

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca**

**In**

**Organismi Modello nella Ricerca Biomedica e Veterinaria**

**XXIV Ciclo**



**Tesi di Dottorato**

**IL RUOLO DI GRK2 NEL CONTROLLO  
DELLE FUNZIONI MITOCONDRIALI**

**Tutor**

Chiar.mo

Prof. Alessandro Fioretti

**Candidata**

Dr.ssa Anna Fusco

Anno Accademico 2010/2011

# SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
1.1 LA FAMIGLIA DELLE GRKS .....	3
1.2 CHINASI DEL RECETTORE B ADRENERGICO: GRK2 .....	5
1.3 CONTROLLO DEL METABOLISMO CELLULARE: IL RUOLO DI GRK2 .....	5
1.4 SCOPO DEL LAVORO .....	6
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>7</b>
2.1 COLTURE CELLULARI. ....	7
2.2 COLTURE CELLULARI PRIMARIE DERIVATE DA AORTA DI TOPO. ....	7
2.3 CLONAGGIO DI GRK2 IN pCDNA3.1.....	7
2.4 TRASFEZIONE CELLULARE.....	8
2.5 PREPARAZIONE DI ESTRATTI MITOCONDRIALI. ....	8
2.6 OVERLAY ASSAY.....	9
2.7 SAGGIO DI FOSFORILAZIONE.....	9
2.8 REAL-TIME PCR. ....	10
2.9 IMMUNOFLUORESCENZA.....	10
2.10 MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM) ED IMMUNOGOLD.....	11
2.11 CITOFLUORIMETRIA.....	11
2.12 SAGGIO PER LA SINTESI DI ATP.....	11
2.13 IPOSSIA.....	12
2.14 STUDIO IN VIVO .....	12
2.15 ISCHEMIA. ....	12
2.16 SAGGIO PER LA SINTESI DI ATP <i>IN VIVO</i> .....	13
2.17 ANALISI STATISTICA. ....	13
<b>RISULTATI</b> .....	<b>14</b>
3.1 GRK2 AUMENTA LA SINTESI DI ATP.....	14
3.2 GRK2 È LOCALIZZATO NEI MITOCONDRI.....	14
3.3 DUE REGIONI DELLA SEQUENZA DI GRK2 SONO CAPACI DI LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE.....	15
3.4 GRK2 INTERAGISCE E FOSFORILA PROTEINE MITOCONDRIALI. ....	16
3.5 GRK2 AUMENTA LA BIOGENESI MITOCONDRIALE. ....	16
3.6 GRK2 ATTENUA LA PERDITA DI ATP INDOTTA DA IPOSSIA/RIPERFUSIONE. ....	17
3.7 LA RIMOZIONE DI GRK2 IN TOPI GRK2 <sup>f/f,CRE</sup> DIMINUISCE I LIVELLI DI ATP.....	17
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>19</b>
<b>LEGENDE</b> .....	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>25</b>
<b>FIGURE E TABELLE</b> .....	<b>27</b>

# INTRODUZIONE

## 1.1 La famiglia delle GRKs

La famiglia delle G-protein coupled receptor (GPCR) kinases (GRKs) comprende sette serina/treonina chinasi che fosforilano e regolano i recettori accoppiati a proteine G (GPCR) quando sono nella loro conformazione attiva [1, 2].

La fosforilazione di specifici residui aminoacidici in serina mediata dalle GRKs avviene a livello dei loop intracellulari e della coda COOH-terminale del recettore e ne aumenta l'affinità di legame con arrestine citosoliche (*Figura 1A*).

Questo cambiamento causa due eventi:

- 1) Impedisce l'interazione del recettore con le proteine G per ingombro sterico;
- 2) Promuove l'endocitosi clatrina-dipendente del recettore attivato all'interno dei compartimenti endosomiali, comportandone la degradazione o il riciclo [3, 4].

La famiglia delle GRKs può essere suddivisa in 3 sottogruppi in base all'omologia di sequenza:

- 1) Chinasi della rodopsina (GRK1 e GRK7);
- 2) Chinasi del recettore  $\beta$ -adrenergico (GRK2 o  $\beta$ ARK1 e GRK3 o  $\beta$ ARK2);
- 3) Sottofamiglia GRK4 (GRK4, GRK5 e GRK6).

GRK 2,3,5, e 6 sono espresse in maniera omogenea in tutti i tessuti [5], GRK 1 e 7 sono confinate in coni e bastoncelli della retina e GRK4 è presente nei testicoli, nel cervelletto e nei reni [6, 7].

La struttura di base delle GRKs presenta un dominio catalitico centrale altamente conservato (circa 45% di identità di sequenza) [8] di 263-266 aminoacidi; un

dominio N-terminale moderatamente conservato, importante per il riconoscimento del recettore e l'ancoraggio alle membrane intracellulari (circa 185 aminoacidi); ed una porzione COOH-terminale poco conservata e di lunghezza variabile (105-230 aminoacidi), importante per la traslocazione agonista-mediata perché favorisce l'interazione con lipidi [9]. Tutte le GRKs contengono nella porzione N-terminale un dominio abbastanza conservato (circa il 27 % di identità) [8] di omologia con il regolatore del signaling delle Proteine G (RGS homology domain, RH), che rende possibile la modulazione della trasduzione del segnale delle GPCR in maniera indipendente dal meccanismo di fosforilazione [10, 11] ad opera delle GRKs: ne è un esempio GRK2 che è in grado di inibire il segnale delle GPCR sequestrando la proteina *Gaq/11/14* grazie proprio al dominio RH [12]. La porzione carbossi-terminale, al contrario è estremamente variabile tra le GRKs ed è la regione che permette la divisione di questa classe di chinasi in sottofamiglie (*Figura 1B*). GRK1 e GRK7 presentano in questa regione un dominio CAAX box che determina due modifiche post-traduzionali: la farnesilazione e la carbossimetilazione [13]. Grazie a tali modifiche queste due chinasi, in seguito alla fotoattivazione della rodopsina, possono traslocare dal citosol verso le membrane dove fosforilano la rodopsina attiva. GRK2 e GRK3, prevalentemente citosoliche, possiedono una porzione C-terminale, più lunga rispetto alla sottofamiglia GRK4, che contiene un dominio PH (pleckstrin homology) attraverso il quale lega la subunità  $\beta\gamma$  (dissociata dalla subunità  $G\alpha$  in seguito a stimolo agonista) e ne permette la traslocazione verso le membrane in seguito all'attivazione del GPCR [14].

## 1.2 Chinasi del recettore $\beta$ adrenergico: GRK2

La capacità del Sistema Nervoso Simpatico di controllare la funzione cardiaca rendono questo sistema un elemento determinante dell'evoluzione delle patologie cardiovascolari [15]. Il Sistema conduce all'attivazione dei recettori  $\beta$  adrenergici, che sono dei GPCR la cui attivazione determina la dissociazione della G protein di tipo S in subunità  $\alpha$  e subunità  $\beta\gamma$ . Da questa dissociazione deriva l'attivazione dell'adenilato ciclasi e la produzione di cAMP [16]. Lo stesso stimolo che conduce all'attivazione della trasduzione del segnale ovvero l'esposizione alla agonista conduce anche allo spegnimento dello stesso ad opera di GRK2. Questo fenomeno, noto come desensibilizzazione [16] è attivato da eventi di fosforilazione, che in particolare per i  $\beta$ AR sono mediati da GRK2, sia in condizioni normali sia in quelle patologiche [17, 18]. Diversi studi hanno dimostrato che i livelli e l'attività di GRK2 sono infatti aumentati in diverse patologie cardiovascolari come lo scompenso cardiaco [19, 20], l'ischemia miocardica [21], l'ipertensione arteriosa [19, 22], l'ipertrofia ventricolare sinistra [23], causando la riduzione del segnale  $\beta$  adrenergico [21]. Tutto ciò alimenta l'interesse dello studio del ruolo di GRK2, in tali patologie.

## 1.3 Controllo del metabolismo cellulare: il ruolo di GRK2

GRK2 è una proteina ubiquitaria nei tessuti dei mammiferi e sembra essere necessaria allo sviluppo del feto in quanto, il *Knock - out* del gene è letale durante la vita embrionale. Questa evidenza suggerisce che tale chinasi debba svolgere ruoli intracellulari che siano indipendenti dalla desensibilizzazione di recettori  $\beta$ AR. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che la chinasi è principalmente localizzata nel citoplasma e solo dopo attivazione dei  $\beta$ AR si localizza in membrana. È possibile ipotizzare altri ruoli per GRK2 nella cellula sulla base

delle evidenze crescenti che suggeriscono la sua capacità di interagire anche con altre molecole non recettoriali, quali actina, ERK, CaM. Un recente studio ha dimostrato la capacità di GRK2 di legare IRS1 [24], molecola necessaria per l'utilizzazione cellulare del glucosio e la produzione di energia in risposta all'insulina. Da questa interazione deriva un effetto inibitorio di GRK2 sul segnale insulinico confermato anche in modelli di diabete o di insulino/resistenza quali il ratto spontaneamente iperteso. Queste evidenze suggeriscono un ruolo di GRK2 nel controllo dell'utilizzo cellulare del glucosio e, più in generale, nel controllo della produzione e del consumo di energia che hanno sede mitocondriale.

I mitocondri, infatti, svolgono un importante ruolo nella produzione di energia cellulare, data la loro abilità a produrre ATP in maniera ossigeno dipendente. Lo stato funzionale dei mitocondri varia drammaticamente in base allo stato metabolico e funzionale della cellula. Inoltre, modifiche post-trascrizionali delle proteine mitocondriali ed in particolare la fosforilazione, sembrano essere un importante meccanismo di regolazione della funzione mitocondriale. Negli ultimi anni, diversi studi [25] confermano che una serie di chinasi (MAPKs, Akt, PKA e PKC) sono presenti nei mitocondri, in particolare nello spazio intermembranario e sulle membrane dove incontrano proteine mitocondriali da regolare mediante fosforilazione.

#### **1.4 Scopo del lavoro**

In questo studio abbiamo valutato la localizzazione di GRK2 all'interno dei mitocondri ed il ruolo della chinasi nella regolazione della produzione di energia.

# MATERIALI E METODI

## 2.1 Colture cellulari.

Cellule HEK-293 (Human Embryonic Kidney) sono coltivate nel mezzo di coltura “Dulbecco’s minimal essential medium” (DMEM) con aggiunta di 10% di siero bovino (FBS) a 37°C in una miscela costituita per il 95% di aria e il 5% di CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Colture cellulari primarie derivate da aorta di topo.

Colture cellulari primarie sono state preparate mediante l’utilizzo di un protocollo descritto in precedenza [26]. Le cellule sono state estratte da aorta di topi ricombinanti in quanto presentano entrambe le copie del gene di GRK2 fiancheggiate da sequenze f-loxed (GRK2<sup>fl/fl</sup>) [27, 28]. Per ottenere cellule aventi GRK2 *knock out*, le colture cellulari primarie GRK2<sup>fl/fl</sup> sono state coltivate per 3 ore in DMEM senza FBS con un adenovirus (MOI 50 particelle per cellule) codificante per l’enzima batterico Cre ricombinasi (AdCre, Vector Biolabs). L’infezione è stata ripetuta dopo una settimana. La rimozione di GRK2 è confermata mediante western blot. L’adenovirus vuoto (AdEMPTY, Vector Biolabs) è usato come controllo negativo. Le cellule sono state studiate tra il settimo e il quattordicesimo passaggio.

## 2.3 Clonaggio di GRK2 in pcDNA3.1.

Il plasmide pGRK2-WT è stato utilizzato come stampo per clonare i singoli domini di GRK2 mediante PCR. I primers sono stati disegnati con l’aggiunta delle sequenze dei siti di restrizione riconosciuti da specifici enzimi (*Tabella 1*). In particolare, sono stati amplificati la regione N-terminale con il dominio catalitico

(*GRK2 NT-CD*, aa 1-453), il dominio catalitico con la regione C-terminale (*GRK2 CD-CT*, aa 191-689), il dominio RH (*GRK2 RH*, aa 54-174) ed infine, la regione C terminale (*GRK2 CT*, aa 454-689). Le sequenze amplificate dei singoli domini di GRK2 sono state purificate mediante l'utilizzo del kit "gel extraction kit" (Invitrogen) e clonate nel plasmide pcDNA3.1 myc/hisA (Invitrogen) mediante l'utilizzo di T4 ligasi (Promega). Il corretto frame delle sequenze è stato confermato mediante sequenziamento utilizzando i primers indicati precedentemente (Avant 3100, Applied Biosystem).

#### **2.4 Trasfezione cellulare.**

La trasfezione cellulare è stata realizzata con la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) utilizzando 2µg di pcDNA3.1 codificante per uno specifico dominio di GRK2 [24, 29]. Per ottenere una trasfezione stabile di GRK2, dopo 24-48 ore di trasfezione, le cellule sono state selezionate in G418 (500 µg/mL) per 2 settimane. Le cellule resistenti sono state poste in coltura con DMEM cui è stato aggiunto G418 ad una concentrazione finale di 250 µg/mL; successivamente è stata esaminata l'espressione di GRK2 tramite western blot, con l'uso di uno specifico anticorpo (Santa Cruz Biotechnology).

#### **2.5 Preparazione di estratti mitocondriali.**

Le cellule sono state lavate in buffer fosfato freddo (PBS) e lisate in isolation buffer [IB pH 7.4 200mM saccarosio, 1mM EGTA-Tris e 10mM Tris-MOPS]. Il campione è stato centrifugato a 800g per 10 min; il surnatante è stato ulteriormente centrifugato per 10 min a 8000g. Il pellet ottenuto (frazione mitocondriale) è stato purificato mediante centrifugazione (2 centrifughe di 10 min a 8000g). Il risultante pellet è stato ulteriormente purificato mediante



centrifugazione a 95000g per 30 min in 30% di gradiente di Percoll [30]. I mitocondri ottenuti sono stati lavati e risospesi in IB. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il kit BCA (Pierce). Estratti citosolici e mitocondriali sono stati confermati mediante western blot utilizzando specifici anticorpi (Santa Cruz Biotechnology), seguiti da una incubazione con anticorpi secondari coniugati a perossidasi (Santa Cruz Biotechnology) per poi essere sottoposti a chemiluminescenza standard (Pierce Biotechnology). Le immagini sono state digitalizzate ed è stata effettuata l'analisi densitometrica (Image Quant software).

## **2.6 Overlay assay.**

Le proteine purificate sono state risolte con SDS/PAGE 4-12% e trasferite su nitrocellulosa. La membrana è stata poi incubata con 50ng di GRK2 proteina purificata (Invitrogen) in un buffer contenente Hepes 0,25M; MgCl<sub>2</sub> 50mM; DTT 2,5mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5mM; H<sub>2</sub>O-Tween 0,1%, per 1 h a temperatura ambiente. Le proteine sono state poi fissate in formaldeide allo 0,5% per 5 min e lavate con glicina al 2% [31]. GRK2 è stato visualizzato mediante chemiluminescenza dopo incubazione con un anticorpo anti-GRK2 (Santa Cruz Biotechnology).

## **2.7 Saggio di fosforilazione.**

Il saggio di fosforilazione è stato realizzato mediante l'utilizzo di estratti mitocondriali. La reazione di fosforilazione è stata realizzata mediante incubazione con master mix (Hepes 0,5M; MgCl<sub>2</sub> 1M; DTT 1M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1M; H<sub>2</sub>O-Tween 0,1%), 50ng di GRK2 proteina purificata (Invitrogen) e [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (GE Healthcare) per 30 min a 37°C. Laemmli buffer è stato aggiunto per fermare la reazione. Infine, 30 $\mu$ l del mix di reazione è stata risolta su SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen), incubata in Comassie blue, lavata in soluzione di destain per 30 min

[32]. Le proteine mitocondriali fosforilate sono state visualizzate tramite autoradiografia.

## 2.8 Real-Time PCR.

L'RNA e il DNA totali sono stati estratti mediante l'utilizzo, rispettivamente, di Trizol e DNazol (Invitrogen) seguendo lo specifico protocollo. Il cDNA è stato sintetizzato mediante Thermo-Script RT-PCR System (Invitrogen). Dopo la reazione di trascrittasi inversa, la real-time PCR (RT-PCR) è stata realizzata utilizzando il sistema della SYBR Green (Applied Biosystems) sullo strumento StepOne (Applied Biosystem). Le sequenze dei primers utilizzati sono: [33]  
*Citocromo b*: For: 5'-CCTAGGCGACCCAGACAATTAT; Rev: 5'-TCATTCGGGCTTGATGTGG;  
*NADHd*: For: 5'-CAGCCATTCTCATCCAAACC; Rev: 5'-ATTATGATGCGACTGT GAGTGC;  
*β globina*: For: 5'-AGCCTGACCAACATGGTGAAAC; Rev: 5'-AGCCACCTGAATAGCTGGGACT. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati con la β globina.

## 2.9 Immunofluorescenza.

Le cellule HEK-293 e GRK2-HEK sono state incubate per 30 min con 5nM mitotracker (Rosamine-based Mitotracker dye-Invitrogen) per identificare i mitocondri. Successivamente, le cellule sono fissate in metanolo/acetone freddo e permeabilizzate con 0.3% Triton X-100 in PBS. Segue l'incubazione con lo specifico anticorpo primario e il secondario fluoresceinato [32]. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale (Zeiss 510).

### **2.10 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) ed Immunogold.**

La frazione mitocondriale è stata lavata e fissata in 4% paraformaldeide per 4 h a 4°C. Segue l'incubazione con 0,05M glicina, deidratazione in gradienti di etanolo, 100% acetone e blocco in 5% BSA in PBS per 1 h. La frazione mitocondriale è stata incubata in buffer (IB) contenente 0,8% BSA in PBS e 15mM NaN<sub>3</sub>, seguono l'incubazione con anticorpo anti-GRK2 (5µg/ml) in IB e lavaggi in IB. Successivamente, i campioni sono stati incubati con l'anticorpo secondario (Aurion ultra-small gold reagents) per 1,5 h e con Aurion R-gent SE-EM come da protocollo. I campioni sono stati fissati in gluteraldeide al 2.5%. Infine, i campioni sono stati processati al CISME (Università "Federico II" di Napoli) per essere visualizzati al TEM.

### **2.11 Citofluorimetria.**

Le cellule sono state incubate per 30 min con 5nM mitotracker (Rosamine-based Mitotracker dye-Invitrogen). L'intensità di fluorescenza è stata analizzata mediante citofluorimetria (FACSCalibur, BD Biosciences) valutando l'analisi della media dell'intensità di fluorescenza di 10000 eventi [34].

### **2.12 Saggio per la sintesi di ATP.**

Le cellule sono state raccolte, lavate in PBS e contate alla camera di Burker. I campioni sono stati trattati per 1 h con 4µg/ml rotenone (Sigma). L'emissione registrata dai campioni trattati con rotenone è stata definita come luminescenza corrispondente alla fonte di ATP non mitocondriale. Il saggio è stato realizzato utilizzando un kit di luminescenza della Sigma.

### 2.13 Ipossia.

Le cellule sono state piastrate in piastre di 100 mm e portate ad una confluenza del 90-95%. Le condizioni ipossiche sono state ricreate utilizzando un mezzo di coltura privo di nutrienti e fattori di crescita (NaCl 116 mM; KCl 54mM; Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 800 μM; NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; Glicina 10 mM e Rosso Fenolo 0.001%, pH 7.3), precedentemente saturato per 10 min ad 1 Atm con una miscela di Azoto 95% - CO<sub>2</sub> 5%, ed incubando le cellule in una camera dedicata, riempita con la medesima miscela di gas e mantenuta a 37°C. Il pH, la PO<sub>2</sub> e la PCO<sub>2</sub> del mezzo, prima dell'applicazione dello stimolo ipossico ed al suo termine, sono risultate rispettivamente di 7.36 ± 0.2, 45.3 ± 1.2 mmHg e 35.3 ± 0.8 mmHg e 7.32 ± 0.9, 32.6 ± 1.1 mmHg e 37.9 ± 2.1 mmHg [35].

### 2.14 Studio in vivo

Tutte le procedure *in vivo* sono state approvate dal Comitato Etico locale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Lo studio è stato condotto su topi ricombinanti in quanto possiedono entrambe le sequenze di GRK2 fiancheggiate da sequenze f-loxed (GRK2<sup>f/f</sup>) [27]. Per ottenere la rimozione di GRK2, i topi sono stati anestetizzati con isofluorano al 3% ed è stata effettuata l'iniezione intramuscolare di un adenovirus codificante per la CRE ricombinasi (AdCre 10<sup>9</sup>pfu/ml). La rimozione di GRK2 è stata confermata mediante western blot.

### 2.15 Ischemia.

I topi GRK2<sup>f/f,Cre</sup> (n=3) e topi GRK2<sup>f/f</sup> (n=3) sono stati anestetizzati mediante inalazione di isofluorano al 4%, e mantenuta al 2% mediante ventilazione in maschera. L'ischemia è stata realizzata mediante l'utilizzo di un protocollo

descritto in precedenza [36]. Gruppi di 3 topi sono stati sacrificati al termine di 1h di ischemia, 1h di ischemia e 15 min di riperfusione, 1h di ischemia e 1h di riperfusione.

#### **2.16 Saggio per la sintesi di ATP *in vivo*.**

Al sacrificio, i muscoli sono stati prelevati e lavati in PBS. Il saggio è stato realizzato utilizzando un kit di luminescenza della Sigma. I valori sono stati normalizzati con il peso degli animali.

#### **2.17 Analisi statistica.**

Tutti i valori sono stati presentati come media  $\pm$  Errore Standard. E' stata utilizzata l'ANOVA per confrontare i diversi parametri tra vari gruppi. Per tutte le valutazioni statistiche è stata considerata significativa una  $P < 0.05$ . Le statistiche sono state effettuate tramite software GraphPad Prism (San Diego, California).

# RISULTATI

## 3.1 GRK2 aumenta la sintesi di ATP.

Per valutare il ruolo di GRK2 nella produzione di energia, abbiamo osservato se GRK2 è in grado di modulare la sintesi di ATP mitocondriale. La *Figura 2A* mostra che le cellule HEK-293 che overesprimono stabilmente il gene di GRK2 umano (GRK2-HEK) contengono elevati livelli di ATP totale e mitocondriale, quando paragonate a cellule controllo. Abbiamo inoltre studiato colture cellulari primarie derivate da aorta di topi ricombinanti aventi entrambe le copie geniche di GRK2 fiancheggiate da due sequenze f-loxed (GRK2<sup>f/f</sup>). Quando queste cellule sono infettate con AdCre, otteniamo l'espressione dell'enzima batterico CRE ricombinasi (GRK2<sup>f/f,CRE</sup>), e la riduzione dei livelli di espressione proteica di GRK2 (*Figura 2B*). In cellule GRK2<sup>f/f,Cre</sup> (*Figura 2C*) troviamo una significativa riduzione dei livelli di ATP totale e mitocondriale, confermando un ruolo positivo di GRK2 nel pathway bio-energetico.

## 3.2 GRK2 è localizzato nei mitocondri.

Abbiamo valutato la presenza di GRK2 nei mitocondri mediante esperimenti di co-frazionamento utilizzando un gradiente di Percoll al 30%. La *Figura 3A* mostra la frazione mitocondriale, isolata da cellule HEK-293 osservata al microscopio elettronico, con assenza di altri contaminanti. Su questa frazione, l'analisi di immunogold dimostra che la chinasi è localizzata nel mitocondrio, in particolare sulla membrana esterna (*Figura 3B*). La *Figura 3C* mostra che GRK2 co-purifica con la frazione mitocondriale, come la proteina mitocondriale Mn-dependent Superoxide Dismutase (Mn SOD), che risiede nella matrice mitocondriale. Le

*Figure 3C e 3D* confermano l'assenza nella frazione mitocondriale di contaminanti derivati da citosol (actina), nuclei (Istone H3) e reticolo sarcoplasmatico (calnexina). La specificità dell'anticorpo anti-GRK2 è confermata dall'osservazione che l'overespressione di GRK2 in cellule HEK-293 aumenta i livelli della chinasi sia nel citosol che nei mitocondri (*Figura 3E*). Per confermare il compartimento dove GRK2 localizza, abbiamo effettuato un doppio trattamento della frazione mitocondriale con tripsina e triton dimostrando che la chinasi si localizza sulla membrana esterna (*Figura 3F*). Conferme derivano dall'osservazione che VDAC1, proteina che risiede sulla membrana mitocondriale esterna, ma non MnSOD, localizza nella stessa frazione mitocondriale di GRK2. Infine, l'abilità di GRK2 di localizzazione mitocondriale è stata dimostrata mediante immunofluorescenza e visualizzazione in microscopia confocale (*Figura 3G*). In particolare, abbiamo confermato la localizzazione di GRK2 nel citosol e nei mitocondri ma non nel nucleo. Questa caratteristica è ulteriormente confermata in presenza di overespressione di GRK2 (*Figura 3G*).

### **3.3 Due regioni della sequenza di GRK2 sono capaci di localizzazione mitocondriale.**

Per comprendere la regione di GRK2 che possiede la capacità di localizzazione mitocondriale, abbiamo generato mutanti tronchi di GRK2 (*Figura 4A*). La sequenza aminoacidica 1-453 è in grado di localizzarsi nei mitocondri (*Figura 4B*). In questa regione, troviamo che 120 aminoacidi (aa 54-174) che comprendono il dominio RGS sono in grado di localizzazione mitocondriale (*Figura 4C*). Anche la regione 191-689 (*Figura 4D*) che comprende il dominio

catalitico, ma non la regione 495-689 (*Figura 4E*) è in grado di localizzarsi nei mitocondri.

### **3.4 GRK2 interagisce e fosforila proteine mitocondriali.**

Per confermare l'abilità di GRK2 di localizzarsi nei mitocondri, abbiamo effettuato un saggio overlay su cellule HEK-293 e GRK2-HEK utilizzando la proteina purificata di GRK2. Questo saggio conferma l'abilità di GRK2 di interagire con proteine mitocondriali non ancora identificate con un peso molecolare compreso tra 30-60 KDa (*Figura 5A*). Utilizzando un simile procedimento, abbiamo realizzato un saggio di fosforilazione confermando che GRK2 fosforila proteine mitocondriali con un peso molecolare compreso tra 30-60 KDa (*Figura 5B*).

### **3.5 GRK2 aumenta la biogenesi mitocondriale.**

Data la localizzazione mitocondriale di GRK2 nei mitocondri, abbiamo verificato se GRK2 promuove l'accumulo di DNA mitocondriale. Dall'analisi di PCR quantitativa, abbiamo monitorato i livelli di due geni mitocondriali: NADH deidrogenasi (NADHd) e citocromo B, utilizzando la  $\beta$  globina nucleare come controllo interno. La *figura 6A* mostra che GRK2 aumenta i livelli di entrambi i geni mitocondriali. Per correlare l'aumento di DNA mitocondriale con l'espressione di proteine mitocondriali, abbiamo monitorato i livelli di espressione dei due geni mitocondriali NADHd e citocromo B (mRNA). I livelli totali di RNA sono stati estratti da cellule e soggette a trascrizione inversa e analisi di RT-PCR. Come mostrato in *Figura 6B*, GRK2 significativamente aumenta i livelli espressione di NADHd e citocromo B. Al contrario, in cellule GRK2<sup>f/f,CRE</sup>, osserviamo una riduzione nel numero di copie geniche e dei livelli di espressione



di NADHd e citocromo B quando paragonate a cellule controllo GRK2<sup>ff</sup> (*Figura 6C e 6D*).

Per valutare il cambiamento nella massa mitocondriale totale, analizziamo l'intensità di fluorescenza delle cellule dopo incubazione con mitotracker mediante l'analisi FACS. L'overespressione di GRK2 in cellule HEK-293 induce un aumento del 36% nell'emissione di fluorescenza (*Figura 6E*). Al contrario, in cellule GRK2<sup>ff,Cre</sup>, osserviamo una riduzione dell'intensità di emissione di circa il 31% (*Figura 6F*). Questi dati sono compatibili con un effetto positivo di GRK2 sulla biogenesi mitocondriale.

### **3.6 GRK2 attenua la perdita di ATP indotta da ipossia/riperfusion.**

Data l'abilità di GRK2 di promuovere la produzione di ATP, abbiamo verificato gli effetti della chinasi in condizione di ipossia. Mediante western blot, abbiamo osservato che l'ipossia acuta (1h) promuove un aumento dei livelli di GRK2 sia nel citosol che nei mitocondri. L'aumento dei livelli di GRK2 durante ipossia è transiente in quanto la riossigenazione di 15 min e 1 h ripristina i livelli della chinasi alle normali condizioni di ossigeno (*Figura 7A*). Nelle cellule controllo, i livelli di ATP diminuiscono durante ipossia e dopo riperfusione. Interessante notare che, l'overespressione di GRK2 attenua la perdita della produzione di ATP, quando paragonate a cellule controllo (*Figura 7B*). In cellule GRK2<sup>ff,CRE</sup> i livelli di ATP sono significativamente ridotti sia in condizioni basali che dopo ipossia e la riperfusione non è sufficiente per il recupero di ATP (*Figura 7C*).

### **3.7 La rimozione di GRK2 in topi GRK2<sup>ff,CRE</sup> diminuisce i livelli di ATP.**

Abbiamo valutato il ruolo di GRK2 *in vivo* in un modello di ischemia. Abbiamo utilizzato topi ricombinanti GRK2<sup>ff</sup>. L'iniezione intramuscolare dell'adenovirus

codificante per l'enzima CRE ricombinasi ( $10^9$  pfu/ml) causa la delezione del gene di GRK2, come mostrato in *figura 7D*. L'ischemia è stata realizzata mediante legatura dell'arteria femorale per 1 h, e la riperfusione è stata applicata per 15 min. Mediante western blot osserviamo che, nell'arto inferiore ischemico, l'ischemia induce un aumento transiente dei livelli di GRK2 (*Figura 7E*). Nei topi controllo GRK2<sup>ff</sup>, l'occlusione dell'arteria femorale riduce i livelli di ATP e la riperfusione parzialmente ristabilisce i livelli di ATP. Nell'arto inferiore ischemico dei topi GRK2<sup>ff,CRE</sup>, la rimozione di GRK2 causa una significativa riduzione dei livelli di ATP ed un lento recupero dopo riperfusione quando paragonato a topi controllo (*Figura 7F*).

## DISCUSSIONE

Questo studio mostra per la prima volta che GRK2 può localizzarsi sulla membrana mitocondriale esterna. Infatti, fino ad oggi, diversi studi dimostrano la localizzazione di GRK2 nel citosol e sulla membrana plasmatica ancorata attraverso il dominio omologo alla plecstrina e il dominio G $\beta\gamma$  nella regione carbossi terminale [37]. Il nostro studio dimostra che anche i mitocondri possono essere inclusi come compartimenti cellulari nei quali la chinasi si può localizzare. In particolare, due regioni, nel dominio RH e nel dominio catalitico, possiedono l'abilità di localizzare la chinasi in questi organelli. Il risultato più interessante è che GRK2 è in grado di modificare la biologia dei mitocondri promuovendo la biogenesi mitocondriale. Infatti, abbiamo osservato cambiamenti dei livelli di DNA e RNA, modifiche nella produzione di ATP mitocondriale nonché le dimensioni di massa mitocondriale, dopo overespressione o delezione della chinasi. I mitocondri sono gli organelli responsabili delle risposte allo stress, come l'ischemia/riperfusionazione [38], e in queste condizioni abbiamo osservato due fenomeni inattesi. In primo luogo, l'ischemia provoca l'accumulo transiente sia cellulare che mitocondriale di GRK2, in vitro (*Figura 7A*) ed in vivo (*Figura 7E*), in quanto la riossigenazione ripristina i livelli della chinasi alle normali condizioni di ossigeno. Questa evidenza supporta il ruolo fisiologico di GRK2 nei mitocondri. In secondo luogo, si rivela un effetto protettivo della chinasi, dato che l'overespressione causa un accumulo mitocondriale della chinasi e protegge la produzione di ATP anche dopo i danni causati dall'ischemia/riperfusionazione. Non è chiaro il meccanismo attraverso il quale GRK2 localizza nei mitocondri, ma abbiamo dimostrato che all'interno di questi organelli, la chinasi può legare e fosforilare alcune proteine. E' possibile ipotizzare che questi substrati favoriscono

l'accumulo di GRK2 all'interno dei mitocondri. Infatti, utilizzando un mutante catalitico inattivo di GRK2 si può osservare l'accumulo mitocondriale, suggerendo che l'attività enzimatica della chinasi non è necessaria per la localizzazione (dati non riportati). L'identificazione del partner mitocondriale di GRK2 è uno studio che si sta effettuando attivamente in laboratorio, e permetterà di comprendere meglio i meccanismi della biogenesi mitocondriale e la protezione indotta dalla chinasi. L'attività favorevole di GRK2 nei mitocondri risulta essere protettiva, in particolare dopo ischemia/riperfusion. Studi precedenti supportano un ruolo protettivo di GRK2 per la cellula. In primo luogo, la rimozione di GRK2 è letale per lo sviluppo embrionale cardiaco [39]. In secondo luogo, nell'età adulta, la rimozione cardiaca di GRK2 altera la risposta ipertrofica cardiaca alla stimolazione cronica dei recettori adrenergici, causando una dilatazione del cuore simile a quella osservata nelle fasi intermedie/avanzate dello scompenso cardiaco [27]. Al contrario, altri dati in letteratura, suggeriscono un effetto negativo dell'aumento dei livelli di GRK2 per la cellula, e potrebbero sembrare in contrasto con il presente studio. In particolare, nei topi sottoposti ad infarto del miocardio, la rimozione specifica di GRK2 attraverso la delezione del gene risulta nel miglioramento della sopravvivenza, riduzione dell'area ischemica e miglioramento delle prestazioni cardiache [40]. Questa apparente discrepanza può essere imputata a differenze nei tempi e nel modello. Infatti, abbiamo applicato ischemia riperfusion per 1 h nel muscolo scheletrico. E' possibile che in un tessuto più ampio oppure in un tessuto più sensibile come il miocardio, le caratteristiche negative di GRK2 prevalgono sugli effetti metabolici di protezione della chinasi.

In conclusione, i nostri dati supportano la costruzione di un nuovo ruolo di GRK2 in cui non solo regola il signaling dei GPCR [37], ma coordina una serie di

risposte metaboliche come l'estrazione di glucosio [24], il metabolismo e l'attivazione della biogenesi mitocondriale.

## LEGENDE

**Figura 1.** (A) Desensibilizzazione del recettore  $\beta_2$  adrenergico. (B) Struttura dei recettori accoppiati a GPCR. Allineamento multiplo delle sequenze aminoacidiche per i 7 membri della famiglia delle GRKs.

Nella sequenza consenso in alto:

le colonne verdi indicano amminoacidi identici presenti in tutte le sequenze;

le colonne gialle indicano amminoacidi identici presenti solo in alcune sequenze;

le colonne rosse indicano amminoacidi differenti presenti nelle sequenze.

**Figura 2.** (A) Livelli di ATP cellulare e mitocondriale in cellule HEK-293 e GRK2-HEK (\*  $P < 0.05$  vs HEK-293). (B) L'infezione con AdCRE rimuove il gene di GRK2 in cellule GRK2<sup>ff</sup>. La rimozione di GRK2 è stata confermata mediante western blot (1: cellule trattate con AdCRE; 2: cellule trattate con AdEMPTY). (C) Livelli di ATP cellulare e mitocondriale in cellule GRK2<sup>ff</sup> e GRK2<sup>ff,CRE</sup> (+  $P < 0.05$  vs GRK2<sup>ff</sup>).

**Figura 3.** (A) I mitocondri sono stati isolati mediante co-frazionamento utilizzando un gradiente di Percoll al 30% e osservati al microscopio elettronico. (B) La localizzazione di GRK2 è stata dimostrata mediante immunogold utilizzando estratti mitocondriali e l'anticorpo anti-GRK2. (C) I livelli di GRK2 sono stati valutati nel citosol (Cit) e nei mitocondri (Mit) isolati da cellule HEK-293, mediante western blot. (D) L'assenza dell'istone H3 e della calnexina nei mitocondri purificati è stata confermata mediante western blot in cellule HEK-293 utilizzando estratti totali per il peso molecolare di riferimento. (E) L'overespressione stabile di GRK2-WT aumenta i livelli di GRK2 sia nel citosol che nei mitocondri (\*  $P < 0.05$  vs HEK-293). (F) I mitocondri sono stati incubati con o senza tripsina (Trip). Per rompere i mitocondri, il triton X-100 (Trit) è stato

aggiunto nel buffer di lisi. I campioni sono stati probati per GRK2, MnSOD e VDAC1. **(G)** La localizzazione di GRK2 è stata analizzata mediante immunofluorescenza. Cellule HEK-293 e GRK2-HEK sono state incubate in vivo con il mitotracker (rosso), fissate, ed incubate con l'anticorpo anti-GRK2. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale. Bars, 10 $\mu$ m.

**Figure 4.** **(A)** Sequenza di GRK2 e mutanti tronchi clonati in pcDNA3.1 (+) Myc/His A. Cellule HEK-293 trasfettate con pcDNA3.1 codificante per GRK2 NT-CD **(B)**, GRK2 RH **(C)**, GRK2 CD-CT **(D)** e GRK2 CT **(E)**.

**Figure 5.** **(A)** Saggio di overlay con o senza proteina purificata in mitocondri isolati da cellule HEK-293 e GRK2-HEK trasferite su nitrocellulosa. **(B)** La proteina GRK2 purificata è stata incubata con estratti mitocondriali derivati da cellule HEK-293 e GRK2-HEK trasferiti su nitrocellulosa in un buffer in presenza di [<sup>32</sup>P] $\gamma$ -ATP. Il blot è stato quindi lavato ed esposto ad autoradiografia.

**Figure 6.** **(A e B)** Analisi di RT-PCR, in cellule HEK-293 e GRK2-HEK, del numero di copie geniche e dei livelli di espressione di due geni mitocondriali, citocromo B e NADHd, utilizzando la proteina nucleare  $\beta$  globina come controllo interno (RQ: quantità relative, \* P<0.05 vs HEK-293). **(C e D)** Analisi di RT-PCR, in cellule GRK2<sup>ff</sup> e GRK2<sup>ff,CRE</sup>, del numero di copie geniche e dei livelli di espressione di due geni mitocondriali, citocromo B e NADHd, utilizzando la proteina nucleare  $\beta$  globina come controllo interno (RQ: quantità relative, + P<0.05 vs GRK2<sup>ff</sup>). **(E)** Intensità di fluorescenza emessa in cellule HEK-293 (verde), GRK2-HEK (rosso) e campione senza incubazione con mitotracker (viola) mediante FACS analisi. **(F)** Intensità di fluorescenza emessa in cellule GRK2<sup>ff</sup> (verde), GRK2<sup>ff,CRE</sup> (rosso) e campione senza incubazione con mitotracker (viola) mediante FACS analisi.

**Figure 7.** (A) *In vitro*, GRK2 si accumula durante ipossia e ritorna a livelli basali dopo riperfusione (1: No ipossia; 2: 1h ipossia; 3: 15 min riperfusione; 4: 1 h riperfusione). (B) Contenuto di ATP cellulare in cellule HEK-293 e GRK2-HEK durante ipossia (H: Ipossia; O.R.: Riperfusione; \* P<0.05 vs HEK-293). (C) Contenuto di ATP cellulare in cellule GRK2<sup>ff</sup> e GRK2<sup>ff,CRE</sup> durante ipossia (H: Ipossia; O.R.: Riperfusione; + P<0.05 vs GRK2<sup>ff</sup>). (D) *In vivo*, livelli di espressione di GRK2 nel muscolo femorale isolato dal topo ricombinante dopo iniezione intramuscolare di AdCre (10<sup>9</sup> pfu/ml) (1: AdEMPTY; 2: AdCre). (E) L'ischemia induce un aumento di GRK2, che ritorna a livelli basali dopo 15 min di riperfusione (1: No ischemia; 2: 1h ischemia; 3: 15 min rip). (F) Contenuto di ATP nei muscoli dei topi sottoposti ad ischemia/riperfusione dell'arto inferiore (\* P<0.05 vs GRK2<sup>ff</sup>; CTRL: muscolo non ischemico; IS: 1 h ischemia; Rep: riperfusione).

**Tabella 1.** Primers utilizzati per il clonaggio.



## BIBLIOGRAFIA

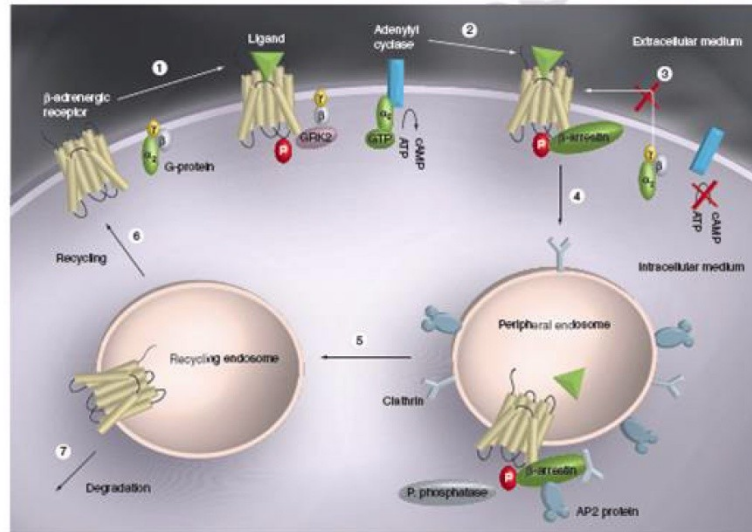
- [1] Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. *FASEB J* 1995;9(2):175-182.
- [2] Campanile A, Iaccarino G. *Biomark Med* 2009;3(5):525-540.
- [3] Lefkowitz RJ, Whalen EJ. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(2):162-168.
- [4] Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC. *Nat Med* 2005;11(9):952-958.
- [5] Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. *J Cell Biol* 1999;145(5):927-932.
- [6] Salles M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. *J Biol Chem* 1997;272(15):10188-10195.
- [7] Salles M, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knopfel T, De Blasi A. *FASEB J* 2000;14(15):2569-2580.
- [8] Lodowski DT, Tesmer VM, Benovic JL, Tesmer JJ. *J Biol Chem* 2006;281(24):16785-16793.
- [9] Yang W, Xia SH. *World J Gastroenterol* 2006;12(48):7753-7757.
- [10] Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T. *J Biol Chem* 1999;274(48):34483-34492.
- [11] Dhami GK, Anborgh PH, Dale LB, Sterne-Marr R, Ferguson SS. *J Biol Chem* 2002;277(28):25266-25272.
- [12] Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ. *Science* 2005;310(5754):1686-1690.
- [13] Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Nature* 1992;359(6391):147-150.
- [14] Salles M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L, De Blasi A. *Mol Pharmacol* 2000;57(4):826-831.
- [15] Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ. *Circulation* 1998;98(17):1783-1789.
- [16] Eckhart AD, Koch WJ. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(1):1-5.
- [17] Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. *Circulation* 1993;87(2):454-463.
- [18] Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G. *Circ Res* 1996;79(3):455-460.
- [19] Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. *J Clin Invest* 1997;99(9):2087-2093.
- [20] Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ. *Eur Heart J* 2005;26(17):1752-1758.
- [21] Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA. *J Biol Chem* 1997;272(27):17223-17229.
- [22] Izzo R, Cipolletta E, Ciccarelli M, Campanile A, Santulli G, Palumbo G, Vasta A, Formisano S, Trimarco B, Iaccarino G. *Clin Transl Sci* 2008;1(3):215-220.
- [23] Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. *N Engl J Med* 1982;307(4):205-211.
- [24] Cipolletta E, Campanile A, Santulli G, Sanzari E, Leosco D, Campiglia P, Trimarco B, Iaccarino G. *Cardiovasc Res* 2009;84(3):407-415.
- [25] Antico Arciuch VG, Alippe Y, Carreras MC, Poderoso JJ. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(14):1234-1249.
- [26] Ciccarelli M, Cipolletta E, Santulli G, Campanile A, Pumiglia K, Cervero P, Pastore L, Astone D, Trimarco B, Iaccarino G. *Cell Signal* 2007;19(9):1949-1955.
- [27] Matkovich SJ, Diwan A, Klanke JL, Hammer DJ, Marreez Y, Odley AM, Brunskill EW, Koch WJ, Schwartz RJ, Dorn GW, 2nd. *Circ Res* 2006;99(9):996-1003.
- [28] Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Cerullo V, Iovino GL, Paudice A, Elia A, Santulli G, Campanile A, Arcucci O, Pastore L, Salvatore F, Condorelli G, Trimarco B. *Circulation* 2004;109(21):2587-2593.

- [29] Sorriento D, Campanile A, Santulli G, Leggiero E, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G. *Mol Cancer* 2009;8:97.
- [30] de Brito OM, Scorrano L. *Nature* 2008;456(7222):605-610.
- [31] Sorriento D, Santulli G, Fusco A, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. *Hypertension*;56(4):696-704.
- [32] Sorriento D, Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Altobelli GG, Cimini V, Galasso G, Astone D, Piscione F, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(46):17818-17823.
- [33] Livigni A, Scorziello A, Agnese S, Adornetto A, Carlucci A, Garbi C, Castaldo I, Annunziato L, Avvedimento EV, Feliciello A. *Mol Biol Cell* 2006;17(1):263-271.
- [34] Chohanadisai W, Bauerly KA, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi GA, Rucker RB. *J Biol Chem*;285(1):142-152.
- [35] Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Galasso G, Cervero P, Altobelli GG, Cimini V, Pastore L, Piscione F, Trimarco B, Iaccarino G. *Br J Pharmacol* 2008;153(5):936-946.
- [36] Santulli G, Ciccarelli M, Palumbo G, Campanile A, Galasso G, Ziaco B, Altobelli GG, Cimini V, Piscione F, D'Andrea LD, Pedone C, Trimarco B, Iaccarino G. *J Transl Med* 2009;7:41.
- [37] Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ. *Science* 2003;300(5623):1256-1262.
- [38] Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A. *Trends Cell Biol* 2008;18(12):604-613.
- [39] Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, Caron MG, Giros B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(23):12974-12979.

# FIGURE E TABELLE

Figura 1

A



B

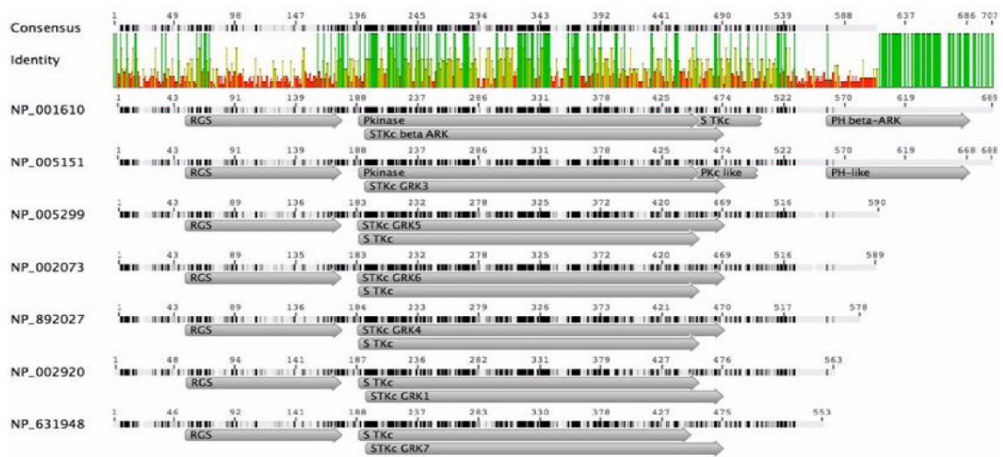
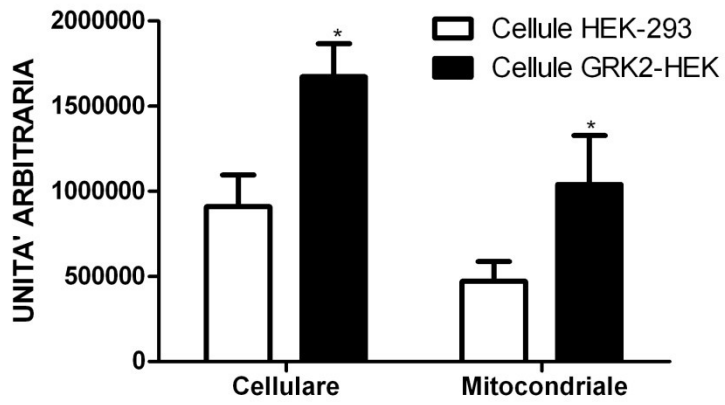
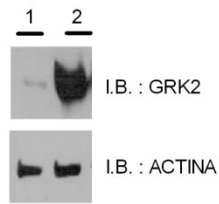


Figura 2

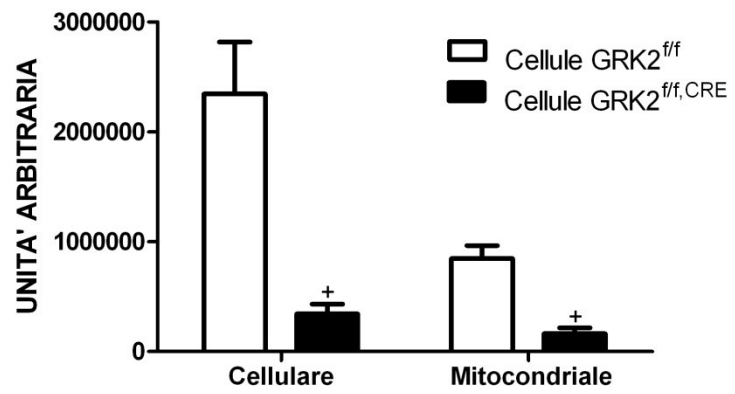
A



B

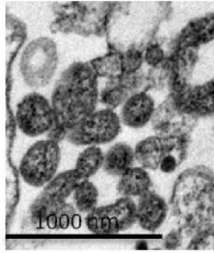


C

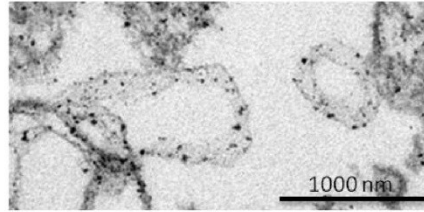


# Figura 3

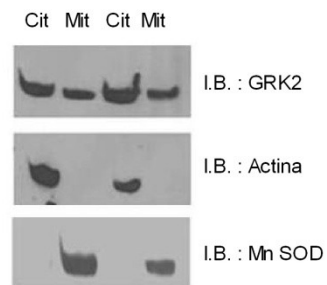
**A**



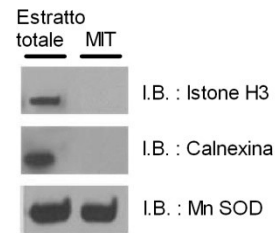
**B**



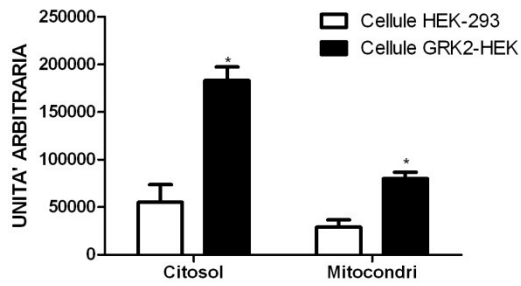
**C**



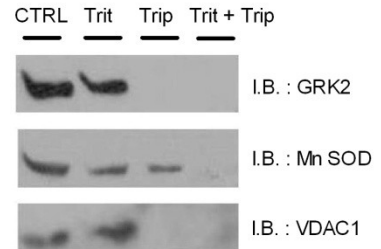
**D**



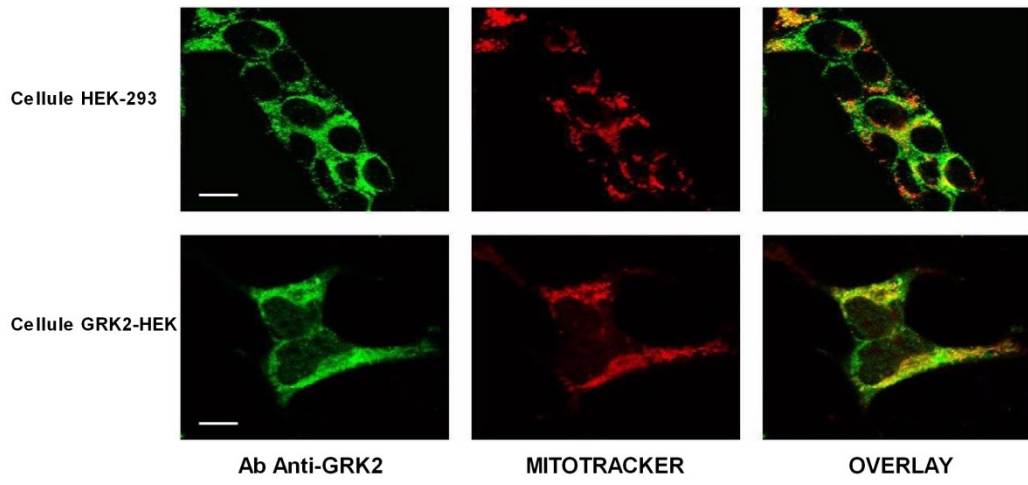
**E**



**F**

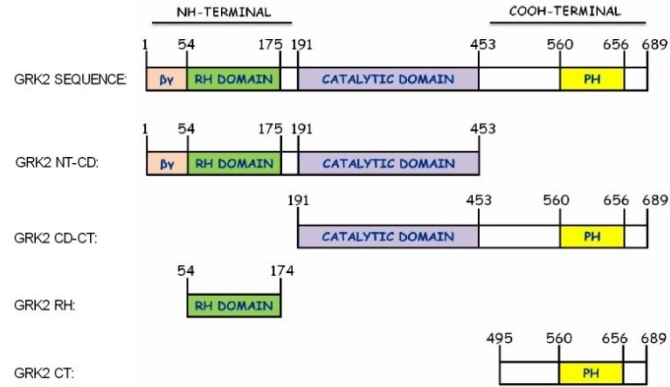


**Figura 3G**

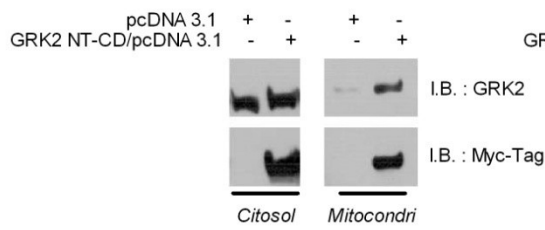


# Figura 4

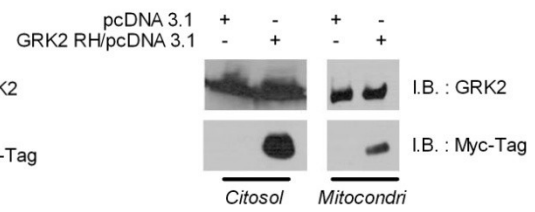
**A**



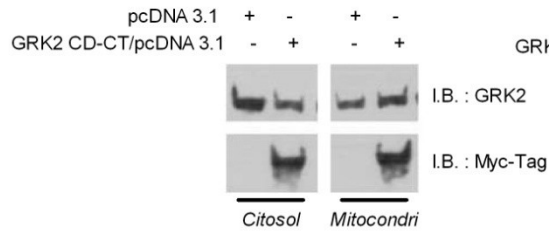
**B**



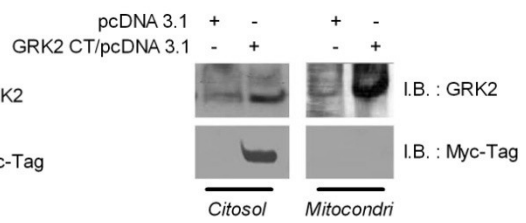
**C**



**D**

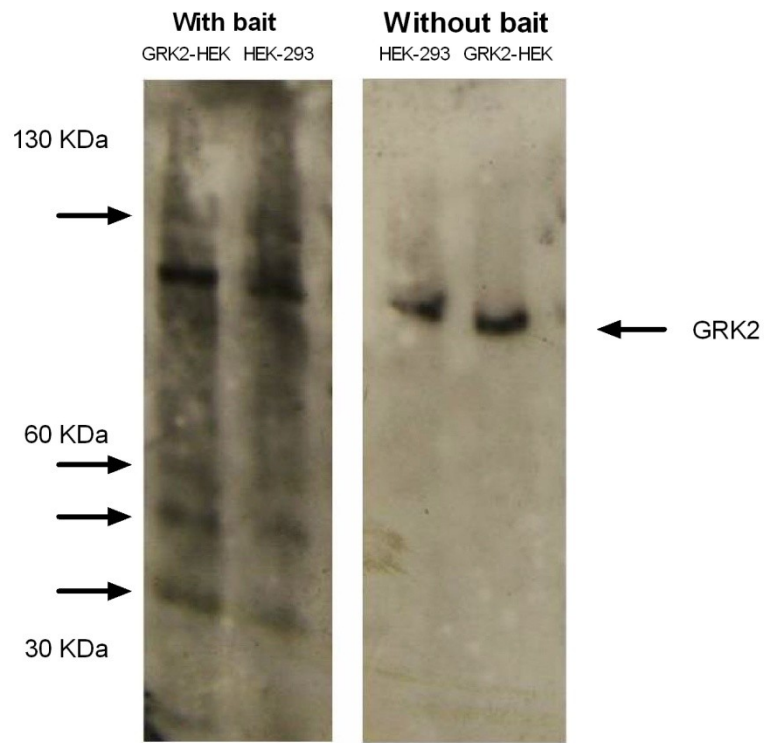


**E**

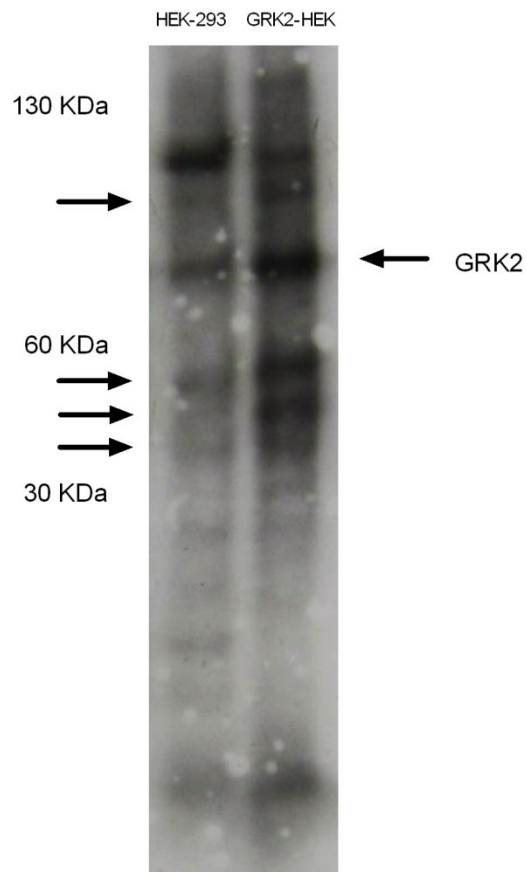


# Figura 5

**A**

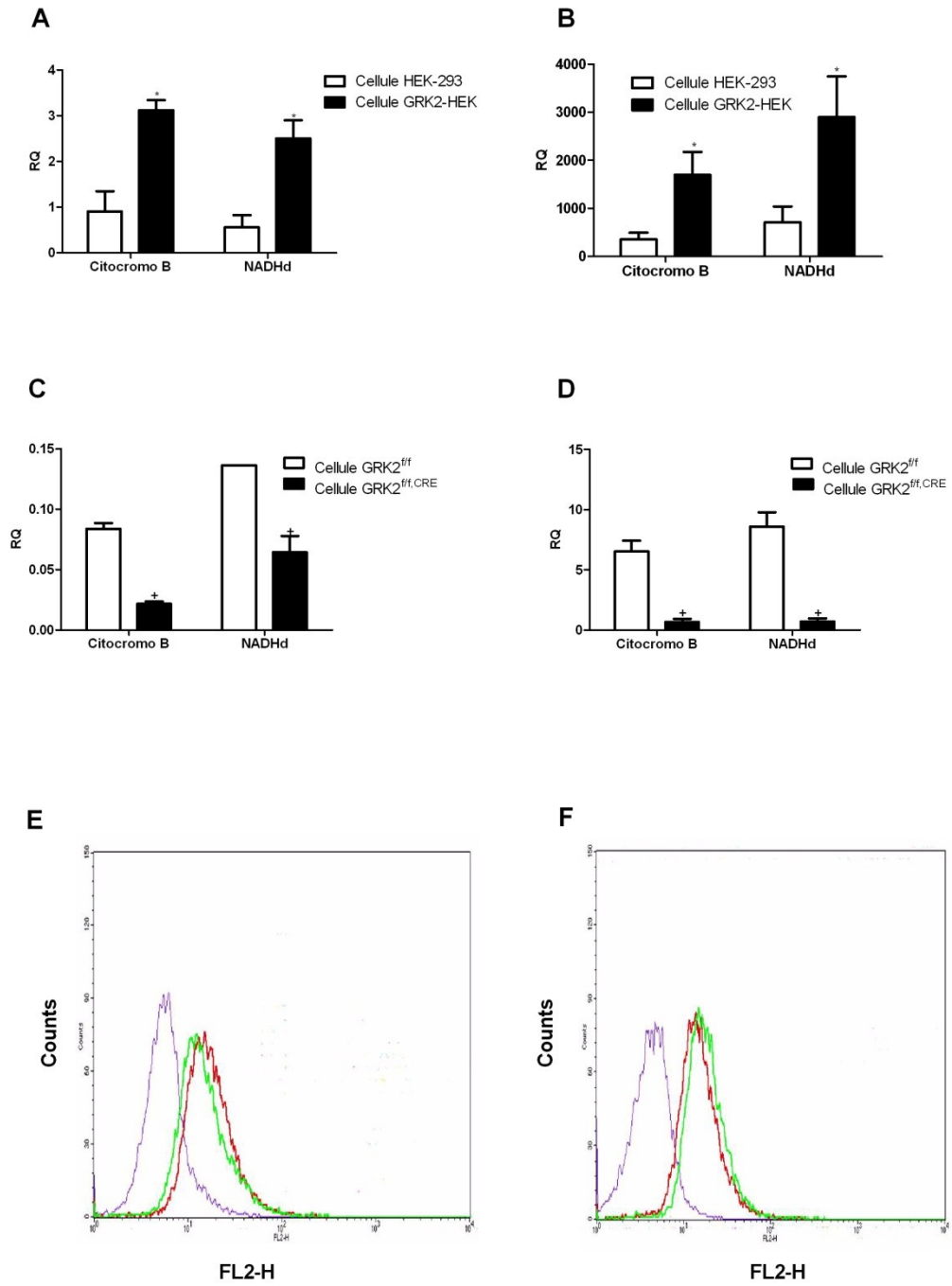


**B**



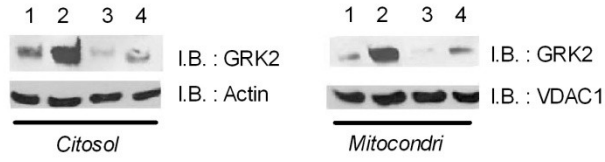


**Figura 6**

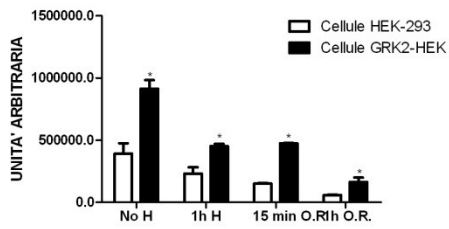


# Figura 7

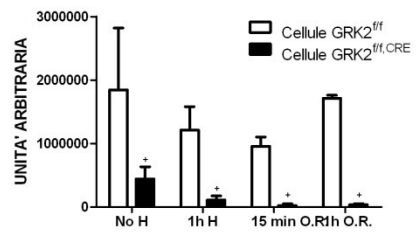
**A**



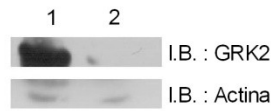
**B**



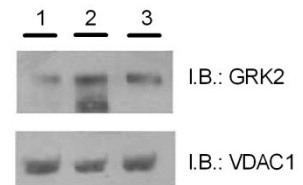
**C**



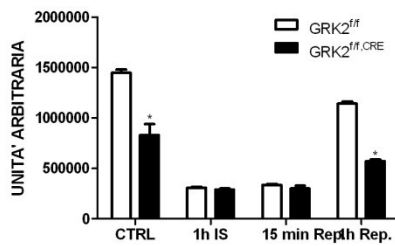
**D**



**E**



**F**



**TABELLA 1. Primers per i clonaggi**

<i>PRIMERS</i>		<i>ENZIMI DI RESTRIZIONE</i>
<b>GRK2 NT-CD</b>	For: 5'-TAAGCTTGGATGGCGGACCTGGAGGC-3'	HindIII
	Rev: 5'-CCCTCTAGAGAAAAAGGGGCTCTCTTTC-3'	XbaI
<b>GRK2 CD-CT</b>	For: 5'-TAAGCTTGGATGGAATGACTTCAGCGTGCATC-3'	HindIII
	Rev: 5'-CCCTCTAGAGAGGCCGTTGGCACTGCCGCG-3'	XbaI
<b>GRK2 RH</b>	For: 5'-AAAAGGATCCTGATGACCTTTGAGAAGATC-3'	BamHI
	Rev: 5'-AAAAGATATCTGCAAACCGTGTGAACTTATC-3'.	EcoRV
<b>GRK2 CT</b>	For: 5'- TAAGCTTGGATGCTCCCTGGACTGGCAGATG -3',	HindIII
	Rev: 5'- CCCTCTAGAGAGGCCGTTGGCACTGCCGCG- 3'	XbaI