifico anticorpo.

Gradiente di OptiPrep senza l'uso di detergenti.

Il gradiente è stato effettuato come precedentemente descritto (Macdonald and Pike, 2005).

Le cellule sono state coltivate in tre piastroni da 15 cm di diametro, sono state lavate e raccolte in Base Buffer (20mM Tris-HCl, pH 7,8, 250mM saccarosio, 1mM CaCl_2 e 1mM Mg Cl_2 più inibitori di proteasi). Le cellule vengono pellettate mediante centrifugazione per 2 minuti a 250 x g. Il pellet con le cellule viene risospeso in 1ml di Base Buffer ed lisato con una siringa con ago 23g per 20 volte. I lisati vengono centrifugati a 1000 x g per 10 minuti. Si raccoglie il PNS e il pellet viene rilisato con 1ml di Base Buffer e centrifugato a 1000 x g per 10 minuti. I due PNS vengono uniti e posti sul fondo del tubo da ultracentrifuga e portati a 25% OptiPrep in un volume finale di 4 ml. Viene posto sopra un gradiente continuo 20-0% OptiPrep in Base Buffer. Il gradiente viene ultracentrifugato in un'ultra centrifuga Beckman con rotore SW41 a 52000 x g per 90 minuti. Frazioni da 0,67 ml sono state raccolte dal punto più alto del tubo e numerate con modalità decrescente. Le frazioni sono state sottoposte a precipitazione con acido tricloroacetico (TCA), corsi su gel di poliacrilammide in SDS e rilevati mediante Western blot con lo specifico anticorpo.

Dot-Blot

Un'aliquota di ogni frazione recuperata dal gradiente di densità viene fatta adsorbire sotto vuoto su un filtro di nitrocellulosa. Il filtro viene bloccato in PBS 0,1% Tween 5% NFD (Non Fat Dry Milk) per un'ora a temperatura ambiente, abbondantemente lavati in PTBS e in PBS e

cimentato con la subunità B della tossina del colera coniugata con la perossidasi. Dopo abbondanti lavaggi in PTBS e in PBS, le bande specifiche venivano rivelate per chemiluminescenza con il sistema ECL (GE Amersham).

Inibizione sintesi degli sfingolipidi.

E' stato dimostrato che il trattamento di cellule con Fumonisina B₁ determina l'inibizione della sintesi degli sfingolipidi (Keller e Simons, 1998).

Nei nostri esperimenti le cellule FRT-VGF sono state coltivate in piastra da 10 cm di diametro, dopo 4 ore dal piastramento sono state incubate con terreno di coltura contenente 25 M Fumonisina B₁ (FB₁) per 48 ore a 37° C. Sono state poi nuovamente incubate con terreno di coltura contenente 25µg/ml FB₁ per successive 24 ore.

Trattamento di deplezione di colesterolo.

E' stato dimostrato che il trattamento con Mevinolin e metil-β-ciclodestrina depleta le cellule di colesterolo (Keller e Simons, 1998). Il Mevinolin inibisce l'enzima 3-idrossi-3 metilglutarilCoAsintasi, bloccando la sintesi del colesterolo. Metil-β-ciclodestrina ha la funzione di estrarre il colesterolo presente in membrana.

Nei nostri esperimenti a cellule FRT-VGF è stato aggiunto, 24 ore dopo il piastramento, 30µM mevinolin (Sigma) in F12 supplementato con 2.5% siero delipidato (Sigma) e 200µM mevalonato (Sigma).Le cellule sono state incubate per 47 ore a 37°C. Successivamente le cellule sono state

trattate con 10mM metil- β -ciclodestrina in areal medium (terreno F12 senza NaHCO_3 e con 20 mM Hepes, pH 7.5 e 0.2% albumina bovina) per un ora a 37°C. Per valutare l'entità della deplezione di colesterolo il lisato cellulare è stato sottoposto ad un saggio colorimetrico che consente di dosare il colesterolo presente nel lisato (SIGMA).

Saggio per quantizzare il colesterolo presente in un lisato.

Questo saggio è un sistema di analisi che si basa su una serie di azioni enzimatiche per determinare i livelli di colesterolo: gli esteri del colesterolo sono idrolizzati enzimaticamente dalla colesterolo esterasi a colesterolo ed acidi grassi liberi. Il colesterolo libero è ossidato ad opera della colesterolo ossidasi a colest-4-en-3' e perossido di idrogeno, quest'ultimo si combina con acido idrossibenzoico e 4-amminoantipirina in presenza di perossidasi e forma un cromoforo il quale può essere quantificato a 550 nm. Quindi l'assorbanza del campione a 550 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo presente. Tutti gli enzimi ed i composti menzionati sono contenuti nel reagente Infinity Cholesterol Reagent (SIGMA DIAGNOSTICS).

Il protocollo prevede che a 100 μl di lisato cellulare vengano aggiunti 900 μl di Infinity Cholesterol Reagent. I campioni vengono incubati in agitazione su termomixer a 37°C per 5 minuti. In seguito viene letta l'assorbanza di ogni campione a 550 nm usando lo spettrofotometro SmartSpek della Biorad. I campioni vengono analizzati in duplicato, per avere una misura più precisa, e viene considerato come valore la media dei due valori.

Secrezione di VGF dopo trattamento di deplezione di colesterolo o sfingolipidi.

Le cellule sono state trattate con le droghe, come descritto sopra e poi incubate in mezzo F12 senza siero per ulteriori 6 ore in presenza delle droghe. Sono stati raccolti i terreni, sono state lisate le cellule ed i campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western blot.

Secrezione regolata di VGF dopo trattamento di deplezione di colesterolo o sfingolipidi.

Le cellule sono state trattate con le droghe, come descritto sopra e poi incubate in mezzo F12 senza siero per 30 minuti in presenza delle droghe e PMA. Al termine del trattamento sono stati raccolti i terreni, sono state lisate le cellule ed i campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE.

Esperimenti di espressione e di secrezione polarizzata

Le cellule sono state coltivate in piastra da 100 mm o da 35 mm e su filtro in un sistema bicamerale. I terreni di coltura privi di siero sono stati raccolti e messi in tubi eppendorf con inibitori di proteasi. Le cellule, sono state lisate in TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) contenente 1% Triton-X100 e inibitori di proteasi a 4°C in agitazione. Negli esperimenti di secrezione polarizzata le cellule coltivate su filtro, vengono incubate in terreno senza siero per i tempi sperimentali di secrezione,

scaduti i quali i terreni si raccolgono in tubi eppendorf ed i filtri escissi dal supporto ed inseriti in tubi contenenti il buffer di lisi. I tubi vengono incubati a 4°C in agitazione.

Tutti i campioni vengono centrifugati per 15 minuti a 4°C in centrifuga Eppendorf a 14000 rpm (20800 rcf). I sovrantanti sono trasferiti in un tubi nuovi.

I campioni sono solubilizzati in Laemmli sample buffer 5X e bolliti 5 minuti e caricati su SDS-PAGE al 10%. Le proteine si trasferiscono su un filtro di polyvinylidene fluoride (PVDF) Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA) e si rivelano per chemiluminescenza dopo Western Blotting.

Analisi dell'aggregazione di proteine.

Per l'esperimento di aggregazione sono stati utilizzati tre differenti buffer di lisi: buffer aggregante (A), buffer non aggregante (NA) e buffer riaggregante (RIA).

Buffer A: 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100.

Buffer NA: 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100.

Si lavano due volte le cellule con PBS freddo. Si lisano le cellule cresciute in tre differenti piastre con i tre diversi buffer (A, NA e RIA) 1ml/piastra ma senza Triton X100 e con inibitori di proteasi.

Si screpano le cellule su ghiaccio e si raccolgono in tubi eppendorf da due ml. Si omogenizza con un ago 23G passando le cellule per 15 volte attraverso l'ago. Si porta il tutto a 1% Triton X-100. I campioni si incubano in rotazione per 20 minuti a 4°C. Si inseriscono in tubi da

ultracentrifuga e si incubano per 15 minuti in ghiaccio. Si centrifuga a 45,000 rpm per 15 minuti a 4°C (rotore TL100 BECKMAN).

Si conservano i sovranatanti che saranno la parte solubile dei lisati identificati come **S** e i pellet (**P**) vengono risospesi in 1 ml di buffer A o NA con una siringa. Il campione contenente il buffer A viene diluito con 1ml dello stesso buffer, così anche il campione contenente il buffer NA viene diluito con il proprio buffer. I campioni vengono incubati in ghiaccio 15 minuti. I campioni vengono centrifugati a 45,000 rpm per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione si raccolgono i sovranatanti e i pellet vengono risospesi in 1ml di buffer NA con una siringa. A questo punto i campioni vengono analizzati mediante SDS-Page e Western Blot.

Velocity gradient in saccarosio.

Le cellule sono cresciute all'80% di confluenza in piastre da 100 mm di diametro, lavate con PBS e lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100. Si screpano le cellule e si omogenizzano con una ago 26 G per 15 volte. Si pellettano i nuclei per centrifugazione ed i campioni vengono caricati su un gradiente di densità di saccarosio (5-30%). Si ultracentrifuga a 45,000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono frazioni di 500 µl dall'estremità superiore del gradiente, si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%, si trasferiscono su filtro di nitrocellulosa e le proteine specifiche sono rilevate mediante Western Blot usando specifici anticorpi.

Velocity gradient in glicerolo.

Le cellule sono cresciute all'80% di confluenza in piastre da 100 mm di diametro, lavate con PBS e lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl. 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100. Si screpano le cellule e si omogenizzano con una ago 26 G per 15 volte. Si pellettano i nuclei per centrifugazione ed i campioni vengono caricati su un gradiente discontinuo di densità di glicerolo (20-40%). Si ultracentrifuga a 45,000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono 15 frazioni di 300 µl dall'estremità superiore del gradiente, si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%, si trasferiscono su filtro di nitrocellulosa e le proteine specifiche sono rilevate mediante Western Blot usando specifici anticorpi.

Gel filtration o cromatografia ad esclusione molecolare.

Le cellule FRT-VGF si lisano in buffer 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl. 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 per 30 minuti in ghiaccio.

I lisati cellulari si omogenizzano con una ago 23 G e, dopo che i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione, 250 µl di sovrinatante sono caricati su una colonna Sephadex 6HR 10-30 per cromatografia ad esclusione molecolare (Amersham). Il flow rate è stato settato a 0.5 ml/min e 28 frazioni di 0.5 ml sono state raccolte. Ogni frazione è stata TCA precipitata e analizzata mediante SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate mediante Western Blot usando specifici anticorpi.

Risultati

VGF SI ASSOCIA A RAFTS MA NON LA TIREOGLOBULINA

Le cellule FRT sono cellule epiteliali polarizzate: indirizzano selettivamente proteine e lipidi alla membrana apicale oppure basolaterale e sono capaci di secernere le proteine con modalità polarizzata dal compartimento apicale oppure basolaterale (Lipardi et al., 1999). E' stato già dimostrato che la proteina VGF in cellule FRT è inclusa in granuli secretori che vengono esocitati dalla membrana apicale (Gentile et al, 2004). Abbiamo dimostrato che anche la proteina Tg, espressa stabilmente in cellule FRT, viene secreta con polarità apicale ma con modalità costitutiva. Quindi entrambe le proteine Tg e VGF in cellule FRT vengono secrete dal polo apicale ma con modalità differenti. Ci siamo chiesti quali siano i meccanismi molecolari attraverso cui si realizza la segregazione delle due proteine e l'inclusione di VGF in granuli secretori. La destinazione di una proteina può essere determinata da informazioni contenute nella proteina stessa e dall'interazione della proteina con componenti del "carrier" vescicolare in cui è stata inclusa. In particolare abbiamo analizzato le Interazioni molecolari che intervengono nella progressione delle proteine di interesse dal compartimento biosintetico verso quello esocitico.

Abbiamo innanzitutto valutato la possibile interazione con i rafts lipidici.

I rafts lipidici hanno attratto la nostra attenzione poiché hanno la funzione di segregare o accumulare proteine, ed è stato ipotizzato che questi microdomini lipidici funzionano da piattaforma per il trasporto apicale di proteine di membrana (Simons e Ikonen, 1997). I rafts, inoltre, sono stati descritti essere coinvolti nel traffico vescicolare lungo i microtubuli (Allan et al, 2002), nella formazione di vescicole secretorie che non contengono proteine di rivestimento o adattatori noti e nel processo di fusione delle

vescicole secretorie (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007; Dalacou and Jacob, 2006; Salaun et al, 2005)

I rafts possono essere isolati biochimicamente come Detergent Resistant Membrane (DRM) grazie alla loro insolubilità in detergenti non ionici come il Triton X-100. Abbiamo determinato se Tg e VGF si associano a rafts per capire se tale associazione sia il meccanismo responsabile della secrezione delle due proteine. Abbiamo coltivato le cellule FRT-Tg e FRT-VGF in piastra, abbiamo raccolto le cellule e le abbiamo lisate con un buffer contenente 1% Triton X-100 a 4°C. Mediante centrifugazione abbiamo separato le proteine solubili da quelle insolubili al detergente e processato i campioni per SDS-PAGE e Western blot. Abbiamo ottenuto come risultato che Tg viene completamente solubilizzata dal trattamento mentre per VGF esiste una quota insolubile (circa il 30%), come mostra la Fig. 1. Poiché l'insolubilità in Triton X-100 a 4 °C è uno dei criteri mediante il quale vengono identificate le proteine che si associano a rafts, abbiamo formulato l'ipotesi che una porzione di VGF fosse associata a rafts ma che la Tg non lo fosse. Per verificare questa ipotesi abbiamo valutato se anche altri criteri che dimostrano l'associazione di proteine a rafts risultassero soddisfatti.

Un'altra caratteristica dei rafts lipidici è la loro abilità a flottare nelle frazioni a bassa densità durante centrifugazione su gradiente di densità. Abbiamo lisato le cellule con un buffer contenente come detergente Triton X-100 alla concentrazione di 1% ed abbiamo sottoposto il lisato di cellule FRT-Tg e FRT-VGF ad un frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente di saccarosio discontinuo 5-40 %. Le frazioni sono state prelevate dall'alto del tubo e sono state ottenute 12 frazioni totali. Le prime quattro frazioni sono quelle denominate pesanti, cioè quelle a più alta concentrazione di saccarosio (40%) e contengono le proteine solubili, quindi non associate a rafts. La frazione n° 5 è considerata intermedia,

mentre le frazioni da 6 a 12 sono quelle leggere, rappresentano cioè le frazioni flottanti dove sono contenuti i rafts e le proteine associate a rafts. (Brown and Rose, 1992; Lipardi et al., 1998). Dal risultato del Western blot si evince che Tg è presente solo nelle frazioni pesanti mentre VGF è presente anche nelle frazioni leggere per circa il 30% frazioni dove è presente il ganglioside GM1, da noi utilizzato come marker di rafts (Fig. 1).

Questi risultati ci consentono di ipotizzare che la proteina VGF sia associata a rafts e che la proteina Tg non lo sia.

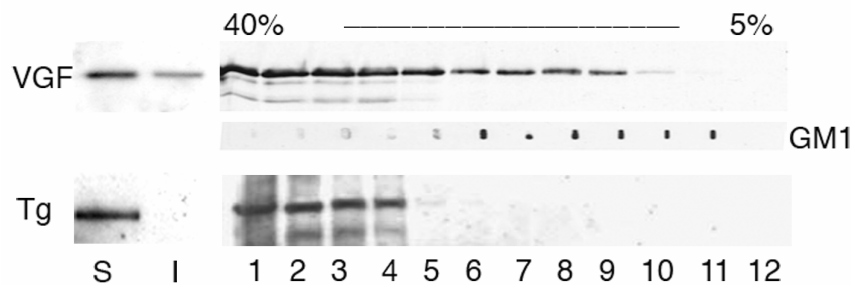


Fig.1

Le cellule sono state lisate con il tampone di lisi TNE-TX-100 1% e centrifugate 2 min a 14000 rpm per separare la fase solubile in TX-100 (S) da quella insolubile (I). I pellets, che costituiscono la frazione insolubile vengono solubilizzati in 100µl di tampone contenente 1% SDS. I campioni sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot.

Cellule FRT-Tg e FRT-VGF sono state lisate in TNE/TX-100 1%. I lisati vengono portati a 40% saccarosio e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman su cui viene caricato un gradiente discontinuo di saccarosio (35-5% TNE). Dopo centrifugazione per 18 ore a 39000 rpm frazioni del gradiente di 1 ml vengono raccolte dalla sommità del tubo, denominate con numeri decrescenti.

50µl di ogni frazione vengono trasferiti su nitrocellulose per effettuare dot-blot che rileva GM1 mediante l'uso della tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni sono poi state precipitate con TCA e le proteine rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con lo specifico anticorpo.

A lungo è stato dibattuto l'utilizzo di detergenti per isolare rafts, infatti alcuni autori ritengono che lo studio dei DRM consente di identificare solo potenziali proteine associate a rafts (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Si ritiene che l'utilizzo dei detergenti possa introdurre degli artefatti perché può generare "cluster" di rafts e può alterare la composizione degli stessi. Pertanto non permetterebbe di analizzare i rafts che normalmente esistono in cellule intatte. A questo scopo è stato sviluppato un metodo per isolare rafts lipidici senza l'utilizzo di detergenti (Macdonald and Pike, 2005). Abbiamo voluto valutare l'associazione di VGF a rafts anche con questo metodo. Abbiamo lisato le cellule FRT-VGF meccanicamente a temperatura ambiente, utilizzando un buffer isotonic contenente calcio e magnesio e sottoposto il lisato a frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente di OptiPrep continuo 0-20%. Le frazioni sono state prelevate dall'alto del tubo e sono state ottenute 18 frazioni totali. Come si può vedere dalla figura 2, anche mediante questo approccio una quota di VGF risulta associata a rafts, infatti è presente nelle frazioni leggere del gradiente dove si distribuisce GM1, marker dei rafts. Questo risultato indica che VGF probabilmente interagisce con rafts, indipendentemente dall'utilizzo di detergenti come TX-100.

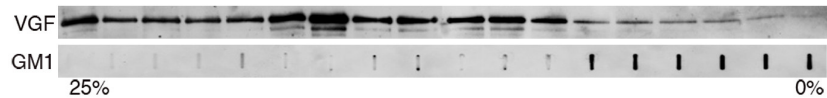


Fig.2

Cellule FRT-VGF sono state lisate con una siringa in un buffer isotonicico detto Base Buffer (20mM Tris-HCl pH 7,5, 250mM saccarosio, 1mM CaCl₂ e 1mM MgCl₂). I lisati vengono portati a 25% optiprep e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman su cui viene caricato un gradiente continuo di optiprep (20-0% in Base Buffer). Dopo centrifugazione per 90 minuti a 52000 g, frazioni del gradiente di 670 µl vengono raccolte dalla sommità del tubo. 50µl di ogni frazione vengono trasferiti su nitrocellulose per effettuare dot-blot che rileva GM1 mediante l'uso della tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni sono poi state precipitate con TCA e le proteine rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con un anticorpo anti VGF.

RUOLO DEL COLESTEROLO E DEGLI SFINGOLIPIDI

I rafts sono microdomini lipidici ricchi in sfingolipidi e colesterolo. Il colesterolo è considerato un lipide fondamentale per il mantenimento della stabilità dei rafts. E' infatti noto che depletando le cellule di colesterolo si ha la destabilizzazione di tali microdomini (Brown, 1998; Klein et al., 1995). Generalmente, per proteine associate a rafts, la deplezione di colesterolo causa una redistribuzione della proteina dalla frazione insolubile a quella solubile (Harder e Simons, 1997; Cerneus et al., 1993). Per valutare se ciò si verifichi anche per la proteina VGF abbiamo depletato le cellule di colesterolo usando due droghe: Mevinolin, che è un inibitore dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutarilCoAsintasi presente nel reticolo endoplasmatico e blocca la sintesi del colesterolo, e metil-β-

ciclodestrina che ha la funzione di rimuovere il colesterolo presente nella membrana plasmatica (Keller e Simons, 1998). Abbiamo coltivato le cellule FRT-VGF in piastra per 24 ore, le abbiamo poi incubate a 37 °C per 47 ore in terreno con siero delipidato contenente Mevinolin e successivamente abbiamo incubato le cellule con metil- β -ciclodestrina in areal medium per 1 ora in stufa a 37 °C. Abbiamo raccolto e lisato le cellule ed abbiamo valutato l'efficienza del trattamento di deplezione mediante un saggio colorimetrico che consente di dosare il colesterolo contenuto in un lisato cellulare. Poi abbiamo sottoposto il lisato di cellule normali e cellule deficienti di colesterolo a frazionamento su gradiente discontinuo di saccarosio 5-40%. Dall'analisi per Western blot delle frazioni ottenute abbiamo rilevato che anche in condizioni di deplezione di colesterolo, VGF flotta nelle frazioni leggere. Si evidenzia tuttavia una riduzione della quota di proteina flottante rispetto al controllo (Fig. 3).

Il colesterolo però non è l'unico costituente dei rafts, ma i rafts sono costituiti anche da sfingolipidi, soprattutto glicosfingolipidi, i quali non vengono alterati dalla deplezione di colesterolo. Per verificare il ruolo degli sfingolipidi nell'associazione di VGF a rafts abbiamo inibito la sintesi di sfingolipidi e valutato se variava la solubilità/insolubilità di VGF. Abbiamo utilizzato a questo scopo la droga Fumonisin (FB₁) che è un derivato fungino capace di inibire l'enzima ceramide sintasi nel reticolo endoplasmatico bloccando la sintesi del ceramide che rappresenta la prima tappa per la sintesi degli sfingolipidi. L'uso di questo reagente, pertanto, impedisce la sintesi degli sfingolipidi, e di conseguenza dei glicosfingolipidi, di cui sono molto ricchi i rafts (Keller e Simons, 1998). Abbiamo incubato cellule FRT-VGF su piastra in terreno di coltura contenente Fumonisin (FB₁) per 72 ore. Abbiamo lisato le cellule con un buffer di lisi contenente 1% Triton X-100. Abbiamo sottoposto i lisati cellulari a frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente

discontinuo di saccarosio 5-40 %. Abbiamo prelevato le frazioni dall'alto del tubo e definito come frazione n°1 l'ultima frazione prelevata e come n°12 la prima prelevata. Abbiamo analizzato le frazioni mediante Western blot ed abbiamo rilevato che dopo trattamento con FB1 VGF non flotta più e diventa tutta solubile (Fig. 3). Ciò rappresenta una ulteriore conferma dell'associazione di VGF a rafts; inoltre questa evidenza sperimentale suggerisce che gli sfingolipidi siano essenziali per la formazione dei microdomini lipidici a cui è associata VGF.

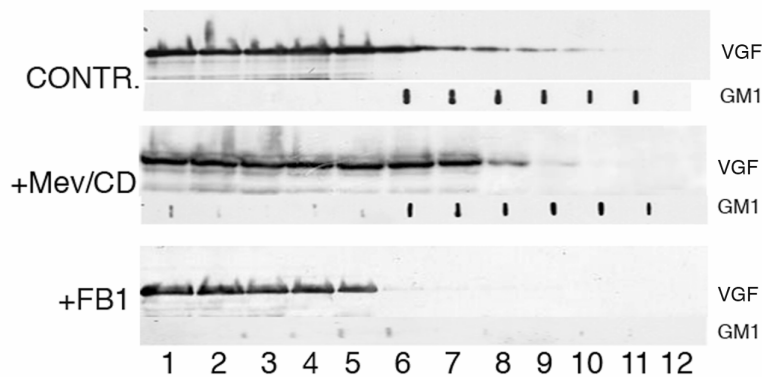


Fig. 3

Cellule FRT-VGF di controllo, cellule FRT-VGF depletate di colesterolo, mediante trattamento con Mevinolin e ciclodestrina e cellule FRT-VGF depletate di sfingolipidi mediante trattamento con FB1, sono state lisate in TNE/TX-100 1%. I lisati vengono portati a 40% saccarosio e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman su cui viene caricato un gradiente discontinuo di saccarosio (35-5% TNE). Dopo ultracentrifugazione frazioni del gradiente di 1 ml vengono raccolte dalla sommità del tubo, denominate con numeri decrescenti. Un aliquota delle frazioni è stata trasferita su nitrocellulose per effettuare dot-blot per rilevare il ganglioside GM1 mediante l'utilizzo della tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni sono state precipitate con TCA. Le proteine sono state rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con anticorpo anti VGF.

VGF E' ASSOCIATA A RAFTS QUANDO E' IN GRANULI DI SECREZIONE.

Per valutare dove comincia l'associazione di VGF a rafts sarebbe stato utile marcare la proteina con isotopo radioattivo, purtroppo però la proteina VGF è difficile da marcare non contenendo gli amminoacidi metionina e cisteina. Abbiamo marcato VGF utilizzando un cocktail di amminoacidi triziati ma i risultati non sono stati soddisfacenti, infatti l'efficienza di marcatura ottenuta è stata bassa ed i tempi, per rilevare il risultato mediante autoradiografia, troppo lunghi. Perciò abbiamo deciso di bloccare la proteina nel reticolo endoplasmatico, mediante incubazione delle cellule a 10 °C per 1 ora (Lotti et al., 1996), e di analizzare la flottazione su gradiente di densità (avendo come confronto le cellule allo steady-state) in modo da definire se l'associazione comincia prima o dopo che la proteina è uscita dal reticolo. Tuttavia non è stato possibile bloccare nel reticolo la proteina VGF dopo incubazione a 10 °C. Anche per immunofluorescenza non appare colocalizzazione con il marker di reticolo anti-recettore KDEL dopo blocco di temperatura (dati non mostrati). Abbiamo allora provato a caratterizzare il compartimento cellulare in cui avviene l'associazione a rafts utilizzando come strumenti per l'analisi due droghe: cicloesimide e PMA. La cicloesimide è un inibitore della sintesi proteica, mentre PMA è un potente secretagogo che è stato già dimostrato stimolare la secrezione di VGF (Gentile et al., 2004). Secondo dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio (Gentile et al., 2004) il trattamento con cicloesimide determina lo svuotamento di reticolo endoplasmatico ed apparato di Golgi mentre permangono granuli di secrezione di VGF. Al contrario il trattamento con PMA svuota rapidamente la cellula dei granuli di secrezione e la proteina permane nel reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi. Quindi, valutare la

solubilità/insolubilità di VGF in queste condizioni ci dà indicazioni sul compartimento cellulare in cui avviene l'associazione a rafts, se è precedente alla formazione dei granuli oppure avviene quando la proteina è in granuli.

A questo scopo abbiamo incubato le cellule coltivate su piastra con cicloesimide per 1 ora a 37 °C o con PMA per 30 minuti a 37 °C, le abbiamo lisate con un buffer contenente 1% Triton X-100, abbiamo separato le proteine solubili da quelle insolubili al detergente utilizzato ed abbiamo valutato la quota di VGF solubile ed insolubile nelle varie condizioni mediante Western blot. Per dimostrare che effettivamente le due droghe hanno funzionato abbiamo messo un vetrino in ogni piastra in cui abbiamo coltivato le cellule dell'esperimento e lo abbiamo processato per immunofluorescenza. La Fig. 4 pannello A mostra che dopo trattamento con PMA non c'è più la quota insolubile di VGF, mentre dopo trattamento con cicloesimide diminuisce la quota solubile ed aumenta quella insolubile rispetto al controllo non trattato. La Fig. 4 pannello B mostra che le droghe hanno funzionato: infatti dopo trattamento con PMA le cellule si svuotano dei granuli secretori (Fig 4-3), mentre dopo trattamento con cicloesimide la proteina VGF è presente solo nei granuli secretori (Fig. 4-2). Questi risultati indicano che l'associazione a rafts si riscontra quando VGF è in granuli di secrezione.

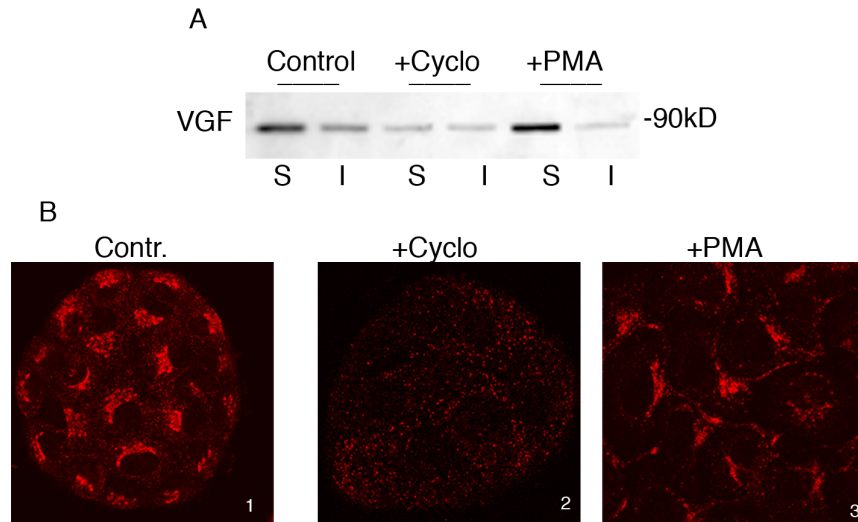


Fig.4

Cellule FRT-VGF coltivate in piastra contenente un vetrino coprioggetto, sono state trattate con cicloesimide e PMA.

Le cellule in piastra sono state lisate con TNE/T-X100 e centrifugate per separare la fase solubile al TX-100 (S) da quella insolubile (I). Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e VGF è stata rilevata mediante Western blot (Pannello A).

Il vetrino con le cellule è stato prelevato dalla piastra e processato per immunofluorescenza indiretta (Pannello B). Allo steady-state VGF è presente in entrambi i compartimenti RER-Golgi e granuli secretori (1),

dopo trattamento con PMA la colorazione di VGF è limitata al compartimento RER-Golgi (3) e dopo cicloesimide VGF è presente solo nel compartimento dei granuli (2).

LA DEPLEZIONE DI COLESTEROLO ALTERA IL SORTING DI VGF.

Abbiamo in seguito esaminato gli effetti della deplezione di colesterolo sulla secrezione di VGF in cellule FRT-VGF. Abbiamo trattato le cellule

con Mevinolin per 47 ore e ciclodestrina per 1 ora aggiuntiva e poi le abbiamo incubate per altre 6 ore in terreno senza siero in presenza di Mevinolin. Abbiamo raccolto i terreni e valutato la quota di proteina secreta mediante Western blot. Le cellule, in cui il colesterolo risulta ridotto in misura del 50% da questo trattamento, mostrano una riduzione della secrezione del 40% rispetto al controllo non trattato (Fig. 5-A). Inoltre dall'analisi al microscopio confocale di cellule piastrate su vetrino, dopo deplezione di colesterolo (Mevinolin e ciclodestrina) e processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo anti-VGF, si evince che il trattamento altera il compartimento dei granuli di secrezione che appaiono raggruppati (Fig. 5-D).

Avendo determinato che l'associazione a rafts avviene nei granuli secretori, avendo osservato che la deplezione di colesterolo interferisce con la secrezione di VGF e sapendo che VGF è una proteina secretoria di via regolata ci siamo chiesti se anche la secrezione stimolata fosse alterata dalla deplezione di colesterolo. Per verificare questa ipotesi abbiamo incubato le cellule FRT-VGF a 37°C con Mevinolin per 47 ore poi con ciclodestrina 30 minuti ed infine con ciclodestrina più PMA per 30 minuti. Abbiamo raccolto i terreni, lisato le cellule e valutato la quota secreta mediante Western blot.

Nelle cellule depletate di colesterolo la secrezione dopo stimolo con PMA è drasticamente ridotta: si evidenzia infatti una secrezione ridotta di circa 70% rispetto al controllo (Fig. 5-C).

Infine abbiamo verificato se perturbando la formazione dei rafts mediante deplezione di colesterolo venisse alterata la polarità di secrezione di VGF. Abbiamo coltivato le cellule FRT-VGF su filtro in un sistema bicamerale e le abbiamo sottoposte a trattamento di deplezione di colesterolo con le droghe mevinolin e ciclodestrina. Abbiamo raccolto i terreni di coltura apicale e basolaterale e lisato le cellule, abbiamo analizzato la polarità di

secrezione mediante Western blot. Come mostra la Fig. 5-B dopo deplezione di colesterolo si evidenzia una quota di proteina presente nel terreno basolaterale. Pertanto l'assenza di colesterolo verosimilmente altera il "pathway" di secrezione polarizzata di VGF.

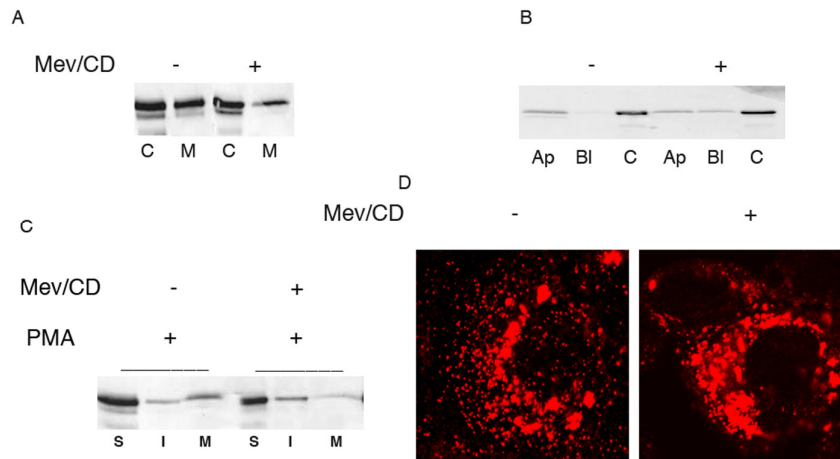


Fig.5

Cellule FRT-VGF, non trattate e trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD). Sono state coltivate in piastra . Sono stati raccolti i terreni e lisate le cellule. I lisati cellulari (C) ed i terreni (M) sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot (A).

Cellule FRT-VGF, non trattate e trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD), sono state coltivate su filtro per 4 giorni. Sono stati raccolti i terreni apicali (Ap) e basolaterali (Bl) delle ultime 6 ore e sono state lisate le cellule. Le proteine presenti nei terreni e nei lisati cellulari (CD) sono state separate su gel di poliaccrilammide 10% e la proteina VGF è stata rilevata mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-VGF (B).

Cellule FRT-VGF sono state coltivate in piastra e non trattate o trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD). Sia le cellule trattate che quelle depletate di colesterolo sono state incubate con PMA per 30 min e sono stati raccolti i terreni (M). Le cellule sono state lisate con TNE/TX-100, sono state separate le proteine

solubili al TX-100 (S) da quelle insolubili (I) mediante centrifugazione. I campioni sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot (C)

Cellule FRT-VGF, coltivate su vetrino coprioggetto non trattate e trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD), sono state fissate e processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo anti-VGF (D).

LA DEPLETEZIONE DEGLI SFINGOLIPIDI ALTERA IL SORTING DI VGF

Abbiamo valutato, inoltre, il ruolo degli sfingolipidi nella secrezione di VGF. Le cellule FRT-VGF sono state trattate con FB₁, un inibitore della ceramide sintasi che blocca quindi la sintesi degli sfingolipidi. Abbiamo piastrato le cellule, dopo 4 ore dal piastramento le abbiamo trattate con FB₁ per 72 ore e poi le abbiamo incubate per altre 6 ore in terreno senza siero in presenza di FB₁. Abbiamo raccolto i terreni e valutato la quota di proteina secreta mediante Western blot. Il trattamento con FB₁ determina una riduzione della quota di proteina secreta nel terreno di coltura (Fig. 6-A). Abbiamo analizzato anche gli effetti sulla secrezione regolata di VGF. Abbiamo incubato le cellule FRT-VGF a 37°C con FB₁ per 72h e poi con FB₁ più PMA per 30 minuti. Abbiamo raccolto i terreni, lisato le cellule e valutato la quota secreta mediante Western blot. Nelle cellule depletate di sfingolipidi la secrezione dopo stimolo con PMA risulta ridotta: si evidenzia infatti una secrezione ridotta di circa 50% rispetto al controllo non trattato (Fig. 6-C).

Abbiamo analizzato anche la polarità di secrezione di VGF dopo trattamento con FB₁ ed abbiamo riscontrato che non viene alterata dalla deplezione degli sfingolipidi, infatti VGF continua ad essere secreta esclusivamente dal dominio apicale (fig.6-B). Questi risultati indicano che

la riduzione del livello degli sfingolipidi altera la secrezione di VGF ma non è sufficiente ad alterare il suo sorting polarizzato.

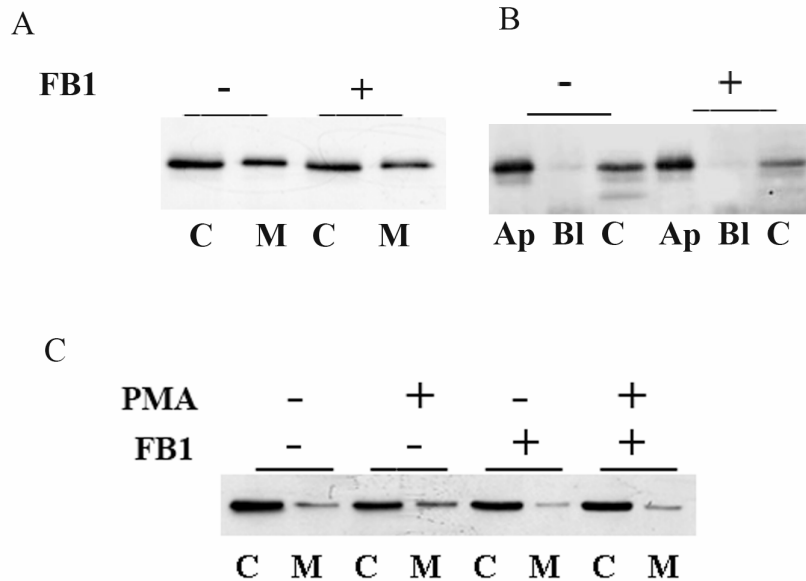


Fig.6

Cellule FRT-VGF, non trattate e trattate con fumonisina B1 (FB1). Sono state coltivate in piastra. Sono stati raccolti i terreni e lisate le cellule con TNE/TX-100. I lisati cellulari (C) ed i terreni (M) sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot (A).

Cellule sono state coltivate su filtro per 4 giorni. Sono stati raccolti i terreni apicali (Ap) e basolaterali (Bl) delle ultime 6 ore e sono state lisate le cellule con TNE/TX-100. Le proteine presenti nei terreni e nei lisati cellulari (CD) sono state separate su gel di poliacrilammide 10% e la proteina VGF è stata rilevata mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-VGF (B).

Cellule sono state coltivate in piastra. Sia le cellule trattate che quelle depletate di sfingolipidi sono state incubate con PMA per 30 min e sono stati raccolti i terreni (M). Le cellule sono state lisate con TNE/TX-100, sono state separate le proteine solubili al TX-100 (S) da quelle insolubili (I) mediante centrifugazione. I campioni sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot (C)

VGF CONTIENE SEGNALI PER INDIRIZZARE PROTEINE IN RAFTS

Per valutare se la proteina VGF contenesse segnali che le consentissero di associarsi a rafts abbiamo generato una proteina chimerica in cui abbiamo fuso VGF al tratto transmembrana del recettore della neurotrofina umana P75 (P75-NTR). Il recettore P75-NTR è una proteina transmembrana, che non si associa a rafts. Abbiamo espresso stabilmente la proteina chimerica VGF-P75, in cellule FRT ed abbiamo dimostrato che essa si localizza negli stessi granuli secretori di VGF e sulla membrana plasmatica. Ci siamo chiesti se la proteina chimerica VGF-P75 fosse realmente associata a rafts. Per fare ciò abbiamo verificato la sua insolubilità in TX-100. Come si può osservare nella Fig.7 la proteina chimerica è principalmente insolubile, a differenza di p75-NTR che risulta completamente solubile (Lipardi et al, unpublished). Concludiamo pertanto che sia la presenza di VGF a determinare l'indirizzo di VGF-p75 in rafts. Ad ulteriore conferma di questo risultato il lisato di cellule FRT-VGF-P75 è stato sottoposto ad un gradiente a due step di OptiPrep per valutare la capacità di flottare della proteina chimerica. Questo tipo di gradiente consente di isolare una frazione arricchita in rafts che si localizza all'interfaccia delle frazioni 30-5%. Dall'analisi mediante Western blot delle frazioni del gradiente si evince che il 50% della proteina è nella frazione dove sono presenti i rafts, quindi a differenza di P75-NTR, P-75 fuso a VGF ha la capacità di associarsi a rafts. Questi risultati ci consentono di ipotizzare che VGF possieda segnali per l'associazione a rafts che sono capaci di indirizzare altre proteine in rafts.

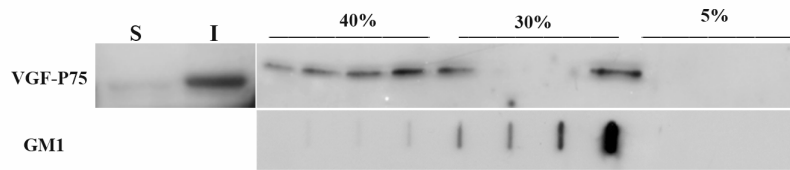


Fig.7

Le cellule FRT-P75 sono state lisate con il tampone di lisi TNE-TX-100 1% e centrifugate 2 min a 14000 rpm per separare la fase solubile in TX-100 (S) da quella insolubile (I). I pellets, che costituiscono la frazione insolubile vengono solubilizzati in 100µl di tampone contenente 1% SDS. I campioni sono stati analizzati per SDS-PAGE e Western blot.

Cellule FRT-P75 sono state lisate in TNE/TX-100 1%. I lisati vengono portati a 40% optiprep e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman se cui vengono posti 4ml optiprep 30% in TNE e 4ml di optiprep 5%. Dopo centrifugazione per 4 ore a 100000 g frazioni del gradiente di 1 ml vengono raccolte dalla sommità del tubo. 50µl di ogni frazione vengono trasferiti su nitrocellulose per effettuare dot-blot che rileva GM1 mediante l'uso della tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni vengono precipitate con TCA e le proteine rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con lo specifico anticorpo.

NELLA PROTEINA VGF NON VI È UN SINGOLO DOMINIO RESPONSABILE DELLA SUA ASSOCIAZIONE A RAFTS

Per individuare, nella catena polipeptidica di VGF, la presenza di un segnale discreto responsabile dell'associazione della proteina a rafts lipidici, abbiamo utilizzato dei costrutti che codificano per proteine

tronche, costituite da porzioni della proteina VGF, in particolare: VGF80-285, VGF286-450 e VGF450-611.

Abbiamo espresso i mutanti di delezione in cellule FRT ed abbiamo ottenuto linee cellulari che esprimevano stabilmente le proteine troncate. Per valutare quindi la loro capacità di associarsi a rafts abbiamo lisato le cellule con un buffer contenente come detergente Triton X-100 alla concentrazione di 1% ed abbiamo sottoposto i lisati ad un frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente di saccarosio discontinuo 5-40%. Il gradiente per flottazione ci ha permesso di determinare che le tre proteine troncate, mutanti di VGF, sono tutte capaci di flottare nelle frazioni leggere del gradiente. Questa osservazione induce a ritenere che VGF non contenga un singolo dominio proteico responsabile della capacità di associarsi a rafts, ma che tali segnali sono verosimilmente distribuiti lungo tutta la proteina.

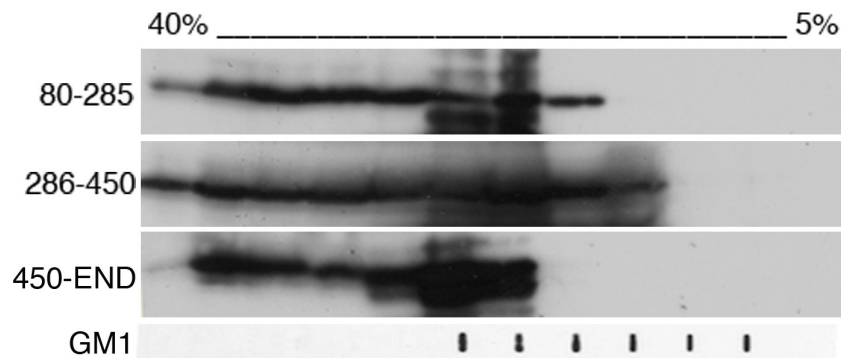


Fig. 8

Cellule FRT-VGF 80-286, FRT-VGF 286-450, FRT-VGF 450-611 sono state lisate in TNE/TX-100 1%. I lisati vengono portati a 40% saccarosio e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman se cui viene caricato un gradiente discontinuo di saccarosio (35-5% TNE). Dopo centrifugazione per 18 ore a 39000 rpm frazioni del gradiente di 1 ml vengono raccolte dalla sommità del tubo, denominate con numeri decrescenti. 50µl di ogni frazione vengono trasferiti su

nitrocellulose per effettuare dot-blot che rileva GM1 mediante la tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni vengono precipitate con TCA e le proteine rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con lo specifico anticorpo.

Possiamo concludere, in via preliminare, che VGF ha la capacità di interagire con rafts lipidici in quanto possiede dei segnali di indirizzo in rafts; che si associa a rafts principalmente quando è in granuli di secrezione e che l'integrità dei rafts possa essere importante per il corretto sorting di VGF. Al contrario, la Tg non si associa a rafts e non viene inclusa in granuli secretori ma in piccole vescicole secretorie. L'associazione a rafts potrebbe essere un primo fattore discriminante per determinare l'inclusione di proteine in granuli secretori. E' stata già descritta la presenza di rafts nella membrana di granuli secretori (Tooze et al, 2001) ed il coinvolgimento dei rafts nei processi di fusione dei granuli secretori con la membrana plasmatica (Salaun et al, 2005).

IN CELLULE FRT LA PROTEINA VGF AGGREGA, AL CONTRARIO DELLA Tg

Dopo aver dimostrato la possibile interazione di VGF a microdomini lipidici, abbiamo voluto analizzare le ulteriori interazioni molecolari che intervengono nella progressione delle proteine VGF e Tg dal compartimento biosintetico verso quello esocitico. In particolare abbiamo analizzato le interazioni proteina- proteina, valutando la rilevanza di queste interazioni nel processo di biogenesi dei granuli secretori. Abbiamo analizzato quindi la capacità di entrambe le proteine di formare complessi. Avevamo dimostrato che la proteina VGF è una granina (Gentile et al., unpublished). Un'importante proprietà biofisica comune alle granine è

quella di coaggregare a basso pH e ad elevata concentrazione di Ca^{2+} , condizioni verosimilmente simili a quelle presenti nel TGN. Questa proprietà potrebbe essere rilevante per indurre l'avvio del processo di biogenesi dei granuli secretori.

Ci siamo chiesti se anche la proteina VGF abbia la capacità di formare aggregati e se quindi si possa ipotizzare che questa proprietà abbia un ruolo nella gemmazione dei granuli secretori. Abbiamo analizzato anche la proteina Tg rispetto alla capacità di formare aggregati.

Per determinare se le proteine VGF e Tg abbiano la tendenza a formare aggregati, le cellule FRT-VGF ed FRT-Tg sono state lisate con un buffer chiamato 'aggregante', ad elevata concentrazione di Ca^{2+} e basso pH, intorno a 6.4. Le cellule sono state anche lisate, per controllo, in un buffer detto 'non aggregante', privo di Ca^{2+} ed a pH 7.4. I campioni sono stati incubati per 15 min a 4°C e poi centrifugati per 15 min a 100,000 g. È stato raccolto il soprannatante ed il pellet è stato risospeso nello stesso buffer. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western blot. Nei campioni trattati con buffer di controllo non aggregante (NA), la proteina VGF si ritrova per circa il 60% nel soprannatante (S), laddove sono presenti le proteine solubili, e per circa il 40% nel pellet (P). Nei campioni trattati con buffer aggregante (A) la proteina VGF è, al contrario, presente solo nella frazione costituita dal pellet (P) (Fig. 9), indicando che la proteina VGF ha la capacità di aggregare. Al contrario la proteina Tg è presente esclusivamente nei soprannatanti sia se viene trattata con buffer aggregante (A) che con buffer non aggregante (NA). Concludiamo che la capacità di formare aggregati non dipende dalle condizioni sperimentali utilizzate ma da proprietà intrinseche della proteina VGF. Quindi solo la proteina VGF ha la proprietà della selettiva aggregazione, caratteristica che potrebbe essere importante per la biogenesi dei granuli secretori.

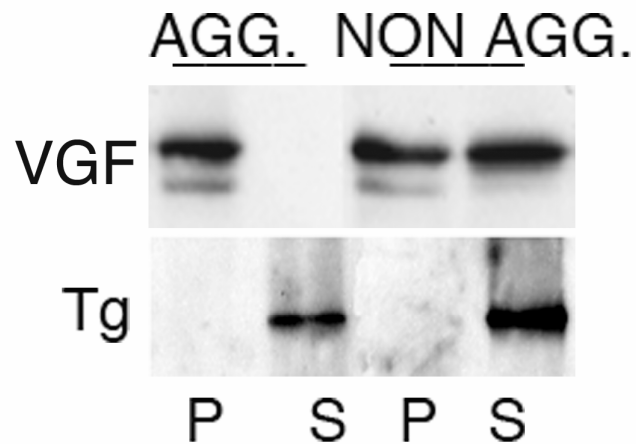


Fig.9

Cellule FRT-VGF e cellule FRT-Tg sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (AGG): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NON AGG): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot.

SOLO LA PROTEINA VGF SI RITROVA IN AGGREGATI AD ALTO PESO MOLECOLARE

Avendo dimostrato che la proteina VGF ha la capacità di aggregare in condizioni di basso pH ed alto calcio, abbiamo voluto analizzare le proprietà dei complessi che si formano nelle cellule FRT.

Per caratterizzare i complessi ad alto peso molecolare abbiamo utilizzato due differenti metodiche: il velocity gradient e la gel filtration.

La metodica del velocity gradient è utilizzata per separare particelle che differiscono per peso, dimensioni e forma, sulla base della loro proprietà di sedimentare con differente velocità in un gradiente di glicerolo. Il velocity gradient consente di analizzare la capacità di una proteina di formare oligomeri. Cellule FRT-VGF sono state lisate in un buffer contenente Triton X-100 ed SDS per solubilizzare completamente le membrane. Il lisato è stato caricato su un gradiente discontinuo di glicerolo 20-40% e sottoposto ad ultracentrifugazione. Sono state raccolte 15 frazioni partendo dalla parte alta del gradiente, le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico ed analizzate mediante SDS-PAGE e Western blot.

La proteina VGF è risultata presente nelle frazioni ad alta densità di saccarosio, dove co-sedimentano proteine con un peso molecolare superiore a 700 kDa (Fig. 10). Al contrario la proteina Tg era esclusivamente nelle frazioni corrispondenti al suo peso monomero. Questo risultato conferma che nelle cellule FRT solo VGF ha la capacità di formare oligomeri.

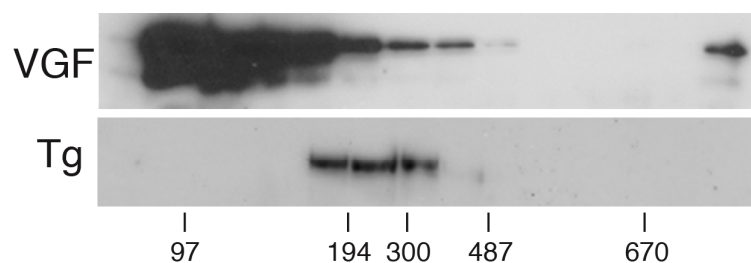


Fig.10

Le cellule, coltivate in piastre da 100 mm di diametro, sono state lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 e passate attraverso un ago 26 G per 10 volte. I nuclei sono stati eliminati mediante breve centrifugazione ed i campioni sono stati caricati su un gradiente di

densità di glicerolo (20-40%). Si ultracentrifuga a 45000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono 15 frazioni di 300 µl dall'estremità superiore del gradiente si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%.

La proteina VGF risulta presente nelle frazioni ad alta densità di saccarosio, dove co-sedimentano proteine con un peso molecolare superiore a 700 kDa, al contrario Tg e presente nelle frazioni dove co-sedimentano proteine con un peso molecolare di circa 300 kDa.

Un'ulteriore metodica applicata per caratterizzare gli aggregati formati dalla proteina VGF è la gel filtration o cromatografia per esclusione molecolare. Questa metodica separa le molecole in base al peso, alla dimensione ed alla forma sfruttando la capacità delle molecole di passare o meno, e con differente velocità, attraverso i pori di un gel con porosità adeguata.

La gel filtration si avvale di colonne cilindriche nelle quali viene impaccato un gel che è in equilibrio con un solvente idoneo rispetto alle molecole da separare. Il campione viene caricato dall'alto della colonna e le molecole in soluzione attraversano la colonna con velocità differente. Le molecole più grosse sono escluse dai pori e sono eluite per prime mentre le altre molecole si distribuiscono lungo la colonna e sono eluite con una velocità proporzionale al loro peso: le proteine più pesanti sono eluite prima di proteine più leggere.

Cellule FRT-VGF sono state lisate con lo stesso buffer utilizzato per il velocity gradient. Il lisato è stato caricato su una colonna di sephadex HR10-30 e sono state raccolte 28 frazioni. I campioni sono stati TCA precipitati e le proteine caricate su SDS-PAGE.

La proteina VGF è presente dalle prime frazioni eluite, laddove si ritrovano proteine ad elevato peso molecolare, con un picco nelle frazioni 13-16 e con un peso apparente di circa 600 kDa. La sua forma monomerica

è presente nelle frazioni 19-20 (Fig. 11). La conclusione di queste osservazioni è che la proteina VGF è presente nelle cellule FRT in complessi ad elevato peso molecolare.

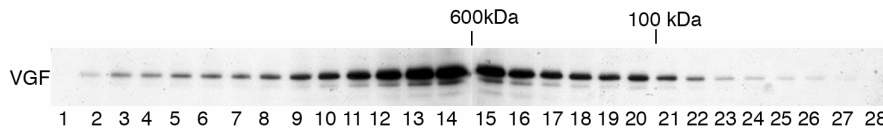


Fig. 11

Cellule FRT-VGF sono state lisate in buffer 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 per 30 minuti in ghiaccio. I lisati cellulari sono stati omogenizzati con una ago 23 G, i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione e 250 ml di sovrantante sono stati caricati su una colonna Sephadex 6HR 10-30 per cromatografia ad esclusione molecolare (Amersham). Il flow rate è stato settato a 0.5 ml/min e 28 frazioni di 0.5 ml sono state raccolte. Ogni frazione è stata TCA precipitata e analizzata mediante SDS-PAGE (Fig. 6C) e Western blot contro VGF.

VGF IN FORMA DI AGGREGATI COMIGRA CON GM1 NELLE FRAZIONI PESANTI DEL GRADIENTE

E' stata avanzata l'ipotesi che l'oligomerizzazione possa avere un ruolo critico per l'inclusione di proteine in vescicole di trasporto (rafts dipendente) destinate all'apice (Paladino et al,2005). L'oligomerizzazione potrebbe stabilizzare l'interazione delle proteine con i rafts, amplificandone l'affinità di legame, o potrebbe consentire alle proteine di legare altre proteine che sono associate ai rafts.

Ci siamo chiesti se VGF in forma di aggregati fosse più o meno capace, rispetto alla forma solubile, di interagire con rafts. A questo scopo

abbiamo estratto le cellule FRT-VGF in buffer aggregante (alto calcio e basso pH) ed abbiamo sottoposto il lisato ad un frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente di saccarosio discontinuo 5-40 %. La proteina VGF, in queste condizioni sperimentali, perde la capacità di flottare nelle frazioni leggere del gradiente, ma è presente solo nelle frazioni più pesanti. Ciò trova una plausibile spiegazione nel fatto che l'alto peso degli aggregati ne determina la sedimentazione sul fondo del tubo da ultracentrifuga. Appare interessante notare che, in questo stesso esperimento, anche il ganglioside GM1 non flotta più ma comigra con VGF nelle frazioni pesanti del gradiente. Questo risultato non dipende dalle condizioni sperimentali utilizzate, in quanto in cellule FRT-Tg estratte in buffer aggregante GM1 mantiene la sua capacità di flottare nelle frazioni leggere del gradiente di densità di saccarosio (Fig.12). La nostra ipotesi è che VGF in forma di aggregato interagisca con il ganglioside GM1.

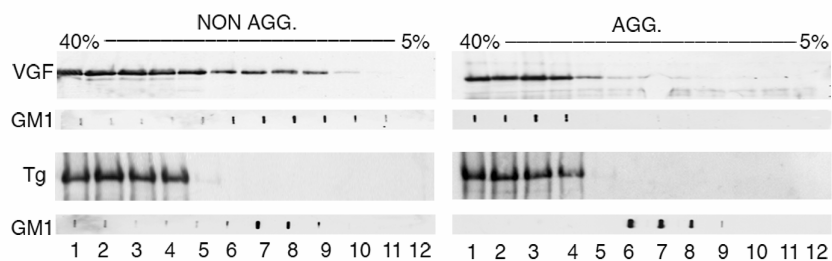


Fig.12

Cellule FRT-VGF e cellule FRT-Tg sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. in 0,5 ml di buffer aggregante (AGG): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NON AGG): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio. I lisati sono stati portati a 40% saccarosio e posti sul fondo di un tubo da ultracentrifuga Beckman su cui viene

caricato un gradiente discontinuo di saccarosio (35-5% in AGG o in NON AGG). Dopo centrifugazione per 18 ore a 39000 rpm frazioni del gradiente di 1 ml vengono raccolte dalla sommità del tubo, denominate con numeri decrescenti. 50µl di ogni frazione vengono trasferiti su nitrocellulose per effettuare dot-blot che rileva GM1 mediante la tossina del colera coniugata con perossidasi. Le frazioni vengono precipitate con TCA e le proteine rivelate mediante SDS-PAGE e Western blot con lo specifico anticorpo.

VGF COLOCALIZZA CON GM1

Per verificare l'esistenza di una possibile interazione tra GM1 e VGF sono stati condotti esperimenti di doppia marcatura per immunofluorescenza laser confocale. Cellule FRT-VGF sono state piastrate su un vetrino 12 mm e processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo anti-VGF e la tossina del colera fluoresceinata. La tossina del colera ha una forte affinità e specificità di legame per il ganglioside GM1, quindi è un utile strumento per visualizzare ed analizzare GM1. Dall'analisi al microscopio confocale si evince una ottima co-localizzazione tra VGF e GM1, in particolare in ogni spot in cui è presente GM1 è sempre presente anche VGF (Fig.13). Una buona colocalizzazione si riscontra anche in cellule PC12, dove VGF è espressa endogenamente indicando che il risultato non è un artefatto del sistema ma una capacità di VGF di colocalizzare con GM1 (Fig.13). Questo risultato sembra confermare l'ipotesi di una diretta interazione fra le due molecole. Inoltre, dall'analisi al microscopio confocale di cellule FRT non permeabilizzate (FRT-VGF NP Fig.13), si evince la presenza di una quota di VGF in membrana plasmatica sottoforma di spot che colocalizzano perfettamente con GM1. Ciò ci ha fatto ipotizzare che questi potrebbero rappresentare gli "HOT-SPOT" nella membrana plasmatica per l'esocitosi dei granuli di VGF.

Infatti e' stato descritto un ruolo dei rafts nell'indirizzamento e fusione di vescicole secretorie (Delacou and Jacob, 2006).

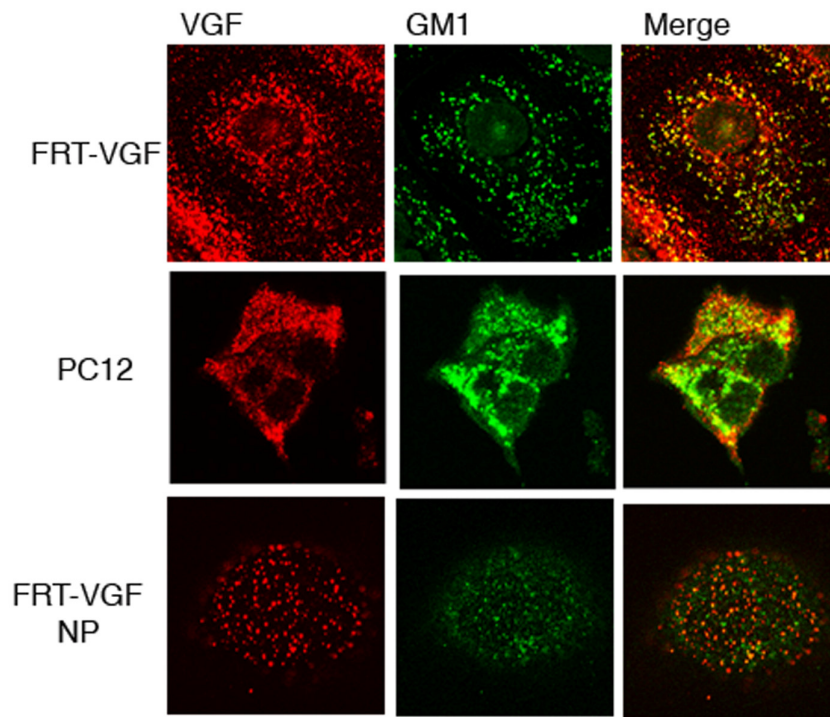


Fig.13

Cellule FRT-VGF e PC12 coltivate su vetrino coprioggetto sono state fissate e permeabilizzate con metanolo:acetone e processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo anti-VGF e contemporaneamente con la tossina del colera coniugata a FITC che identifica GM1.

Cellule FRT-VGF NP sono state coltivate su vetrino coprioggetto, sono state incubate con la tossina del colera coniugata a FITC per 30 minuti a 4°C. Sono state fissate con paraformaldeide e processate per immunofluorescenza indiretta con un anticorpo anti-VGF.

PERTURBANDO I RAFTS NON SI ALTERA LA CAPACITA' DI AGGREGARE DI VGF.

Ci siamo chiesti se la proteina prima aggrega e poi l'aggregato interagisce con rafts oppure, al contrario, per formare l'aggregato ha bisogno prima di interagire con rafts. Per rispondere a questa domanda abbiamo valutato la capacità di VGF di formare complessi dopo aver perturbato i rafts.

Abbiamo trattato le cellule FRT-VGF con Mevinolin per 47 ore e con ciclodestrina per 1 ora, depletandole così di colesterolo oppure le abbiamo trattate con Fumonisina B₁ per 72 ore, depletandole di sfingolipidi.

Abbiamo analizzato la formazione di aggregati in entrambe le condizioni precedentemente menzionate, utilizzando tre differenti metodiche: l'aggregazione in basso pH ed alto calcio, il velocity gradient e la gel filtration.

Sia in condizioni di deplezione di colesterolo, sia in condizioni di deplezione di sfingolipidi VGF mantiene la capacità di aggregare in buffer aggregante, ossia basso pH ed alto calcio (Fig.14-A).

Inoltre, dopo aver perturbato i rafts, VGF continua a formare complessi ad alto peso molecolare: infatti non si evincono variazioni all'analisi mediante velocity gradient (Fig.14-B) e gel filtration (dati non mostrati). Si può concludere che l'integrità dei rafts non è essenziale per la formazione di complessi di VGF, e che l'associazione con rafts non è rilevante per la formazione di complessi. Quindi possiamo ipotizzare che la proteina VGF possa prima formare complessi e poi interagire con i rafts.

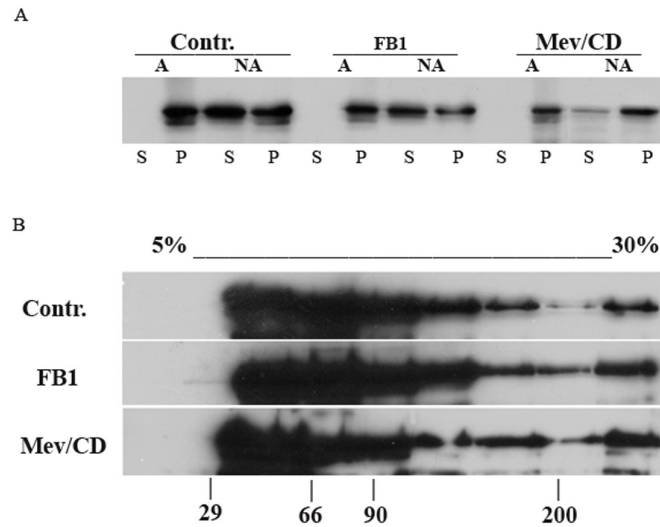


Fig.14

Cellule FRT-VGF, coltivate in piastra non trattate (Contr) e trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD) o con Fumonisina B₁ (FB₁) sono state lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (A): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NA): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot. (Fig. 14-A)

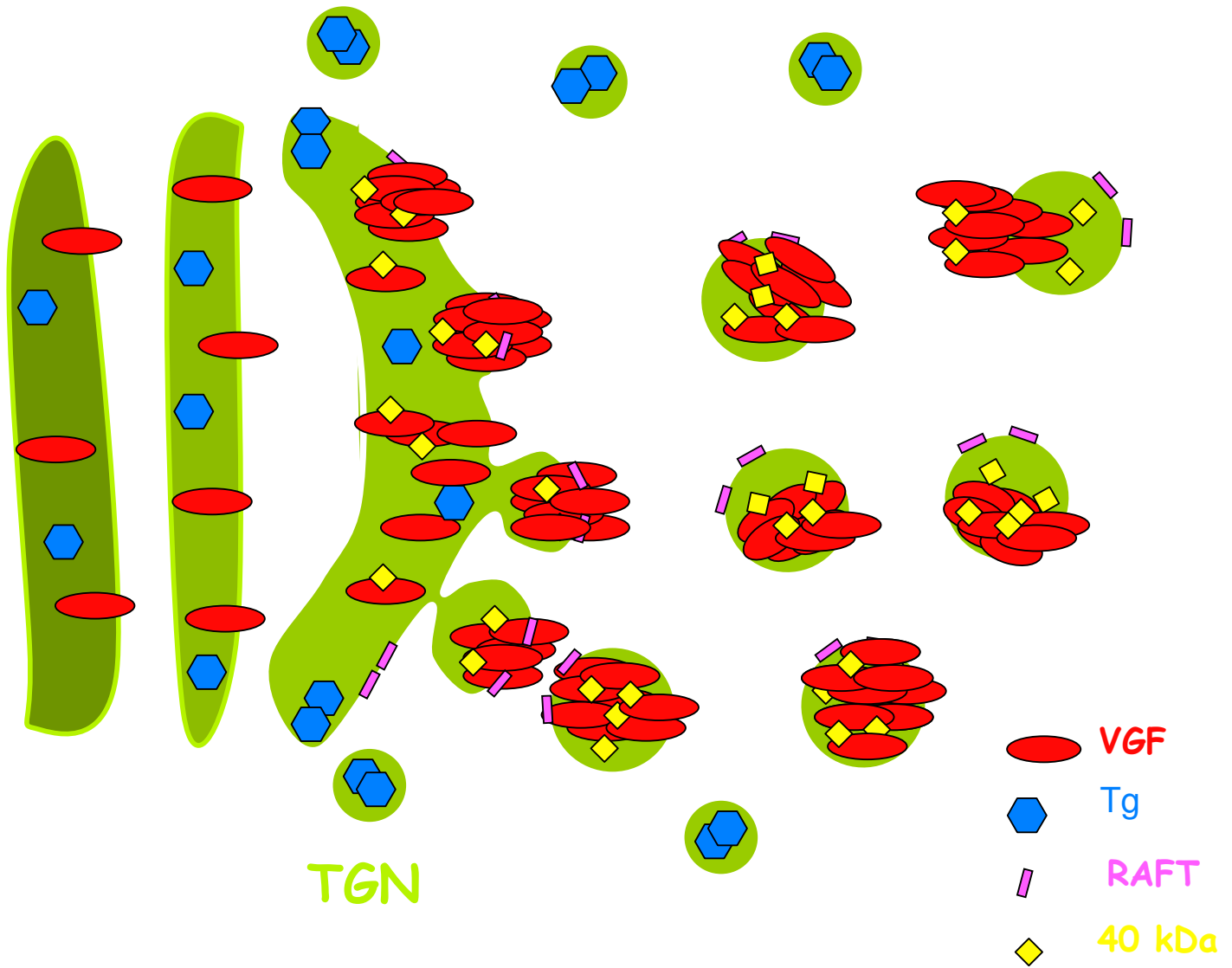
Le cellule, coltivate in piastre da 100 mm di diametro, non trattate (Contr) e trattate con mevinolin (Mev) e ciclodestrina (CD) o con Fumonisina B₁ (FB₁) sono state lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 e passate attraverso un ago 26 G per 15 volte. I nuclei sono stati eliminati mediante breve centrifugazione ed i campioni sono stati caricati su un gradiente di densità di saccarosio (5-30%). Si ultracentrifuga a 45000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono frazioni di 500 ml dall'estremità superiore del gradiente si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%.

MODELLO PER LA BIOGENESI DEI GRANULI SECRETORI.

I dati ottenuti ci hanno consentito di formulare un modello tale da giustificare la biogenesi dei granuli secretori e la segregazione delle proteine VGF e Tg, come mostra la fig. 15.

Nel modello di biogenesi dei granuli secretori che è attualmente più accreditato, il lume del TGN viene considerato il sito deputato alla formazione di aggregati di proteine destinate alla secrezione regolata. Questi aggregati verosimilmente interagiscono con la membrana del TGN per dare inizio alla gemmazione dei granuli.

La proteina VGF ha la capacità di aggregare selettivamente nelle condizioni di basso pH ed alto calcio presenti nel TGN. Riteniamo che nel meccanismo che determina l'aggregazione di VGF intervengono altri fattori intracellulari, poichè abbiamo osservato che la proteina secreta nel terreno di coltura non forma aggregati e che nei complessi formati da VGF sono presenti altre proteine che stiamo ancora cercando di caratterizzare. Gli aggregati di VGF interagiscono con i rafts. La forte interazione tra GM1 e VGF ci ha spinto ad ipotizzare che GM1 funga da recettore per indirizzare il cargo in specifici microdomini della membrana plasmatica. Queste condizioni determinano la biogenesi dei granuli secretori in cui è presente VGF ed il loro successivo indirizzamento alla membrana apicale. La proteina Tg, al contrario, non aggrega selettivamente, non forma complessi e non ha la capacità di interagire con i rafts, pertanto viene esclusa dai complessi di VGF e viene inclusa in vescicole di piccole dimensioni che sono indirizzate al compartimento apicale.



Discussione

In questo lavoro è stato analizzato il ruolo dell'interazione di VGF con altri componenti intracellulari, lipidi e/o proteine, per delucidare i meccanismi molecolari che conducono alla segregazione della proteina VGF, anche rispetto alla proteina Tg, ed alla formazione dei granuli secretori di VGF.

Il punto di partenza è stata l'osservazione che la proteina VGF, espressa stabilmente in cellule epiteliali tiroidee FRT, è segregata in granuli secretori che si accumulano nella cellula e che vengono esocitati dal polo apicale delle cellule dopo stimolazione con PMA (Gentile et al., 2004). Al contrario, la proteina Tg espressa stabilmente in FRT non colocalizza negli stessi granuli secretori di VGF e viene inclusa in vescicole secretorie che sono anch'esse indirizzate al polo apicale della cellula. Ci siamo chiesti se VGF è in grado di interagire con rafts lipidici e se ha la capacità di aggregare. Ci siamo inoltre chiesti se queste due proprietà sono implicate nel meccanismo molecolare mediante il quale la proteina VGF segrega dalla Tg e viene indirizzata nel compartimento della via secretoria regolata. Ci siamo chiesti infine se le interazioni suindicate sono responsabili della formazione ex novo di granuli secretori in cellule non endocrine.

VGF SI ASSOCIA A RAFTS

La capacità di interagire con rafts è una delle più interessanti proprietà di VGF ed è stata oggetto principale delle nostre osservazioni. I rafts sono specifici microdomini lipidici ricchi di sfingolipidi e colesterolo. L'ipotesi originale del coinvolgimento dei rafts nel meccanismo di sorting polarizzato postula che le proteine interagirebbero selettivamente con tali microdomini lipidici che si formano nel bilayer del TGN, e che questa interazione determinerebbe la concentrazione locale delle proteine e la

gemmazione dal TGN di vescicole secretorie che sono indirizzate alla membrana plasmatica apicale. I rafts sarebbero capaci di reclutare una specifica popolazione di proteine e di escluderne altre, svolgerebbero quindi un ruolo nei processi di segregazione delle proteine. Inoltre, è stato proposto che microdomini lipidici possano essere responsabili del sorting di proteine della via regolata (Dannies, 1999). È stata descritta la presenza di microdomini lipidici nei granuli secretori di cellule neuroendocrine (Thiele e Hutner, 1998) ed è stato dimostrato che l'associazione a rafts è necessaria per il sorting della proteina transmembrana carbosipeptidasi E nel pathway di secrezione regolata (Zhang et al, 2003). Noi abbiamo utilizzato più strategie per dimostrare che VGF è capace di associarsi a rafts dal momento che i rafts sono strutture altamente dinamiche e ciò rende difficile la loro caratterizzazione biochimica. Tuttavia questi microdomini lipidici resistono alla solubilizzazione con detergenti non ionici a 4°C, determinando la formazione di membrane resistenti al detergente (DRM) che rappresentano i rafts preesistenti (London, 2005; Silviu, 2006). L'isolamento biochimico dei DRM rappresenta un buon punto di partenza per studiare potenziali proteine associate a rafts. Noi abbiamo utilizzato questo primo metodo per dimostrare l'interazione di VGF con rafts. Abbiamo così determinato che estraendo le cellule FRT-VGF con un buffer di lisi contenente 1% TX-100, una quota di VGF è presente nella frazione delle proteine insolubili ed è capace di flottare nelle frazioni leggere quando sottoponiamo il lisato a centrifugazione su gradiente di densità di saccarosio. Il secondo metodo che abbiamo utilizzato prevede l'isolamento dei rafts senza l'utilizzo di detergenti poiché è stato suggerito che l'utilizzo dei detergenti potrebbe introdurre degli artefatti (Munro, 2003). In cellule FRT-VGF lisate meccanicamente a temperatura ambiente, utilizzando un buffer isotonic, una quota di VGF risulta capace di flottare nelle frazioni contenenti rafts se il lisato è

sottoposto a frazionamento mediante centrifugazione su un gradiente di densità di OptiPrep. Anche con questo approccio abbiamo dimostrato che VGF ha la capacità di interagire con rafts lipidici.

Abbiamo dimostrato, al contrario, che la Tg in cellule FRT non si associa a rafts in quanto non soddisfa i criteri suindicati che definiscono l'associazione a rafts. Infatti, la Tg non resta insolubile dopo estrazione in Triton X-100 e non è presente nelle frazioni flottanti dopo frazionamento su gradiente di densità di saccarosio. I nostri dati sembrerebbero discordanti con quanto pubblicato da Martin-Belmonte et al., i quali hanno dimostrato che in cellule epiteliali di rene di cane, MDCK, la proteina Tg viene secreta dalla membrana apicale mediante associazione a rafts (Martin-Belmonte et al., 2000). In realtà gli autori hanno analizzato un clone particolare di cellule MDCK in cui la proteina Tg non viene secreta come proteina solubile ma resta adesa alla membrana plasmatica. Probabilmente, in quella situazione sperimentale, la proteina Tg ha subito riarrangiamenti o modificazioni che la tengono adesa alla membrana, forse perché parzialmente inserita nella stessa, e ciò spiegherebbe la sua associazione a rafts. Nel corso dei nostri esperimenti noi stessi abbiamo potuto verificare che durante la trasfezione la Tg subisce frequentemente modifiche che ne fanno variare il peso molecolare apparente. I nostri risultati sembrerebbero più attendibili in quanto i cloni da noi utilizzati secernono nel terreno di coltura la proteina Tg del peso molecolare atteso. Complessivamente i nostri risultati indicano che solo la proteina VGF, ma non la Tg, interagisce con rafts lipidici e suggeriscono che questa interazione possa avere un ruolo nella segregazione della proteina VGF in granuli secretori.

PERTURBANDO LA COMPOSIZIONE LIPIDICA DEI RAFTS SI ALTERA LA CAPACITA' DI VGF DI FLOTTARE

I rafts sono microdomini lipidici ricchi di sfingolipidi e colesterolo. Il colesterolo è un lipide fondamentale per la stabilità dei rafts ed è infatti noto che la sua rimozione determina la loro disaggregazione e riduce o elimina la flottazione di proteine associate a rafts (Klein et al., 1995). Noi abbiamo valutato se la presenza del colesterolo è importante per l'associazione di VGF ai lipidi. Abbiamo perciò analizzato le proprietà di flottazione di VGF in assenza di colesterolo ed abbiamo determinato che, anche in assenza di colesterolo, VGF è ancora presente, anche se in percentuale ridotta, nelle frazioni flottanti. Ciò indica che una quota di VGF permane in microdomini resistenti all'estrazione in Triton X-100, anche in assenza di colesterolo. Questo risultato può essere verosimilmente spiegato dal fatto che il colesterolo non è l'unico costituente dei rafts ma ci sono anche gli sfingolipidi e che questi permangono nella cellula anche in assenza di colesterolo. E' anzi possibile ipotizzare che gli sfingolipidi, in questa nuova condizione, si assemblino con maggiore affinità, formando nuovi microdomini a cui resta associata la proteina VGF, che mantiene così la sua caratteristica flottazione. Questa ipotesi sembrerebbe confermata dall'evidenza che, inibendo la sintesi degli sfingolipidi, VGF diventa completamente solubile all'estrazione in Triton X-100 e non è più presente nelle frazioni leggere. Riteniamo che gli sfingolipidi siano il costituente lipidico fondamentale per la formazione dei rafts a cui si associa VGF e che VGF possa essere legato specificamente a qualcuno di essi. Certamente anche il colesterolo svolge un ruolo importante nella secrezione di VGF: infatti l'analisi al microscopio confocale di cellule FRT-VGF depletate di colesterolo evidenzia un'alterazione della distribuzione dei granuli secretori che appaiono raggruppati in cluster.

VGF E' ASSOCIATA A RAFTS QUANDO E' IN GRANULI SECRETORI

Ci siamo chiesti dove cominciasse, lungo la via secretoria, l'associazione di VGF a rafts. Abbiamo avuto difficoltà a marcare la proteina con un isotopo radioattivo, come sarebbe stato opportuno fare, per carenza di metionine e cisteine tra gli amminoacidi della proteina. Per questo motivo abbiamo deciso di determinare la solubilità/insolubilità di VGF in due condizioni distinte: quando la proteina è tutta contenuta in granuli secretori o quando, al contrario, essa è presente nei compartimenti più a monte: reticolo endoplasmatico ed apparato di Golgi. Ciò è stato possibile grazie all'uso di due composti: la cicloesimide ed il PMA che, come abbiamo precedentemente dimostrato (Gentile et al., 2004), consentono di ottenere le due condizioni precedentemente menzionate. La cicloesimide, infatti, bloccando la sintesi proteica, per un tempo opportuno, determina l'assenza di proteina nei compartimenti più immediatamente post-sintetici (reticolo endoplasmatico ed apparato di Golgi). Il PMA, al contrario, provocando la esocitosi dei granuli, determina la presenza di proteina quasi esclusivamente nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi. Il risultato di questa analisi è che la proteina VGF appare interagire con i rafts quando è in granuli di secrezione e non quando è nei compartimenti reticolo endoplasmatico-apparato di Golgi. Questo risultato sembra coerente con i dati pubblicati in letteratura: è stato infatti proposto che i rafts originano dal TGN dove fungono da piattaforma per la segregazione delle proteine (Simons e Ikonen, 1997).

RUOLO DEI RAFTS NEL SORTING DI VGF.

E' stato da più autori proposto che l'integrità dei rafts sia importante nel processo di esocitosi, in generale, e che i rafts siano regolatori essenziali nei processi di secrezione regolata (Salaün et al., 2004). Alla base di questa proposta vi è l'osservazione che l'alterazione della composizione lipidica dei rafts influenza i processi di esocitosi, in molte condizioni sperimentali. E' stato dimostrato che la deplezione di colesterolo inibisce la secrezione di proteine della via regolata e che questa inibizione è reversibile: la formazione di granuli secretori viene infatti ripristinata dopo l'aggiunta alle cellule di colesterolo. Inoltre, in cellule con un pathway secretorio regolato poco sviluppato, la produzione di granuli secretori può essere stimolata da un eccesso di colesterolo (Wang et al., 2000). I nostri risultati indicano che i livelli di colesterolo sono importanti per una corretta inclusione di VGF nella via secretoria. Abbiamo dimostrato, infatti, che la deplezione di colesterolo blocca la secrezione regolata di VGF e ne altera la polarità di secrezione.

Oltre al colesterolo, anche gli sfingolipidi sono importanti per l'integrità dei rafts. E' stato riportato che la deplezione di sfingolipidi determina un alterato sorting di alcune proteine di via regolata (Blasquez et al, 2000). I nostri risultati indicano che l'inibitore degli sfingolipidi FB1 determina la completa solubilizzazione di VGF all' estrazione in Triton X-100 ma che esso ha effetti rilevanti esclusivamente sulla secrezione regolata di VGF ma non altera la sua polarità di secrezione.

VFG INTRACELLUARE SI RITROVA IN AGGREGATI

Riteniamo che VGF debba essere inclusa nella classe delle granine dal momento che condivide molte proprietà con le granine, quali la ricchezza in amminoacidi acidi e in prolina, il punto isoelettrico basso, la presenza di una sequenza amminoacidica consenso delle granine e siti di taglio per ormono-convertasi. Risultati sperimentali ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato dimostrano inoltre un'elevata termostabilità della proteina e la sua capacità di indurre la formazione di granuli in cellule che si ritiene non posseggano il macchinario per la secrezione regolata delle proteine (Gentile et al., unpublished).

La capacità di aggregare è una delle più interessanti proprietà delle granine in relazione alla loro caratteristica di indurre formazione di granuli ed è stata perciò oggetto delle nostre osservazioni. Abbiamo utilizzato più strategie per dimostrare che VGF è capace di formare aggregati e per caratterizzare questi aggregati. Abbiamo innanzitutto risospeso i lisati cellulari in cui era contenuta la proteina VGF in un tampone ad elevata concentrazione di calcio ed a pH basso. L'utilizzo di questo tampone è stato proposto con l'intento di simulare in vitro le condizioni chimico-fisiche che si ritiene siano caratteristiche del TGN e per dimostrare che proteine appartenenti alla famiglia delle granine sono capaci di formare aggregati se risospese in questo tampone (Chanat and Huttner, 1991; Gerdes et al, 1989). L'implicazione di questa osservazione è che, in vivo, proteine destinate alla via di secrezione regolata, aggregano nel TGN e che l'aggregazione sia un momento critico nella formazione e successiva gemmazione dei granuli secretori. Abbiamo dimostrato che la proteina VGF espressa in cellule FRT forma aggregati quando viene risospesa in tampone ad alto calcio e basso pH e che la formazione di aggregati è specifica per VGF rispetto ad altre proteine secretorie ed è anche specifica

per la proteina VGF intracellulare rispetto a quella secreta nel terreno di coltura.

Altre proteine secretorie in cellule FRT, come la tireoglobulina, non formano aggregati nelle stesse condizioni di elevato calcio e basso pH, indicando che non si tratta di un artefatto dovuto alle condizioni sperimentali e che l'aggregazione è specifica per la proteina VGF. Per confermare la formazione di aggregati da parte della proteina VGF, e per caratterizzare gli stessi, abbiamo utilizzato due differenti approcci: velocity gradient e gel filtration. Queste tecniche hanno dimostrato che una quota significativa di VGF intracellulare è presente in aggregati ad alto peso molecolare ed hanno confermato che la Tg, in cellule, FRT non è presente in aggregati ad alto peso molecolare. L'utilizzo di condizioni sperimentali differenti nelle varie metodologie non le rende direttamente comparabili e pertanto non è possibile una stima accurata della dimensione molecolare degli aggregati. D'altro canto la mancata conoscenza di eventuali altre componenti proteiche e/o lipidiche che co-aggregano con la proteina VGF rende impossibile la valutazione del numero di subunità di VGF presenti in un singolo aggregato.

E' peraltro sorprendente che la tireoglobulina non formi aggregati poichè essa ha una capacità intrinseca di formare sia dimeri, sia oligomeri a peso molecolare più elevato. Inoltre, nella ghiandola tiroidea in vivo, la tireoglobulina si accumula nel lume dei follicoli dove tende a formare aggregati che possono comprendere l'intero contenuto di un singolo lume ed essere estremamente compatti e resistenti alla dissociazione (Berndorfen et al, 1996). E' anche interessante notare che nella ghiandola tiroidea si determinano condizioni di elevata concentrazione di calcio e che la più elevata concentrazione di calcio si ritrova appunto nel lume dove si accumula la tireoglobulina (Haeberli et al, 1978). Evidentemente, al di là della elevata concentrazione di calcio, sono altre le proprietà fisico-

chimiche (concentrazione proteica, pH, etc.) che favoriscono la aggregazione delle molecole di tireoglobulina.

MECCANISMO MOLECOLARE DI INTERAZIONE CON RAFTS.

L'interazione stabile delle proteine cargo con la membrana dei granuli secretori è un evento essenziale per la biogenesi dei granuli secretori stessi.

Noi non abbiamo ottenuto risultati sperimentali che chiariscano il meccanismo molecolare dell'interazione della proteina VGF con i rafts. Ci siamo chiesti come faccia VGF ad interagire con rafts considerando che non si tratta di una proteina di membrana ma una proteina solubile. Abbiamo ipotizzato che VGF possieda segnali per interagire con i rafts non solo sulla base della sua insolubilità ai detergenti e del suo comportamento su gradiente di saccarosio, ma anche perché determina l'insolubilità, la flottazione su gradiente e l'indirizzamento in granuli secretori della proteina P75 quando fusa con essa nella chimera VGF-P75. Il recettore P75, in cellule 293T, non si associa a rafts allo steady-state ma solo dopo interazione con il ligando che ne determina l'attivazione (Higuchi et al, 2003). In cellule FRT il recettore P75 non si localizza in rafts (Lipardi et al, unpublished). Inoltre noi abbiamo fuso a VGF solo il dominio transmembrana e citosolico di P75, in una condizione che verosimilmente ne preclude l'attivazione.

Si ritiene che un dominio di alfa-elica sia importante per il l'indirizzamento e l'interazione di proteine con la membrana dei DCSG. Recenti risultati hanno dimostrato che l'alfa-elica svolge questa funzione perché determina una segregazione di cariche generando una regione idrofobica che si inserisce direttamente in membrana (Dikeakos et al,

2007). La presenza di un dominio di alfa-elica è stato dimostrato anche per VGF: gli ultimi 73 aa della proteina contengono in realtà 2 alfa-elica ed è stato proposto che questa regione sia essenziale per l'indirizzamento di VGF in granuli secretori, nelle cellule PC12 (Garcia et al., 2005). L'ipotesi che l'alfa-elica abbia un ruolo come segnale di indirizzo in rafts sembrerebbe poco plausibile per le cellule FRT dal momento che l'alfa-elica è presente esclusivamente nella regione carbossi-terminale e l'analisi da noi effettuata sulle proteine VGF troncate al carbossi-terminale, in particolare, VGF80-285, VGF286-450 e VGF450-611, ha indicato che esse sono tutte ancora capaci di interagire con rafts. Questo risultato suggerisce che la capacità di interagire con i rafts sia distribuita in regioni differenti della proteina. Per quello che concerne le implicazioni della capacità di interagire con i rafts, non vi sono evidenze sperimentali che indicano che l'interazione con i rafts favorisca l'aggregazione. Tuttavia, le proteine troncate da noi studiate mostrano tutte la capacità di formare aggregati (Gentile et al., 2004) che non verrebbero alterati, secondo le nostre evidenze sperimentali, a seguito della perturbazione dei rafts mediante inibizione della sintesi di loro componenti lipidiche. Inoltre, esperimenti di separazione su gradiente di VGF in forma di aggregati suggeriscono fortemente che l'aggregato interagisce con un lipide, forse direttamente con il ganglioside GM1. Questa ipotesi è resa più plausibile dal fatto che nella proteina VGF sono intersperse sequenze amminoacidiche a cui è stata attribuita la capacità di promuovere l'interazioni con GM1 (Montaner et al., 2006). Noi ipotizziamo che GM1 funga da recettore per indirizzare l'aggregato di VGF in regioni specifiche del TGN determinando, così la gemmazione dei granuli secretori.

Una ipotesi alternativa, per spiegare l'interazione di proteine solubili con la membrane del TGN, è che le proteine di via regolata esistono in due forme: una forma solubile ed una forma associata a membrana. La

multimerizzazione delle due forme determina la formazione di grossi aggregati che sono in contatto con le membrane in specializzati sottodomini da cui si genereranno i granuli secretori (Tooze et al., 2001). Questa ipotesi appare plausibile nel caso della proteina VGF dal momento che esperimenti di immunofluorescenza, in assenza di permeabilizzanti, mostrano che una quota della proteina appare in spots associati alla membrana dove VGF colocalizza perfettamente con GM1. Questi spots in membrana potrebbero altresì rappresentare i siti di fusione dei granuli secretori di VGF che potrebbero fondersi con un meccanismo di tipo kiss-and-run (Richmond and Broadie, 2002). Questo meccanismo determina la formazione transiente di un poro di fusione che permette il rilascio del contenuto del granulo ed il successivo ricircolo della membrana del granulo stesso.

CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo dimostrato che la proteina VGF manifesta la capacità di interagire con i rafts lipidici, forse direttamente con GM1, e di formare aggregati. Queste interazioni sono verosimilmente responsabili della segregazione di VGF dalla Tg e della biogenesi di granuli secretori nelle cellule FRT. L'aggregazione è un meccanismo che plausibilmente determina la formazione di granuli, anche in cellule che non posseggono un macchinario per la secrezione regolata. Ma l'aggregazione delle proteine luminali non è sufficiente per la biogenesi dei granuli secretori: è necessario che le proteine cargo interagiscano con specifici microdomini della membrana affinché il granulo secretorio possa formarsi. Solo la proteina VGF intracellulare è capace di formare aggregati, suggerendo che l'interazione con altri componenti sia necessaria per l'aggregazione. I

nostri risultati indicano che non sono importanti i rafts per l'aggregazione di VGF. Tuttavia riteniamo che l'interazione degli aggregati di VGF con rafts possa essere importante per la biogenesi dei granuli secretori determinando, al livello del TGN, la segregazione da altre proteine cargo. Inoltre i rafts possono svolgere un altro ruolo nella formazione di granuli secretori: l'interazione dei piccoli microdomini lipidici con proteine cargo potrebbe infatti determinare la coalescenza di essi in grandi piattaforme che renderebbero la gemmazione di granuli energeticamente favorevole (Julicher and Lipowsky, 1993). Infine i rafts sembrano coinvolti nei processi di indirizzamento e fusione dei granuli secretori con la membrana plasmatica (Hanzal-Bayer et Hancock, 2007).

Tutte queste considerazioni evidenziano il ruolo critico dell'aggregazione e della successiva interazione con rafts nel processo di secrezione della proteina VGF.

Ci appare importante, nello sviluppo futuro di questo lavoro, individuare gli specifici componenti molecolari con cui VGF interagisce, primo fra tutti il ganglioside GM1, per delucidare il meccanismo con cui si realizza l'aggregazione e la formazione del granulo secretorio.

Bibliografia

Allan, V. J., H. M. Thompson, et al. (2002). "Motoring around the Golgi." *Nat Cell Biol* 4(10): E236-42.

Ambesi-Impiombato, F. S. and H. G. Coon (1979). "Thyroid cells in culture." *Int Rev Cytol Suppl*(10): 163-72.

Anderson, R. G. (1993). "Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10909-13.

Arvan, P. and J. Lee (1991). "Regulated and constitutive protein targeting can be distinguished by secretory polarity in thyroid epithelial cells." *J Cell Biol* 112(3): 365-76.

Benson, D. L. and S. R. Salton (1996). "Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons." *Brain Res Dev Brain Res* 96(1-2): 219-28.

Benting, J. H., A. G. Rietveld, et al. (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* 146(2): 313-20.

Berndorfer, U., H. Wilms, et al. (1996). "Multimerization of thyroglobulin (TG) during extracellular storage: isolation of highly cross-linked TG from human thyroids." *J Clin Endocrinol Metab* 81(5): 1918-26.

Beuret, N., H. Stettler, et al. (2004). "Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells." *J Biol Chem* 279(19): 20242-9.

Blazquez, M., C. Thiele, et al. (2000). "Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway." *Biochem J* 349 Pt 3: 843-52.

Borgonovo, B., J. Ouwendijk, et al. (2006). "Biogenesis of secretory granules." *Curr Opin Cell Biol* 18(4): 365-70.

Broquet, A. H., G. Thomas, et al. (2003). "Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release." *J Biol Chem* 278(24): 21601-6.

Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." *Cell* 68(3): 533-44.

Brown, D. and J. L. Stow (1996). "Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology." *Physiol Rev* 76(1): 245-97.

Brown, D. A. and E. London (1997). "Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?" *Biochem Biophys Res Commun* 240(1): 1-7.

Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." *J Cell Sci* 111 (Pt 1): 1-9.

Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* 275(23): 17221-4.

Burgess, T. L. and R. B. Kelly (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins." *Annu Rev Cell Biol* 3: 243-93.

Casey, P. J. (1995). "Protein lipidation in cell signaling." *Science* 268(5208): 221-5.

Cerneus, D. P., E. Ueffing, et al. (1993). "Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol." *J Biol Chem* 268(5): 3150-5.

Chambard, M., J. Mauchamp, et al. (1987). "Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin." *J Cell Physiol* 133(1): 37-45.

Chambard, M., D. Depetris, et al. (1990). "Thyrotrophin regulation of apical and basal exocytosis of thyroglobulin by porcine thyroid monolayers." *J Mol Endocrinol* 4(3): 193-9.

Chamberlain, L. H., R. D. Burgoyne, et al. (2001). "SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5619-24.

Chanat, E. and W. B. Huttner (1991). "Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network." *J Cell Biol* 115(6): 1505-19.

Chanat, E., A. S. Dittie, et al. (1998). "Analysis of the sorting of secretory proteins to the regulated secretory pathway. A subcellular fractionation approach." *Methods Mol Biol* 88: 285-324.

Cool, D. R. and Y. P. Loh (1994). "Identification of a sorting signal for the regulated secretory pathway at the N-terminus of pro-opiomelanocortin." *Biochimie* 76(3-4): 265-70.

Cool, D. R., E. Normant, et al. (1997). "Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice." *Cell* 88(1): 73-83

Dannies, P. S. (1999). "Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting." *Endocr Rev* 20(1): 3-21.

Delacour, D. and R. Jacob (2006). "Apical protein transport." *Cell Mol Life Sci* 63(21): 2491-505.

Dikeakos, J. D., M. J. Lacombe, et al. (2007). "A hydrophobic patch in a charged alpha-helix is sufficient to target proteins to dense core secretory granules." *J Biol Chem* 282(2): 1136-43.

Drubin, D. G. and W. J. Nelson (1996). "Origins of cell polarity." *Cell* 84(3): 335-44.

Fiedler, K. and K. Simons (1995). "The role of N-glycans in the secretory pathway." *Cell* 81(3): 309-12.

Field, K. A., D. Holowka, et al. (1995). "Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9201-5.

Fricker, L. D. (1988). "Carboxypeptidase E." *Annu Rev Physiol* 50: 309-21.

Garcia, A. L., S. K. Han, et al. (2005). "A prohormone convertase cleavage site within a predicted alpha-helix mediates sorting of the neuronal and endocrine polypeptide VGF into the regulated secretory pathway." *J Biol Chem* 280(50): 41595-608.

Gentile, F., G. Cali, et al. (2004). "The neuroendocrine protein VGF is sorted into dense-core granules and is secreted apically by polarized rat thyroid epithelial cells." *Exp Cell Res* 295(1): 269-80.

Gerdes, H. H., P. Rosa, et al. (1989). "The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation." *J Biol Chem* 264(20): 12009-15.

Gerdes, H. H. and M. M. Glombik (1999). "Signal-mediated sorting to the regulated pathway of protein secretion." *Anat Anz* 181(5): 447-53.

Griffiths, G. and K. Simons (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." *Science* 234(4775): 438-43.

Haerberli, A., F. K. Millar, et al. (1978). "Accumulation and localization of radiocalcium in the rat thyroid gland." *Endocrinology* 102(5): 1511-9.

Hanzal-Bayer, M. F. and J. F. Hancock (2007). "Lipid rafts and membrane traffic." *FEBS Lett* 581(11): 2098-104.

Harder, T. and K. Simons (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains." *Curr Opin Cell Biol* 9(4): 534-42.

Higuchi, H., T. Yamashita, et al. (2003). "PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts." *Embo J* 22(8): 1790-800.

Ikonen, E. and K. Simons (1998). "Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells." *Semin Cell Dev Biol* 9(5): 503-9.

Ikonen, E. (2001). "Roles of lipid rafts in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* 13(4): 470-7.

Julicher, F. and R. Lipowsky (1993). "Domain-induced budding of vesicles." *Phys Rev Lett* 70(19): 2964-2967.

Kakhlon, O., P. Sakya, et al. (2006). "GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules." *Embo J* 25(8): 1590-602.

Keller, P. and K. Simons (1997). "Post-Golgi biosynthetic trafficking." *J Cell Sci* 110 (Pt 24): 3001-9.

Keller, P. and K. Simons (1998). "Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin." *J Cell Biol* 140(6): 1357-67.

Klein, U., G. Gimpl, et al. (1995). "Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor." *Biochemistry* 34(42): 13784-93.

Kromer, A., M. M. Glombik, et al. (1998). "Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis." *J Cell Biol* 140(6): 1331-46.

Kurzchalia, T. V., E. Hartmann, et al. (1995). "Guilty by insolubility--does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location?" *Trends Cell Biol* 5(5): 187-9.

Kusumi, A. and Y. Sako (1996). "Cell surface organization by the membrane skeleton." *Curr Opin Cell Biol* 8(4): 566-74.

Lipardi, C., L. Nitsch, et al. (1999). "Mechanisms of apical protein sorting in polarized thyroid epithelial cells." *Biochimie* 81(4): 347-53.

Lipardi, C., L. Nitsch, et al. (2000). "Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting." *Mol Biol Cell* 11(2): 531-42.

Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." *Trends Cell Biol* 4(7): 231-5.

Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." *Trends Cell Biol* 4(7): 231-5.

Liu, J., M. Kaksonen, et al. (2006). "Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10277-82.

London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." *Biochim Biophys Acta* 1508(1-2): 182-95.

London, E. (2005). "How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells." *Biochim Biophys Acta* 1746(3): 203-20.

Lotti, L. V., M. R. Torrasi, et al. (1996). "Morphological analysis of the transfer of VSV ts-045 G glycoprotein from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment in vero cells." *Exp Cell Res* 227(2): 323-31.

Ma, Q., A. J. Renzelli, et al. (2000). "Superinduction of CYP1A1 gene expression. Regulation of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of Ah receptor by cycloheximide." *J Biol Chem* 275(17): 12676-83.

Macdonald, J. L. and L. J. Pike (2005). "A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts." *J Lipid Res* 46(5): 1061-7.

Martin-Belmonte, F., M. A. Alonso, et al. (2000). "Thyroglobulin is selected as luminal protein cargo for apical transport via detergent-resistant membranes in epithelial cells." *J Biol Chem* 275(52): 41074-81.

Martin-Belmonte, F., P. Arvan, et al. (2001). "MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* 276(52): 49337-42.

Matter, K. and I. Mellman (1994). "Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells." *Curr Opin Cell Biol* 6(4): 545-54.

Miller, S. G. and H. P. Moore (1990). "Regulated secretion." *Curr Opin Cell Biol* 2(4): 642-7.

Montaner, A. D., A. De Nichilo, et al. (2006). "Ganglioside GM1-binding peptides as adjuvants of antigens inoculated by the intranasal route." *Vaccine* 24(11): 1889-96.

Moore, H. P., C. Brion, et al. (1989). "Protein secretion by constitutive and regulated pathways." *Soc Gen Physiol Ser* 44: 189-201.

Mostov, K. E., M. Verges, et al. (2000). "Membrane traffic in polarized epithelial cells." *Curr Opin Cell Biol* 12(4): 483-90.

Munro, S. (2003). "Lipid rafts: elusive or illusive?" *Cell* 115(4): 377-88.

Muresan, Z. and P. Arvan (1997). "Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone,

GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 272(42): 26095-102.

Normant, E. and Y. P. Loh (1998). "Depletion of carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway sorting receptor, causes misrouting and constitutive secretion of proinsulin and proenkephalin, but not chromogranin A." *Endocrinology* 139(4): 2137-45.

Paladino, S., D. Sarnataro, et al. (2004). "Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins." *J Cell Biol* 167(4): 699-709.

Possenti, R., J. D. Eldridge, et al. (1989). "A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway." *Embo J* 8(8): 2217-23.

Possenti, R., A. M. Rinaldi, et al. (1999). "Expression, processing, and secretion of the neuroendocrine VGF peptides by INS-1 cells." *Endocrinology* 140(8): 3727-35.

Richmond, J. E. and K. S. Broadie (2002). "The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*." *Curr Opin Neurobiol* 12(5): 499-507.

Rodriguez-Boulan, E. and S. K. Powell (1992). "Polarity of epithelial and neuronal cells." *Annu Rev Cell Biol* 8: 395-427.

Salaun, C., G. W. Gould, et al. (2005). "Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells." *J Biol Chem* 280(20): 19449-53.

Scheiffele, P., M. G. Roth, et al. (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." *Embo J* 16(18): 5501-8.

Silvius, J. (2005). "Lipid microdomains in model and biological membranes: how strong are the connections?" *Q Rev Biophys* 38(4): 373-83.

Simons, K. and S. D. Fuller (1985). "Cell surface polarity in epithelia." *Annu Rev Cell Biol* 1: 243-88.

Simons, K. and G. van Meer (1988). "Lipid sorting in epithelial cells." *Biochemistry* 27(17): 6197-202.

Simons, K. (1993). "Biogenesis of epithelial cell surface polarity." *Harvey Lect* 89: 125-46.

Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.

Song, L. and L. D. Fricker (1995). "Calcium- and pH-dependent aggregation of carboxypeptidase E." *J Biol Chem* 270(14): 7963-7.

Thiele, C. and W. B. Huttner (1998). "Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules-recent developments." *Semin Cell Dev Biol* 9(5): 511-6.

Tooze, S. A. and W. B. Huttner (1990). "Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways." *Cell* 60(5): 837-47.

Tooze, S. A. (1998). "Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells." *Biochim Biophys Acta* 1404(1-2): 231-44.

Tooze, S. A., G. J. Martens, et al. (2001). "Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE." *Trends Cell Biol* 11(3): 116-22.

van Meer, G. and K. Simons (1988). "Lipid polarity and sorting in epithelial cells." *J Cell Biochem* 36(1): 51-8.

van Meer, G. (1989). "Lipid traffic in animal cells." *Annu Rev Cell Biol* 5: 247-75.

van Meer, G. (2004). "Invisible rafts at work." *Traffic* 5(4): 211-2.

van Meer, G. and H. Sprong (2004). "Membrane lipids and vesicular traffic." *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 373-8.

Wandinger-Ness, A., M. K. Bennett, et al. (1990). "Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells." *J Cell Biol* 111(3): 987-1000.

Wang, Y., C. Thiele, et al. (2000). "Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network." *Traffic* 1(12): 952-62.

Yoo, S. H. and J. P. Albanesi (1990). "Ca²⁺-induced conformational change and aggregation of chromogranin A." *J Biol Chem* 265(24): 14414-21.

Yoo, S. H. (1995). "pH- and Ca²⁺-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis." *J Biol Chem* 270(21): 12578-83.

Yoo, S. H. and M. S. Lewis (1996). "Effects of pH and Ca²⁺ on heterodimer and heterotetramer formation by chromogranin A and chromogranin B." *J Biol Chem* 271(29): 17041-6.

Zegers, M. M. and D. Hoekstra (1998). "Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells." *Biochem J* 336 (Pt 2): 257-69.

Zhang, C. F., S. Dhanvantari, et al. (2003). "Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts." *Biochem J* 369(Pt 3): 453-60.

Zurzolo, C., G. van Meer, et al. (2003). "The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae." *EMBO Rep* 4(12): 1117-21.