

## ABSTRACT

Gli studi condotti in questo periodo di tirocinio si inseriscono in un progetto di ricerca assai più ampio atto a capire e studiare gli effetti del trattamento a base di acetato di Zn per il morbo di Wilson utilizzando i ratti LEC come modello animale.

La malattia o morbo di Wilson è una patologia che provoca un accumulo di Cu principalmente a livello epatico, cerebrale e renale, con conseguenti gravi danni che portano alla morte se non curata; una delle terapie consiste nella somministrazione di Zn sotto forma di acetato, che, da un lato entra in competizione con il Cu a livello dei siti di assunzione, e dall'altro promuove la sintesi di metallotioneine, proteine con azione chelante, che legano con alta affinità il Cu: il risultato finale è che è ridotta la concentrazione di Cu libero. In questa malattia si riscontra molto spesso anche una alterazione nel metabolismo del Fe.

Il lavoro qui svolto è mirato a studiare l'espressione genica della proteina DMT-1.

DMT-1 è un trasportatore di cationi divalenti (*Divalent Metal Ion Transporter 1*) coinvolto sia nell'assimilazione sia nell'omeostasi del Fe, ma non solo, in quanto ha affinità di legame anche per altri cationi.

Gli esperimenti sono stati condotti su materiale congelato, proveniente da studi precedenti, in cui i ratti erano stati divisi in due gruppi: un gruppo di ratti trattati con somministrazione di zinco per via orale (*gavage*) per un periodo di 60 giorni ed un gruppo di controllo allevato per lo stesso periodo di tempo a cui era somministrata sempre per *gavage* una soluzione glucosata.

L'espressione genica è stata studiata analizzando il messaggero (estratto con il relativo protocollo dal materiale congelato) mediante RT-PCR: retrotrascrizione ed amplificazione con primer specifici e successiva elettroforesi quantitativa.

Lo scopo finale è quello di contribuire al chiarimento del meccanismo protettivo operato dallo Zn verso i danni provocati dal rame nei ratti LEC.

## INTRODUZIONE

### Rame

Il Cu appartiene alla categoria degli “elementi traccia”, cioè elementi essenziali per gli organismi, ma presenti in quantità minime, dell’ordine dei  $\mu\text{g/g}$  di peso corporeo. Il Cu è un componente essenziale strutturale e funzionale di molti enzimi e proteine; ricordo la ceruloplasmina (*Garrick et al., 2002*), una metalloproteina (globulina) deputata al trasporto del Cu nel sangue per impedire un suo accumulo nei tessuti e che riveste un ruolo importante anche nel metabolismo del Fe essendo una delle maggior ferrosidasi.

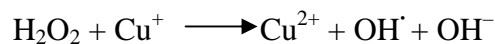
Le forme chimiche cui può presentarsi il Cu sono la forma ridotta  $\text{Cu}^+$  (ione rameoso) oppure la forma ossidata  $\text{Cu}^{2+}$  (ione rameico), più stabile e quindi la più comune.

Come per tutti gli elementi essenziali, l’omeostasi del Cu è necessaria in quanto una sua carenza (ad es. Morbo di Menkes, malattia a carattere ereditario) o un suo eccesso (ad es. Morbo di Wilson, altra malattia a carattere ereditario) possono essere letali. In particolare il Cu (come il Fe) promuove la formazione dei radicali liberi dell’ossigeno che sono estremamente tossici.

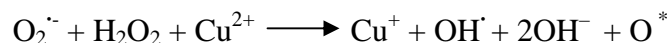
Le Specie Reattive dell’Ossigeno (ROS) sono le seguenti:

- Radicale superossido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )
- Radicale idrossile ( $\text{OH}^{\cdot}$ )
- Perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Ossigeno singoletto ( $\text{O}^*$ )

Gli ioni rameosi producono i ROS in quanto nella reazione di Fenton generano il radicale idrossile (*Garrick et al., 2002*):



Mentre gli ioni rameici catalizzano la reazione di Haber-Weiss:



La cellula, per prevenire ed affrontare il danno esercitato da questi radicali liberi, attua diversi meccanismi: utilizza infatti gli antiossidanti, cioè molecole di varia natura (enzimi antiossidanti ma anche composti proteici o grassi, lipidi, composti idrosolubili come alcune vitamine, chelanti di metalli) che, presenti in bassa concentrazione rispetto al substrato da ossidare, sono in grado di inibire o ritardare l’ossidazione dei componenti biologici.

Quando però questi sistemi sono saturati dall’azione dei ROS si verifica la cosiddetta condizione di “stress ossidativo”, nella quale la cellula subisce i danni dei radicali liberi, soprattutto del radicale idrossile, che possono comprendere: perossidazione dei lipidi di membrana e della cromatina (*Garrick et al., 2002*), disattivazione di enzimi e proteine importanti per l’ossidazione di gruppi ossidabili, quali possono essere i gruppi sulfidrilici  $-\text{SH}$ , ed infine l’induzione di processi apoptotici.

Nei mammiferi l’omeostasi del Cu è regolata finemente grazie a meccanismi di assorbimento, trasporto, accumulo ed escrezione. L’assorbimento è localizzato a

livello della mucosa gastrica e maggiormente nell'intestino tenue, l'ingresso avviene per diffusione semplice, attraverso pori o canali ionici (come Cu in forma ionica), ma c'è da ricordare che il Cu, come anche altri metalli (come ad esempio il Fe), sono essenzialmente insolubili in soluzione acquosa a pH neutro perciò si rendono indispensabili meccanismi di trasporto come carrier o chaperoni che legano il metallo in questione (*Garrick et al., 2002*).

Il trasporto del Cu assorbito avviene tramite il circolo portale che lo conduce al fegato, qui può venire accumulato, ridistribuito ed escreto. L'escrezione avviene principalmente per via biliare, mentre l'escrezione renale è trascurabile.

### **Ferro**

Anche il Fe come il Cu appartiene al gruppo degli elementi traccia, negli esseri umani gioca diversi ruoli tra cui quello di legare l'ossigeno nell'emoglobina e risulta altresì importante come centro catalitico per esempio nei citocromi.

Nell'uomo medio dai 0.5 ai 2 mg di Fe vanno persi causa, principalmente, desquamazione delle cellule epiteliali che si trovano nel tratto gastrointestinale, urinario ma anche nella pelle e dai capelli; quindi lo stesso ammontare di Fe deve essere introdotto tramite la dieta. (*Formigari et al., 2008*)

L'eccesso però di Fe nelle cellule può portare alla formazione di ROS:  $Fe^{2+}$  può perdere un elettrone e se questo processo risulta essere incontrollato può dare luogo a ossidazione di lipidi, proteine e DNA causando danni alle strutture e ai processi che ne sono coinvolti.

L'assorbimento del Fe avviene nel lume intestinale attraverso le cellule apicali dei villi intestinali, qui il Fe dopo esser stato ridotto a  $Fe^{2+}$  esce attraverso la membrana basolaterale nel plasma legato alla transferrina. (vedi **figura 2**)

### **Zinco**

Lo Zn, come il Cu, fa parte del gruppo degli elementi traccia: risulta essere indispensabile in quanto cofattore di più di 300 enzimi dove può svolgere funzioni strutturali, catalitiche e/o regolatrici.

Lo Zn viene assorbito nel tratto digerente a livello dell'intestino tenue, in particolare nel digiuno, tramite due tipi di trasporto: un meccanismo non saturabile, non influenzato dalla quantità di Zn introdotta durante l'alimentazione che coinvolge il legame diretto con la membrana e sembra coinvolgere legami con fosfolipidi e residui di zuccheri (*Sandström, 1992*), ed un meccanismo saturabile, sensibile alle concentrazioni di Zn nel lume intestinale e mediato da carrier (*Lønnerdal, 1989*). L'escrezione avviene principalmente per via intestinale tramite desquamazione di cellule enteriche e secrezioni digestive (pancreatiche in maggior parte), per via renale tramite ultrafiltrazione di amminoacidi leganti Zn (i più importanti cisteina e istidina) ed una quota minore tramite le secrezioni (saliva, secrezioni cutanee e liquido sinoviale) (*Eugene et al., 2003*)

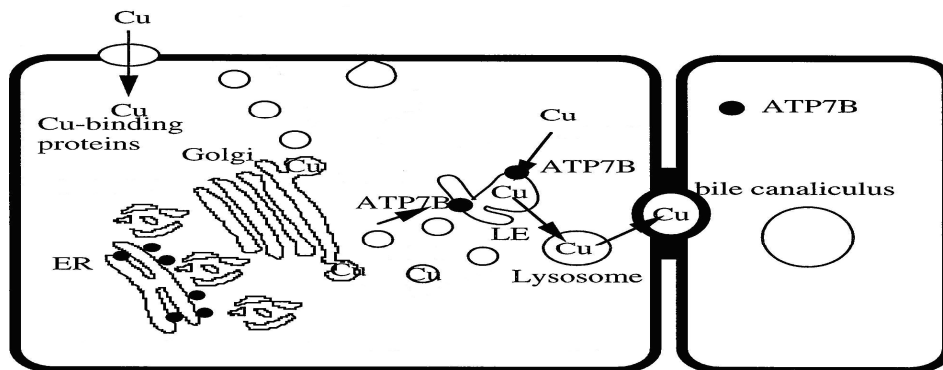
### **Morbo di Wilson**

La malattia di Wilson è un disordine ereditario che si trasmette con modalità autosomica recessiva caratterizzata da accumulo di Cu nel corpo dovuto ad una non appropriata secrezione a livello della bile da parte degli epatociti (*Masaru Harada, 2002*).

La causa può essere ricercata nel mal funzionamento di una proteina, codificata dal gene ATP7B (*Masaru Harada, 2002*), che risulta essere un trasportatore di Cu

(ATPasi di tipo P) con un'omologia del 65% con l'ATP7A, la proteina responsabile del Morbo di Menkes; il gene in questione è espresso principalmente nel fegato ma anche in reni e cervello.

ATP7B serve principalmente per l'incorporazione del Cu nella ceruloplasmina (Cp) e per espellere attraverso la bile il Cu in eccesso; per far questo la proteina è espressa sul lato della membrana cellulare che dà verso il lume dei canalicoli biliari o a livello dell'apparato del Golgi, dove permette l'entrata del Cu nei lisosomi, che successivamente si fondono con la membrana plasmatica riversando nello spazio extracellulare il loro contenuto.



**Figura 1** Schema esemplificativo del metabolismo del Cu in un epatocita di mammifero.

Al mancato funzionamento di questo meccanismo il Cu inizialmente si accumula nel fegato poi, con l'aumentare del suo contenuto, viene rilasciato in circolo e si deposita in organi quali il cervello e i reni (Halliwell et al., 1984).

La sintomatologia generalmente comprende prima cirrosi epatica e/o più tardivamente disturbi neuropsichiatrici; se la malattia non è curata con adeguata terapia il decorso è letale.

Lo studio del morbo di Wilson può essere effettuato su organismi modello per tale malattia, quali i ratti LEC (*Long-Evans rats with a Cinnamon-like coat color*): questo è un ceppo derivato da un ratto mutato casualmente e isolato da una colonia di ratti *Long Evans* (LE). Questi organismi modello rappresentano una mutazione a livello del gene *atp7b* omologo del gene umano *ATP7B* responsabile della malattia di Wilson (Wu et al., 1994). A differenza della malattia umana, nei ratti raramente si riscontrano problemi neurologici e si notano i seguenti sintomi: inizialmente c'è sviluppo di epatite acuta circa quattro mesi dopo la nascita, chi sopravvive (circa il 50-80%) continua a soffrire di epatite cronica seguita dall'insorgenza di un epatocarcinoma entro i 18 mesi d'età (Masuda et al., 1988).

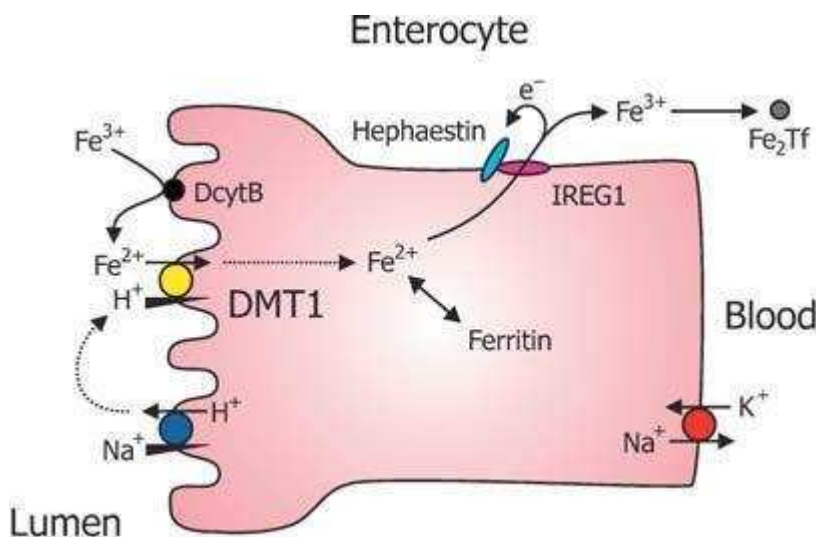
Le terapie non sono uniche anzi sono molteplici, qui di seguito se ne elencano alcune:

- Penicillamina (D-PCA): questo farmaco risulta essere ancora il “gold standard” per far fronte alla malattia. Riduce i legami del Cu legato alle proteine e in tal modo agisce come un chelante che viene eliminato attraverso l'urina. Questo farmaco presenta però diversi effetti collaterali, come la deficienza della vitamina B6 che deve essere somministrata come supplemento alla comune dieta ed effetti collaterali di tipo immunologico che possano portare alla comparsa di altre

malattie quali il lupus eritematoso e la sindrome di Sjogren (*P. Ferenci, 2003*).

- Trientina: è anche questo un chelante che agisce aumentando la secrezione urinaria del Cu, presenta pochi effetti collaterali se raffrontato con la penicillamina, ed è usata come un'alternativa alla D-PCA in caso di intolleranza.
- Zinco: dagli inizi degli anni '80 è stato introdotto nella terapia del morbo di Wilson. È somministrato sotto forma di sale acetato e/o solfato e risulta non essere un chelante diretto. Il maggior punto di interesse è che presenta una buona efficacia e mancanza di tossicità (*Brewer et al., 1992*); stimola la sintesi delle metallotioneine, molecole in grado di legare il Cu che successivamente vengono eliminate con le feci. Il risultato finale è una diminuzione della concentrazione del rame, ma soprattutto il sequestro di Cu in forma non tossica.

### DMT-1



**Figura 2** Modello di trasporto mediato da DMT-1 in un enterocita (tratto da Bryan Mackenzie et al., 2003)

Il *divalent metal transporter 1* (DMT-1, conosciuto anche come DCT-1 acronimo di *divalent cation transporter 1*) fa parte della famiglia SLC11, famiglia che comprende i trasportatori di metalli che funzionano grazie ad un gradiente protonico dovuto ad un ambiente leggermente acido (*Bryan Mackenzie et al., 2003*).

Il prodotto di questo gene è omologo a Nramp1, (*natural resistance associated macrophage protein*), gene associato con la resistenza naturale verso i batteri intracellulari.

DMT-1 è un trasportatore di cationi con alta affinità per il  $Fe^{2+}$  che si localizza a livello della membrana plasmatica. La sua espressione è ubiquitaria, ma risulta più marcata a livello dell'orletto a spazzola degli enterociti intestinali, dove ricopre il ruolo fondamentale di assorbire il Fe introdotto con l'alimentazione (*Gunshin et al., 1997*). Una visione più completa può essere apprezzata nella **Figura 2** dove è riportato il meccanismo di trasporto del Fe in un enterocita. Il  $Fe^{3+}$  (per il quale

DMT-1 ha bassa affinità) viene dapprima ridotto a  $\text{Fe}^{2+}$  grazie a DcytB (*DcytB duodenal cytochrome B*) poi, grazie ad un co-trasporto con protoni  $\text{H}^+$  (Bryan Mackenzie et al., 2003), il Fe viene stoccato grazie alla ferritina.

Il Fe esce successivamente dalle cellule intestinali grazie all'apporto di una ferroportina (*IREG1*), una proteina transmembrana con più domini non correlata a DMT-1; quest'ultima è espressa nella membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali. Due ferrosidasi, epastina (nell'intestino) e ceruloplasmina (negli altri organi) sono imputate nel far uscire il ferro e ossidarlo a  $\text{Fe}^{3+}$ , a questo punto il Fe extracellulare circola nel plasma legato alla transferrina (Tf), proteina bilobata con due siti ad alta affinità per legare il  $\text{Fe}^{3+}$ .

## MATERIALI E METODI

### Premesse

Nel mio lavoro di tirocinio si è utilizzato materiale proveniente da un esperimento condotto in precedenza; di seguito è riportato brevemente come era stata condotta la fase sperimentale.

I ratti erano stati stabulati due per gabbia, mantenuti a cicli luce/ombra di 12 ore ciascuno e ad una temperatura controllata costante di 25 °C. L'alimentazione era tipica (acqua e dieta standard) e libera (*Santon et al., 2002*).

Qui di seguito si riporta come erano stati suddivisi:

### Tabella

Gruppo	Numero individui	Durata esperimento (gg)
Non trattati	13	60
Trattati <sup>(2)</sup>	13	60

- Trattati per via orale (gavage) con 0.5 ml di soluzione glucosata al 2% di Zn-acetato con concentrazione 160 mg/ml, una volta/die (pari a 80 mg/ratto/die).
- Non trattati: ricevevano sola soluzione glucosata per gavage.

Al termine dell'esperimento erano stati prelevati vari organi (fegato, rene ecc.), congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C. Per le mie analisi sono stati utilizzati i reni.

### Estrazione dell'RNA totale

Si prelevano delle aliquote dai campioni conservati a -80 °C e si procede all'estrazione dell'RNA ivi contenuto utilizzando l'apposito protocollo.

Tutte le operazioni sono state effettuate con l'ausilio di guanti, sotto cappa, utilizzando solo pipette apposite per RNA ed eppendorf trattate con dietilpirocarbonato (D.E.P.C.).

I pezzi di tessuto, sono stati posti in una eppendorf, pesati con una bilancia analitica e successivamente omogenati aggiungendo 1 ml di TRIzol (miscela di fenolo e guanidina isotiocianato dove quest'ultima lisa le cellule e dissolve i componenti cellulari quali le membrane cellulari) e applicando anche una certa forza meccanica utilizzando un potter.

Si lascia ad incubare 5 minuti a temperatura ambiente, dopodichè si è aggiunto 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di sospensione agitando vigorosamente per 15 secondi e lasciando incubare per 2/3 minuti; si centrifuga a 11600g per 15 minuti in stanza fredda a 4°C. Dopo la centrifugazione si può osservare la formazione di 3 fasi: il pellet sul fondo contenente la miscela fenolo-cloroformio e detriti cellulari, un anello intermedio in cui è presente il DNA, e lo strato superiore che contiene l'RNA che dovrà essere trasferito in un'altra eppendorf. Si aggiungono 0.5 ml di alcool isopropilico, invertendo la provetta 2 volte e lasciando incubare la soluzione per 10 minuti nell'attesa che l'RNA precipiti.

Passato il tempo si centrifuga a 11600g per altri 10 minuti sempre a 4°C così da ottenere un pellet sul fondo dell'eppendorf che rappresenterà l'RNA totale. Si elimina molto attentamente, versando il surnatante, cioè l'isopropanolo, in una pezzuola, si aggiunge 1 ml di etanolo 75% / acqua D.E.P.C. e successivamente si centrifuga a 7400g per 5 minuti a 4°C. E' importante compiere le successive

operazioni in stanza fredda a 4°C: si procede a svuotare il surnatante prestando attenzione al pellet che tende a scendere, effettuando una centrifugata alla massima velocità in modo da eliminare anche l'ultimo residuo di alcol. Si lascia infine l'eppendorf aperta sotto cappa in modo che evapori tutto l'alcol; il pellet asciutto va risospeso in un volume che può variare da 40 a 100 µl di acqua D.E.P.C.. Porre infine in frigo a 4°C overnight in attesa della quantificazione spettrofotometrica.

### **Quantificazione spettrofotometrica**

Il giorno successivo porre in bagno termostatico a 55°C le eppendorf per 10 minuti per eliminare le eventuali strutture secondarie dell'RNA, passato il tempo mettere le eppendorf in ghiaccio in attesa della quantificazione. Normalmente si preparano delle diluizioni (solitamente 1:250 ma anche 1:500 in caso di campioni particolarmente concentrati) determinando così l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm specifiche rispettivamente per la quantificazione di acidi nucleici e proteine.

La legge di Lambert-Beer unita alla conoscenza della diluizione dell'estratto permette di risalire alla concentrazione di ssRNA: infatti sapendo che il coefficiente di estinzione molare "ε" per l'RNA è pari a 0.025 e il cammino ottico della cuvetta "l" è 1 cm, si applica la seguente relazione:

$A_{(\lambda)} = \epsilon \times C \times l$ ; dove  $A_{(\lambda)}$  è l'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda ed essendo noto che per ogni unità di D.O. (per  $\lambda = 260$  nm) corrispondono 40 µg/ml di ssRNA, si procede a ricavare la relazione finale cioè:

$$\text{Concentrazione ssRNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Fattore di diluizione} \times 40/1000$$

Il rapporto tra l'assorbanza determinata a 260 e quella a 280 nm dà indicazione se è presente contaminazione proteica: il rapporto accettabile dovrebbe essere compreso tra 1.6 e 2.0.

### **Elettroforesi qualitativa**

Dopo aver verificato la "purezza" dell'RNA per via spettrofotometrica ci si accerta che l'RNA sia sostanzialmente integro attraverso un'analisi a livello elettroforetico.

Per far ciò si ricorre ad un'elettroforesi in gel di agarosio/formaldeide all'1% di agarosio; l'aggiunta di formaldeide è utilizzata come agente denaturante per far sì che non si formino strutture secondarie dell'RNA durante il saggio.

Quindi si scioglie in microonde 0.1 g di agarosio e 7.5 ml di acqua D.E.P.C. ogni 10 ml di gel che si ha intenzione di ottenere: normalmente si utilizzano quantità tali da ottenere gel da 90 ml.

Una volta che la soluzione si è raffreddata sino alla temperatura di 65° C, si aggiungono 1ml di soluzione MOPS 10 X e 1.5 ml di formaldeide, agitando bene si versa nella vasca per elettroforesi e, una volta polimerizzato il gel (30/60 minuti), lo si ricopre con tampone MOPS 1 X.

La preparazione dei campioni segue il seguente iter:

in una eppendorf D.E.P.C. si aggiunge un volume pari a 5µg di RNA (volume che si ricava dalla concentrazione ottenuta con il metodo spettrofotometrico), il volume della MIX pari a 2 volte il volume dell'RNA calcolato in precedenza dove



la MIX è costituita da 1ml di formammide, 350 µl di formaldeide e 100 µl di MOPS 10 X.

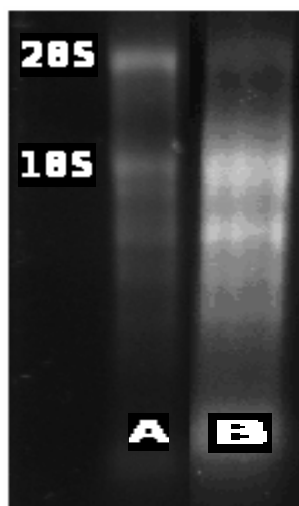
A questo punto si scalda in bagnetto termostatico a 70° C per 10 minuti le eppendorf e successivamente si aggiunge bromuro d'etidio (BrEt) secondo la formula  $\frac{(\text{volume MIX} + \text{volume RNA}) * 40}{100}$  e infine un volume di 2 µl di Dye

verde 6X contenente il blu di bromofenolo che è una molecola a basso PM e la sua migrazione permette di controllare il "fronte di corsa" del gel.

Si caricano i campioni nel gel (circa 12 µl per ogni pozzetto) si imposta un voltaggio di 100 mV e si aspetta infine che la corsa elettroforetica abbia fatto il proprio corso.

Importante sottolineare che la preparazione dei campioni e la loro corsa elettroforetica sono state eseguite sotto cappa provvista di filtri *HEPA* per la presenza di BrEt, composto mutageno che essendo un'intercalante nelle molecole degli acidi nucleici può essere utilizzato per individuare le bande di nostro interesse visto che se sottoposto ad una fonte di luce U.V. emette una forte fluorescenza.

Il risultato di questa analisi è riassunto dalla **Figura 3**:



a partire da sinistra si possono notare 2 bande corrispondenti rispettivamente agli rRNA 28S e 18S (fig. campione A) mentre nella parte destra si può notare un RNA degradato che presenta un tipico smear nella corsa (fig. campione B).

**Figura 3** Esempio di elettroforesi qualitativa in gel di agarosio/formaldeide.

## **RT-PCR**

La RT-PCR è una tecnica che consente di amplificare un cDNA partendo da un pool di RNA di un tipo cellulare. Il procedimento usato prevede 2 tappe principali:

- retrotrascrizione dell'RNA in cDNA.
- successiva amplificazione del cDNA ottenuto utilizzando primer specifici per la determinazione di messaggeri di nostro interesse.

La tecnica utilizza la presenza nell'mRNA degli eucarioti di una serie di polyA (da 80 a 250 residui di adenina) nell'estremità 3'; questa "coda" viene aggiunta in fase di maturazione dell'hnRNA (*Heterogeneous Nuclear RNA*).

Il polyA, caratteristico degli mRNA, utilizza l'oligo dT che risulta essere un filamento complementare ai residui di adenina funzionando come primer mettendo a disposizione un'estremità 3' – OH da cui una trascrittasi inversa (RT) riuscirà a sintetizzare i filamenti di DNA complementari (cDNA).

Il secondo e ultimo step è una PCR utilizzata per amplificare il cDNA di interesse utilizzando primer specifici.

### **Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA**

In questo passaggio si è utilizzato una quantità in  $\mu\text{l}$  corrispondente ad 1  $\mu\text{g}$  di RNA, 1  $\mu\text{l}$  di primers Anchor oligo dt (500 ng/ml) (*Invitrogen*) e acqua D.E.P.C. fino ad un volume di 5  $\mu\text{l}$  il tutto posto in eppendorf thin walled 0.2 ml; si pone il tutto in bagnetto termostatico a 70°C per 5 minuti affinché avvenga la denaturazione dell'RNA e subito dopo si mette in ghiaccio. Poi si allestisce una mix con le seguenti quantità in modo da arrivare a 14  $\mu\text{l}$  di campione (da moltiplicare per il numero di campioni + 1):

1. 6.1  $\mu\text{l}$  di acqua D.E.P.C.
2. 4  $\mu\text{l}$  di *Improm-II Reaction Buffer 5X*
3. 2.4  $\mu\text{l}$  di *MgCl<sub>2</sub> 25mM*
4. 1  $\mu\text{l}$  di *dNTPs 10mM*
5. 0.5  $\mu\text{l}$  di *RNAsin Ribonuclease Inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ )*

Dopo aver opportunamente agitato si aliquotano 14  $\mu\text{l}$  per ogni eppendorf thin walled da 0.2 ml e per ultimo si aggiunge 1  $\mu\text{l}$  dell'enzima di reazione Improm-II per ogni campione, tranne nei campioni utilizzati come "controllo" che ne sono privi.

Il programma utilizzato nel termociclatore è il seguente:

- 25 °C per 5 minuti
- 42 °C per 60 minuti
- 70 °C per 15 minuti

I prodotti della retrotrascrizione si possono conservare in freezer a -20 °C per mesi senza che si degradino.

### Amplificazione del cDNA ottenuto

La tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction) richiede primers specifici progettati per le proteine di interesse, nel nostro caso DMT1 e actina (servirà per normalizzare i risultati).

I primers sono stati creati utilizzando il software “Primer 3” (home page [primer3.sourceforge.net](http://primer3.sourceforge.net)); la sequenza di base è stata ricavata dalla banca dati “GeneBank” dove è stata ricercata la proteina di interesse e in particolare la sequenza nucleotidica.

I primers sono stati scelti utilizzando i seguenti criteri:

- Le temperature di melting e annealing sono state mantenute simili per tutti i primers in modo da uniformare le condizioni sperimentali e per far questo si è agito sulla % GC che è buona norma mantenere tra il 40% e il 60%.
- La lunghezza dell’innesco è solitamente compresa tra le 18 e 25 basi infatti è stata scelta come lunghezza massima 20.
- I primers sono stati progettati in modo che si legassero per complementarità al filamento da amplificare, altresì tenendo anche conto che non devono formare dimeri tra di loro, non devono generare forcine al loro interno oppure nelle regioni terminali e devono riconoscere una regione unica all’interno del messaggero.

Di seguito ho riportato sequenze e temperature di melting dei primers utilizzati:

Actina	Sequenza	T <sub>m</sub> (°C)
<i>forward</i>	5' - CCCATTGAACACGGCATTG - 3'	72.50
<i>reverse</i>	5' - GGTACGACCAGAGGCATACA - 3'	72.10

DMT1	Sequenza	T <sub>m</sub> (°C)
<i>forward</i>	5' - CCTGTGGCTAATGGTGGAGT - 3'	59.99
<i>reverse</i>	5' - TGTGAGGGCCATGATAGTGA - 3'	60.07

Una volta ottenuti i primers si procede con l’amplificazione vera e propria utilizzando l’enzima *Taq polimerasi*, quest’ultimo ricavato da un ceppo di *E. coli* che esprime la polimerasi di *Thermus aquaticus*, enzima con attività polimerasica 5'--> 3' e privo di quella esonucleasica 3'--> 5' (non esercita quindi il proofreading).

A questo punto si procede ad allestire 2 mix con le seguenti quantità (da moltiplicare per il numero di campioni):

1. 38 µl acqua sterile
2. 5 µl di *Taq buffer (Biolabs) 10X*
3. 1.5 µl di *MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Biolabs)*
4. 1 µl di *dNTPs 10 mM*
5. 1.5 µl di primer DMT-1 *forward* (e nell’altra mix la stessa quantità ma di primer ACT *forward*)
6. 1.5 µl di primer DMT-1 *reverse* (e nell’altra mix la stessa quantità ma di primer ACT *reverse*)

A questo punto si agitano bene le eppendorf con dentro le mix e si aliquotano in ogni thin walled da 0.2 ml, preparata precedentemente, 48.5 µl di mix. Si aggiunge 1 µl di cDNA del campione di nostro interesse e successivamente 0.5 µl di *Taq polimerasi* fino ad arrivare ad un volume totale di 50 µl. Si imposta il termociclatore con il seguente programma:

- 95 °C per 1 minuto
    - ✓ Denaturazione iniziale degli stampi
  - 95 °C per 30 secondi
    - ✓ Denaturazione
  - 55° C per 30 secondi
    - ✓ Annealing
  - 72° C per 30 secondi
    - ✓ Allungamento
- } Steps ripetuti per 35 cicli

Al 30° ciclo si effettua un prelievo di 11 µl che verrà utilizzato successivamente per la corsa elettroforetica per verificare la eventuale saturazione dei prodotti di reazione.

Gli amplificati sono subito sottoposti ad elettroforesi quantitativa in gel di agarosio al 2 %.

### **Elettroforesi quantitativa**

L'espressione dei prodotti di RT-PCR è stata valutata grazie ad un'elettroforesi al 2% in agarosio dal momento che l'obiettivo finale era quello di discriminare prodotti di un centinaio di basi; per far ciò si è utilizzato un marker semi-quantitativo per il DNA, precisamente *DNA ladder 100bp della Promega*®.

I campioni erano così allestiti:

- 11µl di amplificato
- 1µl di *Dye 6X* utilizzato come colorante di corsa

Il marker così utilizzato:

- 11µl di marker diluito 1:10
- 1µl di *Dye 6X*

Per sciogliere l'agarosio si è usato tampone *TAE 1X* e lo stesso è utilizzato anche come buffer di corsa.

La tensione applicata è di 100 mV ed a fine corsa si è stato immerso il gel in una soluzione di EtBr (20µl di EtBr [10 mg/ml] in 100 ml di TAE 1X) per 20/30 minuti.

Le bande sono state rilevate grazie ad un transilluminatore UV e le immagini elaborate utilizzando il software *Quantity One*® *1-D Analysis Software*.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il lavoro che ho svolto durante il periodo di tirocinio è inserito all'interno di un progetto di ricerca molto più ampio, finalizzato a studiare il ruolo dello Zn nei confronti di eventuali danni causati da un accumulo di Cu, come anche del Fe, all'interno dell'organismo.

L'accumularsi, infatti di questi metalli, a lungo andare può portare alla produzione di ROS con conseguente danno ossidativo.

In particolare mi sono concentrato sull'espressione di una determinata proteina, DMT-1, coinvolta nell'omeostasi di questi metalli, in particolare del Fe.

Per far ciò si è studiata la sua espressione, estraendo dapprima l'RNA dai tessuti, retrotrascrivendo poi l'RNA in cDNA ed infine amplificando la regione di interesse grazie a dei primer specifici.

### **Analisi integrità campioni estratti**

I campioni estratti dal rene di partenza sono stati analizzati tramite spettrometria ed elettroforesi qualitativa in modo da osservare se il materiale genetico di partenza fosse o meno degradato.

Alcuni campioni analizzati si sono rilevati degradati, confermato questo da diverse estrazioni, per cui non sono stati utilizzati per le analisi successive.

I campioni estratti e analizzati con elettroforesi quantitativa sono risultati essere 11 ed è su questi campioni che sono basati i miei risultati.

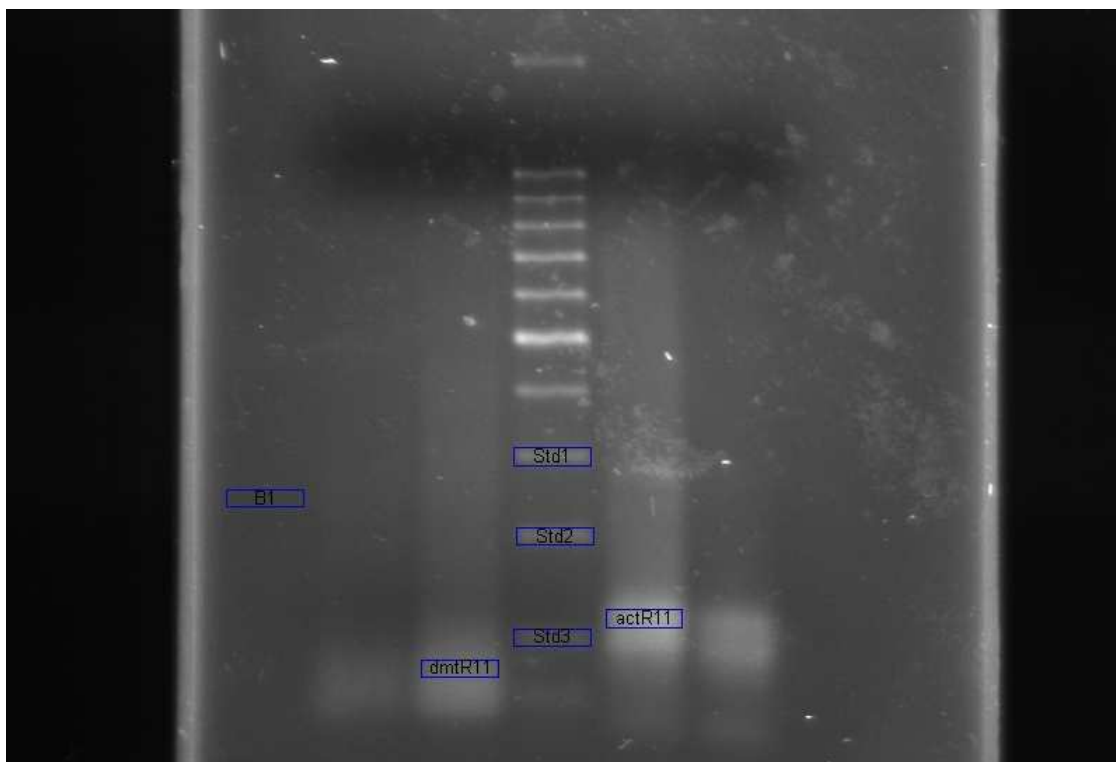
### **Espressione genica**

L'espressione genica è stata misurata in base alla quantità di mRNA presente nei campioni analizzati dopo esser stato retrotrasritto in cDNA e amplificato mediante PCR.

L'elettroforesi, come detto in precedenza, è stata condotta in presenza anche di un marker con peso molecolare noto. Il marker utilizzato copriva un range del peso molecolare da 100 a 1500 paia di basi (bp) circa, permettendo di ricavare la massa in (ng) dei diversi amplificati in modo da fornire una quantità relativa dell'espressione genica dell'RNA estratto.

Assieme ai messaggeri di nostro interesse è stato amplificato anche il messaggero della  $\beta$ -actina. Questo rappresenta un cosiddetto gene housekeeping, cioè un gene che si esprime costitutivamente ad un livello relativamente stabile in molte condizioni conosciute e generalmente si assume che le diverse condizioni sperimentali non influiscano sulla sua espressione. La  $\beta$ -actina quindi è servita per normalizzare i risultati dell'elettroforesi.

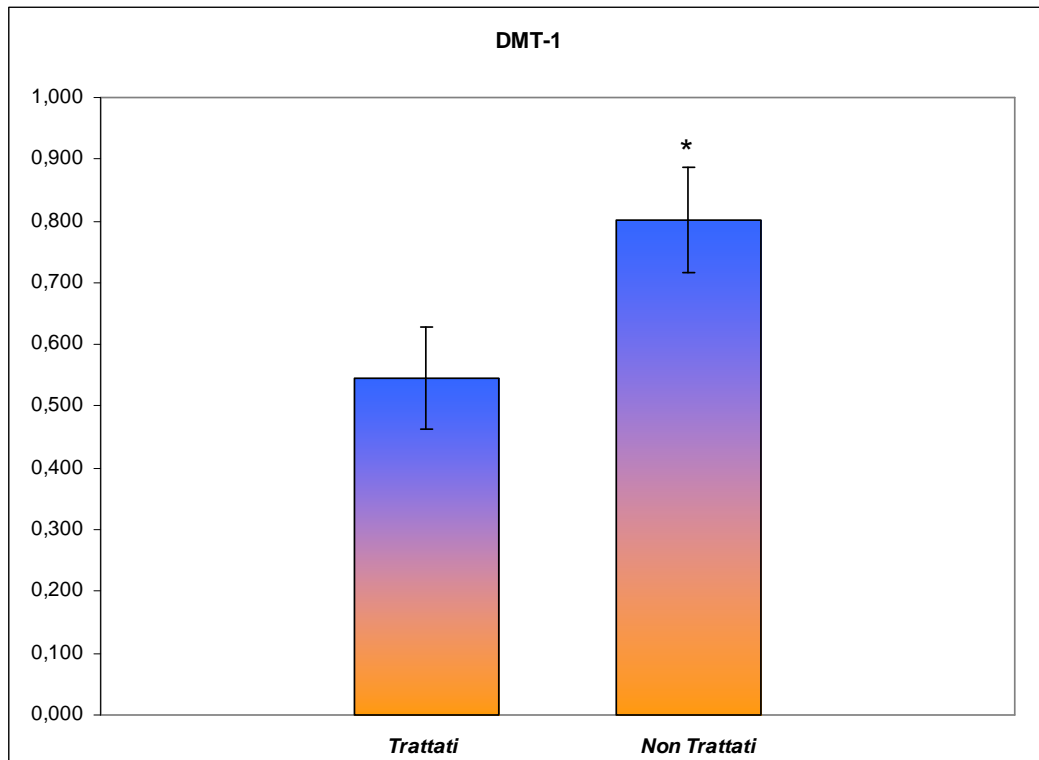
Ecco come si presentava un gel elettroforetico dopo l'analisi con il programma bio-informatico Quantity One® 1-D Analysis Software.



**Figura 4** Gel elettroforetico con (da sinistra verso destra) le bande di DMT-1, il marker e la  $\beta$ -actina.

Di seguito sono riassunti i dati normalizzati relativi a DMT-1 nel gruppo dei ratti trattati e non trattati [i valori ottenuti sono espressi in unità arbitrarie (u.a.)]:

n° campione	u.a. mRNA
<i>Trattati</i>	
7	0.551
8	0.506
9	0.567
10	0.545
11	0.676
12	0.400
13	0.573
<b>Media</b>	0.545
<b>DS</b>	0.082
<i>Non trattati</i>	
19	0.707
22	0.900
23	0.842
28	0.759
<b>Media</b>	0.802
<b>DS</b>	0.086

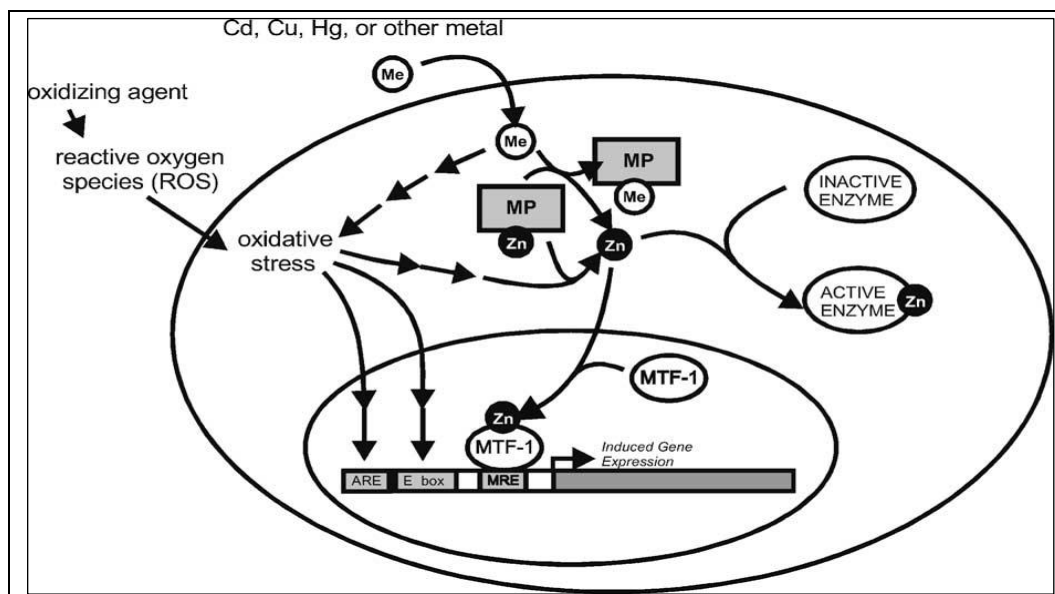


**Grafico 1** Livello del messaggero per DMT-1 nei due gruppi di ratti analizzati. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.05$ )

L'espressione genica di DMT-1 è risultata statisticamente inferiore nel gruppo dei ratti trattati con lo Zn con un p value dello 0.004. (vedi **grafico 1**)

La causa di questo andamento può essere spiegata introducendo il fattore MTF-1 (*Metal-responsive transcription factor 1*), fattore che direttamente è coinvolto nell'omeostasi di Zn e nella protezione contro l'accumulo di metalli pesanti tossici. (Formigari *et al.*, 2008).

Come si può vedere dalla **figura 5**, MTF-1, una volta legato lo Zn, si lega al DNA e in particolare ad una sequenza denominata MRE (*Metal Responsive Element*) presente nella regione promotoriale di molti geni tra cui i geni per le MT, per la  $\gamma$ -glutamyl cisteina sintetasi, per i trasportatori di Zn tra cui ZnT-1, per enzimi deputati alla detossificazione della cellula come SOD, e infine anche per DMT-1. Studi precedenti (Santon *et al.*, 2002) su MT, GSH ed enzimi con azione antiossidante come SOD hanno rilevato un aumento della loro espressione o della loro attività enzimatica in seguito a trattamento con Zn.



**Figura 5** Tratto da (Farzana Haq et al., 2003). MTF-1 è attivato dallo Zn; qui si può notare come metalli pesanti in alte concentrazioni come Cd, Cu, Hg, possano indurre il rilascio di Zn da MP (metalloregulatory protein), quest'ultime si pensa possano mediare la disponibilità dello Zn in risposta ad alte concentrazioni di metalli nella cellula.

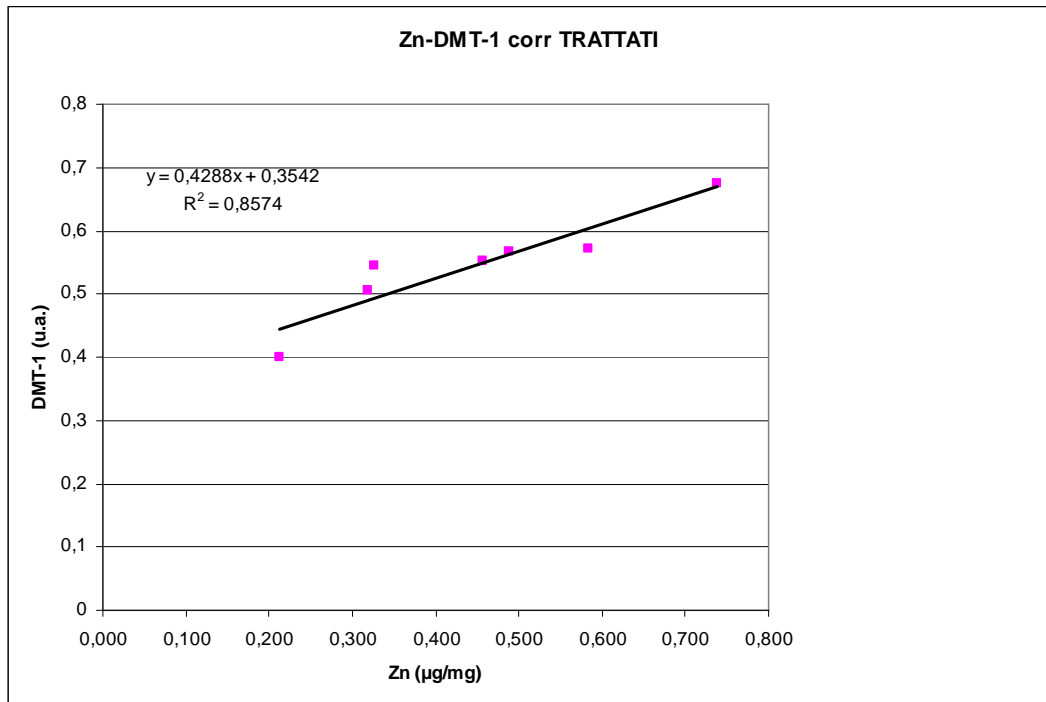
A seguito di queste premesse si può concludere che la somministrazione di Zn, nel modello ratto LEC, e nei pazienti affetti da malattia di Wilson, ha come effetto quello di aumentare l'attività di MTF-1, e di conseguenza, l'espressione di alcune proteine quali MT, del trasportatore ZnT-1, SOD, e GSH. Il fatto che l'espressione di DMT-1 diminuisca in seguito al trattamento con Zn, si potrebbe spiegare supponendo che MTF-1 prediliga, in certe condizioni, indurre la sintesi di alcune proteine piuttosto che di altre. In sostanza aumenta la concentrazione delle proteine chelanti (MT e GSH) e l'espressione di un trasportatore in uscita dello Zn. In pratica, il contenuto dello Zn è aumentato in seguito al trattamento, quindi la proteina trasportatrice in entrata viene come bloccata. Inoltre DMT-1 è un trasportatore di cationi divalenti non troppo specifico, quindi la sua diminuzione corrisponderebbe anche con una diminuzione nel contenuto di altri cationi, quali Cu e Fe, come in realtà succede.

I ratti di cui si sono analizzati i tessuti erano stati utilizzati in esperimenti precedenti (Santon et al. 2002) nei quali, tra gli altri valori, si era determinata la concentrazione di vari metalli traccia a livello sia dell'omogenato in toto che del supernatante, in particolare di Zn, Cu e Fe.

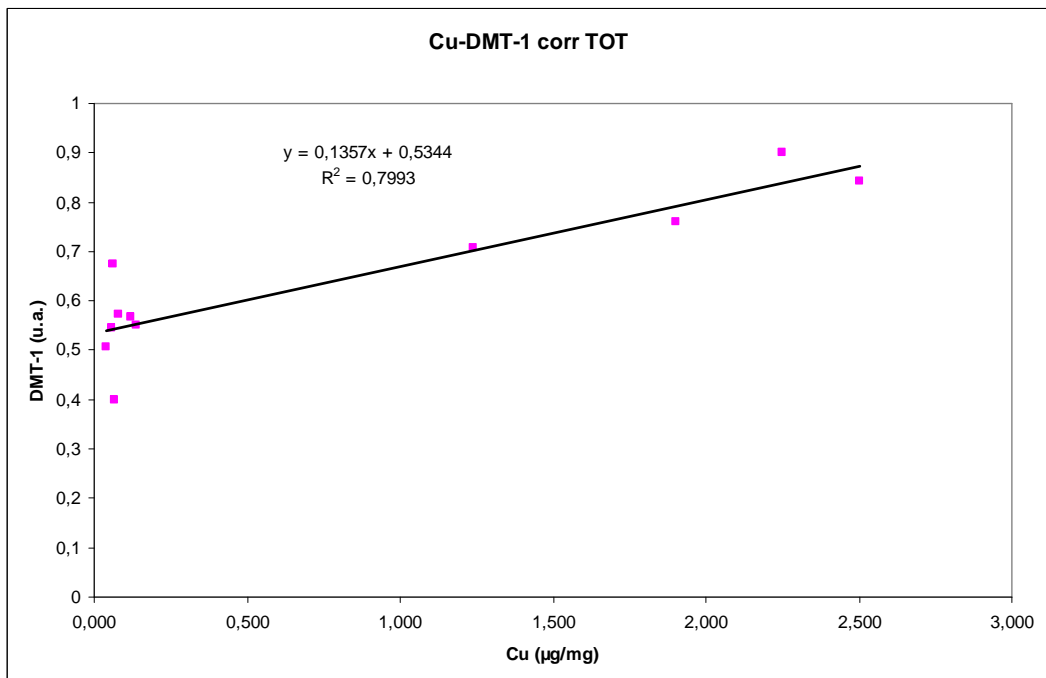
Utilizzando questi dati ed elaborandoli con un programma statistico (Primer®) si è determinata la correlazione esistente tra l'espressione di DMT-1 e la concentrazione dei diversi metalli sia nei 2 gruppi separatamente che insieme.

Non tutte le correlazioni calcolate sono risultate statisticamente significative; qui di seguito riporto i grafici delle correlazioni tra DMT-1 e, rispettivamente, Zn (nei trattati), Cu e Fe (nel gruppo trattati e non trattati presi complessivamente). Le concentrazioni dei diversi metalli erano state determinate nel supernatante ed espresse in µg/mg di proteine totali.

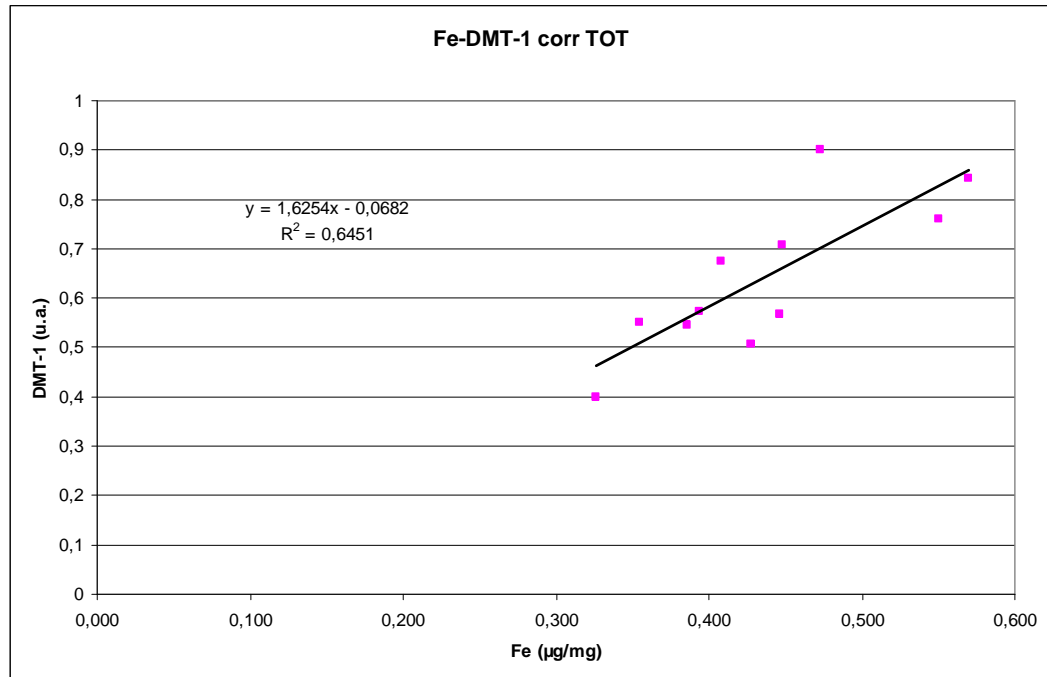




**Grafico 2** *Correlazione tra Zn e DMT-1 (p value=0.003 r=0.926)*



**Grafico 3** *Correlazione tra Cu e DMT-1 (p value=0.002 r=0.89)*



**Grafico 4** Correlazione tra Fe e DMT-1 ( $p\text{ value}=0.003$   $r=0.803$ )

La correlazione nel **grafico 2** appare buona con valore  $r$  pari a 0.926, un  $p$  value nell'ordine di 0.003; non è risultata alcuna correlazione invece tra i dati relativi ai non trattati dove il  $p$  value è ben al di sopra della soglia di significatività.

Questi dati possono indicare che lo Zn sia effettivamente trasportato da DMT-1.

È presente una correlazione lineare positiva anche tra l'espressione di DMT1 e il contenuto di Cu e Fe (**grafico 3 e 4**): in questi casi, però, la correlazione comprende tutti i ratti considerati, prescindendo dal gruppo di appartenenza. Questi dati indicherebbero quindi che DMT-1 sia coinvolto non solo nel trasporto del Fe, ma anche del Cu.

Analizzando inoltre le concentrazioni dei metalli presenti nei ratti LEC (*Santon et al., 2002*), la concentrazione di Fe e Cu è maggiore nei ratti non trattati se messi a confronto con i trattati.

La mancanza del trattamento si traduce in un accumulo di Cu e Fe che, a lungo andare, possono portare a fenomeni di stress ossidativi.

Il risultato relativo al Fe è in accordo con quello ottenuto da *Trinder et al., (2002)* in cui si dimostrava che, in presenza di un sovraccarico di Fe, si aveva un aumento della concentrazione cellulare di DMT-1 a livello epatico. Altri dati in letteratura sono discordi in quanto suggeriscono un'inibizione del livello d'espressione di DMT-1 conseguente ad un aumento della concentrazione cellulare di Fe secondo un meccanismo a feedback negativo (*Arredondo et al., 2006*).

Lo Zn è anche in grado di interferire con l'assorbimento del Cu e del Fe; infatti se presente in elevate concentrazioni nell'intestino, può competere con il Cu per l'assorbimento a livello dell'orletto a spazzola (*Oestreicher e Cousins, 1985*) e con il Fe nel meccanismo di assorbimento attuato da DMT-1 (*Formigari et al., 2008*), riducendo l'assorbimento di entrambi i metalli.

Lo Zn inoltre, legandosi a MTF-1 come già detto induce la produzione di MT nelle cellule della mucosa gastrointestinale con il risultato finale di intrappolare il rame negli enterociti, in una forma non tossica per l'organismo.

Le MT infatti sono indotte principalmente dallo Zn che risulta essere un induttore più forte rispetto al Cu, ma una volta prodotte le MT risultano avere una più alta affinità verso il Cu rispetto allo Zn; quest'ultimo è sostituito dal Cu e potrà legarsi ad altri fattori MTF-1 stimolando la produzione di ulteriori MT.

Può essere interessante confrontare i risultati relativi al rene con quelli relativi al fegato, altro organo studiato nei ratti LEC. Precedenti lavori condotti seguendo lo stesso protocollo usato da me durante il tirocinio hanno portato a conclusioni simili alle sopra citate.

L'espressione di DMT-1 nel gruppo dei ratti non trattati è risultata più marcata se confrontata con il gruppo dei trattati dove non si è avuta espressione; si può ipotizzare che tale mancanza di espressione, nel gruppo dei trattati, sia una risposta fisiologica indotta dal trattamento con Zn per ridurre l'assorbimento del Cu.

Tale ipotesi è avvalorata dal fatto che la concentrazione del Cu a livello epatico nel gruppo dei ratti trattati ( $1.6 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) subisce un forte calo se confrontata con il gruppo dei non trattati ( $2.5 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). (*Santon et al., 2002*).

Alcune considerazioni possono essere fatte sull'andamento di Cu, Zn, Fe, MT e GSH nel fegato: anche qui si è visto come la concentrazione dello Zn nei trattati è aumentata come anche la concentrazione delle MT e GSH mentre Cu e Fe hanno presentato un decremento di concentrazione (*Santon et al., 2002*).

Quindi i valori relativi al fegato rispecchiano fondamentalmente i risultati relativi al rene.

Il risultato finale del trattamento per gavage con glucosata di Zn nei ratti LEC è quindi quello di diminuire la concentrazione di Fe e Cu nei gruppi dei ratti trattati; molto probabilmente questo effetto può essere spiegato da un meccanismo di competizione tra Zn e Fe e tra Zn e Cu per l'assorbimento a livello intestinale.

Questi dati potrebbero essere ampliati effettuando un'analisi dell'espressione proteica attraverso Western Blotting di DMT-1; inoltre ulteriori esperimenti su trasportatori di Zn potrebbero essere oggetto di studi futuri per cogliere meglio il meccanismo d'azione dello Zn nel contrastare il manifestarsi del morbo di Wilson.

## BIBLIOGRAFIA

- **Arredando M, Martinez R, Nun̄ez MT, Ruz M, Olivares M, (2006).** Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol.Res.*, 39:95-102.
- **Brewer GJ, Yuzbasiyan Gurkan V, (1992).** Wilson disease. *Medicine (Baltimore) Vol.*, 71:139-164.
- **Mackenzie B, Hediger MA (2003).** SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Arch - Eur J Physiol (2004)* 447:571–579
- **Giroux EL, Henkin RI, (2003).** Competition for zinc among serum albumin and amino acids. *Bioch. Et Biophys. Acta (BBA) Vol.*, 273:64-72.
- **Farzana H, Mahoney M , Koropatnick J (2003).** Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533 (2003) 211–226
- **Ferenci P, (2003).** Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19:157-165.
- **Formigari A, Alberton P, Cantale V, De Nadal V, Feltrin M, Ferronato S, Santon A, Schiavon L, Irato P, (2008).** Relationship between metal transcription factor-1 and zinc in resistance to metals producine free radicalks. *Curr. Chem. Biol.*, 2:256-266.
- **Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubein M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S, Garrick LM., (2002).** DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals*, 16:41-54.
- **Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA, (1997).** Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *NatureVol.*, 388:482-488.
- **Halliwell B, Gutteridge JMC (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitin metals and disease. *Bikochem. J. Vol.*, 219:1-14.
- **Lönnerdal B, (1989).** Intestinal absorbtion of zinc. *Zinc in human biology di Verlag Springer – London : ed. Millis C.F.*
- **Harada M, (2002).** Wilson disease. *Med. Electron Microsc* 35:61-66.
- **Masuda R, Yoshida MC, Sasaki M, Dempo K, Mori M, (1988).** Hight susceptibility to hepatocellular carcinoma development in LEC rats with ereditary hepatitis. *Jpn. J. Cancer Res. Vol.*, 79:828-835.
- **Oestreicher P, Cousins RJ, (1985).** Copper and zinc absorbtion in the rat: mechanism of mutual antagonism. *Nutr.*, 115:159-166.
- **Sandström B, (1992).** Dose dependence of zinc and manganese absorbtion in man. *Proceeding of the Nutrition Society* 51:211-218.
- **Santon A, Irato P, Medici V, D'Incà R, Albergoni V, Sturniolo GC, (2002).** Effect and possible role of Zn treatment in LEC rats, an animal model of Wilson's disease. *Bioch. Bioph. Acta*, 1637:91-97.
- **Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK (2002).** Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut*, 51:290–295

- **Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW, (1994).** The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat.Genet.* 4:541-545.