

UNIVERSITA' DI SALERNO
(DIPARTIMENTO DI CHIMICA E BIOLOGIA)

e

UNIVERSITA' DELLA BASILICATA
(DIPARTIMENTO DI SCIENZE)

Dottorato in Chimica – XXXI Ciclo (BIO/10 – Biochimica)

Tesi di Dottorato in

***“La proteina correlata allo Pseudoxantoma Elasticum
regola il sistema purinergico.***

Nuove informazioni sul trasportatore ABCC6”

Dottorando: Fabio Martinelli

Matricola: 8800100015

Coordinatore del Dottorato:
Prof. Gaetano Guerra

Tutor:
Prof. Faustino Bisaccia

Co-Tutor:
Prof. Magnus Monné

Anno Accademico: 2017-2018

Riassunto:

I trasportatori ABC (ATP-binding cassette) sono la più grande superfamiglia delle proteine di membrana presenti in tutti gli organismi e sono particolarmente coinvolte nel trasporto di nutrienti e farmaci. Tra questi trasportatori troviamo l'ABCC6, appartenente alla sottofamiglia C, che è un trasportatore ATP-dipendente principalmente presente nella membrana plasmatica basolaterale delle cellule epatiche e renali. Le mutazioni del gene *ABCC6* sono associate allo Pseudoxantoma Elasticum (PXE), una malattia autosomica recessiva caratterizzata da processi di mineralizzazione ectopica progressiva a livello della pelle, della retina e della parete vascolare. È stato riportato che la PXE è causata nei tessuti periferici da ridotti livelli di PP_i , un forte inibitore dei processi di mineralizzazione. In effetti, la somministrazione di PP_i riduce gli effetti della PXE, e pertanto il PP_i è considerato un farmaco efficace. È noto che l'over-espressione dell'ABCC6 nelle cellule HEK293 determina un efflusso di ATP e che quest'ultimo viene convertito in AMP e PP_i dalla proteina ENPP1. Successivamente, l'AMP viene trasformato in adenosina e P_i dalla proteina CD73; quindi la proteina ABCC6 potrebbe essere coinvolta sia nel fornire di adenosina extracellulare che nel regolare il sistema purinergico. Precedenti studi hanno dimostrato che nelle cellule HepG2 silenziate per l'*ABCC6* si ritrova una disregolazione di alcuni geni coinvolti nei processi di mineralizzazione. Abbiamo condotto esperimenti per valutare il meccanismo attraverso cui l'ABCC6 è in grado di promuovere questa disregolazione genica. A tale scopo l'attività di trasporto dell'ABCC6 è stata inibita con un inibitore aspecifico dei trasportatori ABC. I principali risultati ottenuti nelle cellule HepG2 sono parzialmente simili a quelli ottenuti nelle cellule HepG2 silenziate per l'*ABCC6*. Gli effetti maggiori sono stati ottenuti sull'*NT5E* e sull'ABCC6. Come inibitore è stato usato il probenecid per ridurre l'attività di trasporto dell'ABCC6 nelle cellule HEK293. Al fine di confermare che l'effetto osservato è strettamente correlato all'inibizione del trasporto di ATP, e non alla presenza di probenecid, le cellule HepG2 sono state anche trattate con adenosina e ATP. I risultati mostrano che, in presenza di 10 e 100 μM di adenosina e di 50 e 500 μM di ATP, gli effetti del probenecid sono revertiti. Al fine di confermare gli effetti del probenecid sull'attività di trasporto, in queste cellule è stata testata la quercetina, un altro inibitore degli ABC; i dati confermano quelli precedentemente ottenuti con il probenecid sull'espressione di *ABCC6* e *NT5E*. Nelle cellule HepG2 trattate con doxorubicina, la cui presenza aumenta

l'espressione di *ABCC6*, abbiamo osservato un aumento proporzionale dell'*NT5E*. Esperimenti con il probenecid, l'adenosina e l'ATP sono stati eseguiti anche in cellule che esprimono l'*ABCC6* in modo diverso. I risultati mostrano che in presenza di probenecid nelle cellule MDA-MB-231 non c'è alcun effetto, mentre nelle cellule HEK293 e HuH-7 ci sono scarsi effetti. L'effetto del probenecid si ottiene soltanto nelle cellule che over-esprimono l'*ABCC6*; in tutte queste cellule l'aggiunta di adenosina e ATP migliora l'espressione del CD73. È stato anche analizzato il fenotipo cellulare dopo il trattamento con il probenecid. Considerando il ruolo che ricopre il CD73 nei processi di migrazione cellulare, i tests di motilità hanno confermato che le cellule HepG2 migrano più lentamente dopo questo trattamento.