



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO IN BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

DOTTORATO IN BIOCHIMICA E BIOFISICA

XXI[^] CICLO

**REGOLAZIONE DELLA TIROSIN-FOSFORILAZIONE DELLA
PROTEINA BANDA 3 ERITROCITARIA**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Supervisore : Ch.mo Prof. Giulio Clari

Correlatore : Dott. ssa Luciana Bordin

Dottorando : Florina Ion Popa

Abstract

In human erythrocytes, Syk kinase is a key enzyme that triggers membrane protein band 3 Tyr-phosphorylation (Tyr-P). This enzyme, also called p72^{Syk}, undergoes significant proteolysis in the absence of protease inhibitors, giving rise to p36^{Syk} formation, which induces much greater band 3 Tyr-P than p72^{Syk}. Besides, proteolysed Syk is capable to prepare membranes for further phosphorylation by p72^{Syk}: when membranes are pre-phosphorylated by p36^{Syk}, subsequent p72^{Syk}-catalysed phosphorylation is much higher than that obtained with non-pretreated membranes. Since proteolytic enzymes are present in isolated membranes and p72^{Syk} binds closely to the cytoskeleton, probably to the spanning domain of the anchored band 3, this binding could allow the activation of the enzyme by proteolysis.

In human erythrocytes, the P-Tyr level of proteins, mainly transmembrane band 3, is closely controlled by the antithetic activity of Tyr-protein kinases and phosphatases, resulting in a dephosphorylated state. Only after particular stimuli, as with oxidizing agents, diamide or pervanadate, or thiol alkylating compound, N-ethyl maleimide (NEM), Tyr-phosphorylation of band 3 can be triggered, due to the inhibition of Tyr-phosphatase action and the reorganisation of erythrocyte membrane. SHP-1 is a SH2-domain containing protein Tyr-phosphatase expressed in hematopoietic cell lines. We demonstrate that, in human erythrocytes, SHP-1 is present in membranes from resting cells, but in 5% of the protein amount. This amount increases up to three fold following NEM treatment of intact cells, whereas diamide and pervanadate do not alter the normal protein location. In addition, SHP-1 translocation from cytosol to membrane is not affected by band 3 P-Tyr level and localizes into the cytoskeletal compartment. Band 3 is the target of SHP-1, which dephosphorylates Tyr residues 8, 21 and 904.

From the cytosol of the red blood cells, through a DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography followed by a Sephadex G-75 column, we purified an enzyme with phosphatasic activity on *pNPP*. Its characterization revealed that the enzyme is an acid phosphatase with a low molecular weight, and western blotting followed by immunostaining with the appropriate antibody confirmed that the enzyme was the Low M_r PTPase. The purified enzyme was able to dephosphorylate the four Tyr residues of band 3: 8, 21, 359 and 904, thus inducing for the first time the total dephosphorylation of this protein.

Dapsone is a drug used in the treatment of leprosy, malaria or AIDS-related *Pneumocystis* pneumonia. N-hydroxylation of dapsone (DDS) leads to the formation of the toxic hydroxylamines responsible for the clinical methaemoglobinaemia associated with DDS therapy. In addition, the drug has been associated with shortening of the erythrocyte lifespan, with resulting potential clinical consequences such as anaemia and morbidity in areas where DDS is used to treat malaria.

We studied how DDS and/or its hydroxylamine (DDS-NHOH) induce erythrocyte membrane alterations leading to premature cell removal. Results indicate that the hydroxylamine, but not dapsone, is able to trigger Tyr-phosphorylation of membrane proteins, mainly of band 3. DDS-NHOH-induced band 3 Tyr-P peaked in 30' (at 0.3 mM) and was already completely reversed after 45' of incubation. However, when analysed for the enzymes involved in this process, Syk and SHP-2, membranes revealed dose- and time-dependent recruitment of both enzymes. Band 3 Tyr-phosphorylation is not due to an imbalance between enzymatic activities, since both Tyr-kinase and phosphatase activities were promptly inhibited by DDS-NHOH in both dose- and time-dependent manners, but more probably by a favoured substrate-kinase interaction.

The band 3 Tyr-phosphorylation process is very useful in detecting early DDS-NHOH-induced alterations. The membrane modifications continue, with the increase in DDS-NHOH incubation time, leading to aggregation of band 3. Band 3 high molecular weight aggregates (HMWA) location in the first 30' of incubation was in the Triton-soluble fraction of the RBCs' membranes, while prolonging the incubation time, not only the content of band 3 HMWA further increased, but complete membrane reorganisation also occurred, the cytoskeleton containing almost all the band 3 HMWA complexes formed.

When we analysed membranes from erythrocytes subjected to dose- and time-dependent DDS-NHOH treatments in the presence of autologous plasma, immunostaining with anti-human IgG revealed net enhancement of the autologous antibodies content. Since removal of human erythrocytes is mediated by antibody recognition, this can explain the shortening of the erythrocyte lifespan seen when dapsone is used clinically.

Riassunto

Negli eritrociti umani la tirosin chinasi Syk è un enzima chiave nella tirosin fosforilazione della proteina di membrana banda 3. Questo enzima, chiamato anche $p72^{\text{Syk}}$, va incontro ad una significativa proteolisi in assenza di inibitori proteasici, portando alla formazione di $p36^{\text{Syk}}$, capace di indurre con maggiore efficienza la tirosin fosforilazione della banda 3 rispetto al $p72^{\text{Syk}}$. Inoltre, la fosforilazione innescata dal $p36^{\text{Syk}}$ prepara le membrane per la successiva fosforilazione da parte dell'oloenzima $p72^{\text{Syk}}$. Infatti quando le membrane sono pre-fosforilate con $p36^{\text{Syk}}$, la successiva fosforilazione catalizzata dal $p72^{\text{Syk}}$ è maggiore rispetto a quella ottenuta in assenza della pre-fosforilazione. Poiché gli enzimi proteolitici sono presenti nelle membrane isolate e il $p72^{\text{Syk}}$ si lega al citoscheletro della cellula, probabilmente al dominio transmembrana della banda 3 ancorata a questa frazione della membrana, questo legame potrebbe permettere l'attivazione dell'enzima $p72^{\text{Syk}}$ attraverso la sua proteolisi.

Negli eritrociti umani il livello di tirosin fosforilazione delle proteine, soprattutto della proteina transmembrana banda 3, è strettamente controllato dall'attività antitetica delle protein tirosin chinasi e fosfatasi, risultando in condizioni basali in uno stato di quasi completa defosforilazione. Solo stimoli particolari, come agenti ossidanti, diamide o pervanadato, o composti alchilanti, N-etilen maleimide (NEM), possono innescare la tirosin fosforilazione della banda 3, dovuta l'inibizione delle tirosin fosfatasi. SHP-1 è una protein tirosin fosfatasi contenente due domini SH2 espressa nelle cellule ematopoietiche. Noi dimostriamo che, negli eritrociti umani, SHP-1 è presente nelle membrane delle cellule in condizioni basali, ma solo il 5% della quantità totale dell'enzima. Questa percentuale incrementa fino a tre volte dopo il trattamento della cellula con NEM, mentre diamide e pervanadato, pur inducendo la tirosin fosforilazione della banda 3, non alterano la localizzazione basale dell'enzima. Ciò indica che la traslocazione della SHP-1 dal citoplasma alle membrane non dipende dalla tirosin fosforilazione della banda 3. Abbiamo dimostrato che la banda 3 è un substrato per l'enzima e che esso defosforila i residui tirosinici 8, 21 e 904 della proteina.

Dal citoplasma del globulo rosso abbiamo purificato un'enzima con attività fosfatase su para-nitro fenilfosfato ($pNPP$) attraverso una cromatografia a scambio ionico su DEAE-Sepharose, seguita da una gel filtrazione su una colonna G-75 Sephadex. La caratterizzazione dell'enzima purificato ha portato alla sua identificazione con la fosfatasi acida a basso peso molecolare. Tale identificazione è stata confermata dal western blotting, seguito dalla immunorivelazione con l'anticorpo appropriato. La fosfatasi acida a basso peso molecolare purificata è in grado di defosforilare i quattro siti fosfo tirosinici della banda 3: 8, 21, 359 e 904. In questo modo si è ottenuta per la prima volta la totale defosforilazione della proteina.

Dapsone è un farmaco utilizzato nel trattamento della lebbra, malaria o pneumonia dovuta a *Pneumocystis* associata all' AIDS. La sua N-idrossilazione porta alla formazione di idrossilamine tossiche responsabili della metaemoglobinemia associata al trattamento con dapsone. Inoltre, il farmaco è stato correlato alla riduzione della vita media dell'eritrocita, ottenendo come risultato conseguenze cliniche come anemia e morbidità nelle aree dove il dapsone è utilizzato per trattare la malaria.

Noi abbiamo studiato il processo attraverso il quale il dapsone ed il suo metabolita idrossilamindapsone (DDS-NHOH) inducono alterazioni a livello della membrana eritrocitaria che portano alla rimozione prematura dell'eritrocita. I risultati indicano che DDS-NHOH, ma non il dapsone, è capace di innescare la tirosin fosforilazione delle proteine di membrana, soprattutto della banda 3. L'indotta tirosin fosforilazione raggiunge un massimo in 30' di trattamento (con 0.3 mM) poi essa comincia a calare e dopo 45' dall'inizio del processo sparisce completamente. Il reclutamento alla membrana degli enzimi coinvolti in questo processo, Syk e SHP-2, avviene in maniera dose e tempo dipendente, per entrambi gli enzimi. Inoltre la tirosin fosforilazione della banda 3 non è dovuta ad uno sbilanciamento tra le attività enzimatiche, dal momento che sia l'attività tirosin chinasi che quella tirosin fosfatasi sono inibite dal DDS-NHOH in maniera dose e tempo dipendente, ma più probabilmente è dovuta ad una favorevole interazione substrato-chinasi.

Le modifiche che avvengono nella membrana indotte da DDS-NHOH continuano anche dopo che la fosforilazione è annullata (dopo 45') e portano all'aggregazione della banda 3. La localizzazione degli aggregati ad alto peso molecolare di banda 3 (HMWA) nei primi 30' di incubazione è prevalentemente nella frazione solubile in Triton X-100. Con il prolungamento del tempo d'incubazione si ha non solo l'ulteriore incremento della quantità di aggregati, ma anche un loro definitivo spostamento nel citoscheletro della membrana eritrocitaria. Questo è un indizio di una completa riorganizzazione della membrana.

L'analisi delle membrane ottenute da eritrociti incubati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH a vari tempi d'incubazione in presenza del plasma autologo ha rivelato un netto aumento nel contenuto di anticorpi autologhi. Poiché la rimozione dell'eritrocita è mediata dal riconoscimento da parte dei macrofagi degli anticorpi autologhi, la presenza di quest'ultimi sulla membrana del globulo rosso trattato con DDS-NHOH spiega la riduzione della vita media degli eritrociti nei pazienti trattati con dapsone.

INTRODUZIONE

Eritrocita umano

1. Caratteristiche generali

Gli eritrociti sono gli elementi figurati del sangue più abbondanti, essendo presenti in numero di circa

5 milioni/mm³ nell'uomo e 4.5 milioni/mm³ nella donna. Hanno una caratteristica forma biconcava, con un diametro relativamente costante tra 6.5-7.5 µm.

Essi derivano da cellule regolarmente nucleate, gli eritroblasti, presenti nel midollo osseo che, nel maturare, acquisiscono la capacità di sintetizzare emoglobina. Dopo aver perso alcuni organelli citoplasmatici ed il nucleo, vengono immessi nel circolo sanguigno dove, per breve tempo, mantengono alcuni mitocondri e ribosomi per completare la sintesi di emoglobina. Dopo 1-2 giorni da reticulociti si trasformano definitivamente in eritrociti maturi, completamente privi di organelli.

Il loro ruolo principale è quello di trasportare ossigeno dai polmoni ai tessuti, grazie alla presenza di emoglobina, e quindi di favorire il ritorno dell'anidride carbonica ai polmoni: questa funzione è facilitata dalla loro forma biconcava che permette una maggiore superficie per gli scambi gassosi.

Il metabolismo energetico degli eritrociti è limitato dalla mancanza di organelli endocellulari. La produzione di ATP e NAD(P)H è assicurata dalla glicolisi e dallo shunt degli esosomonofosfati, i cui enzimi si trovano solubili nel citoplasma o legati in forma inattiva a proteine integrali di membrana, quali la banda 3. Queste vie metaboliche sono necessarie principalmente per mantenere la forma biconcava della cellula e la funzionalità della stessa, così garantendo la specifica concentrazione cationica intracellulare e lo stato ridotto dell'emoglobina, dei gruppi tiolici degli enzimi e delle proteine di membrana.

Una delle principali proprietà fisiche degli eritrociti è la loro deformabilità. Grazie ad essa i globuli rossi sono in grado di attraversare i capillari anche di 3 µm di diametro. L'incapacità degli eritrociti maturi di produrre fosfolipidi di membrana determina l'impossibilità di far fronte alle possibili alterazioni della membrana, che si possono manifestare con irrigidimento della stessa. La mancanza di deformabilità sembra essere una delle cause che portano alla rimozione dei globuli rossi a livello degli organi emopoietici, in particolare la milza. La loro vita media è di circa 120 giorni.

2. Struttura

Gli eritrociti sono cellule prive di nucleo e di altri organelli citoplasmatici (reticolo endoteliale, mitocondri, lisosomi) essendo costituiti solo da una membrana plasmatica che racchiude il citoplasma. Al loro interno è contenuta principalmente emoglobina, una eme porfirina oligomerica che occupa il 35 % del citoplasma, altre proteine, soprattutto gli enzimi della glicolisi (il 10 %) ed acqua.

2.1. Membrana plasmatica

La membrana plasmatica dei globuli rossi, grazie alla facilità con cui può essere ottenuta, è la membrana cellulare più studiata e la meglio conosciuta. La mancanza di nucleo e di altre membrane intracitoplasmatiche permettono di ottenere solo membrane plasmatiche semplicemente attraverso la lisi degli eritrociti in una soluzione ipotonica. Le cellule rispondono allo shock osmotico assumendo acqua e gonfiandosi. Con l'eccessivo aumento del volume della cellula, la membrana plasmatica diventa porosa permettendo la fuoriuscita del citoplasma e preservando pressoché intatta la membrana plasmatica, detta anche "ombra". Questo processo è conosciuto sotto il nome di emolisi.

La membrana è costituita da un doppio strato lipidico e da un sottostante citoscheletro proteico. La sua particolare organizzazione ed i rapporti presenti tra proteine di membrana e citoscheletro sono responsabili della forma e funzionalità dell'eritrocita [Bennett, 1990]. Il bilayer lipidico è principalmente costituito da fosfolipidi; questi sono diversamente distribuiti tra la superficie esterna, in cui sono presenti soprattutto sfingomieline e fosfatidilcolina, e quella citoplasmatica, dove invece sono localizzati fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositolo. Questi ultimi si sono rivelati di notevole importanza non solo per il ruolo che svolgono come precursori di secondi messaggeri (diacilglicerolo (DAG) e inositolotrifosfato (IP₃)) [Hideo et al., 1990], ma pure per la loro capacità di modulare l'aggancio di alcuni enzimi alla membrane [Brockman e Anderson, 1991] e di alcune proteine di membrana quali la glicoforina e la proteina 4.1 [Anderson e Marchesi, 1985]. Il cambiamento della disposizione della fosfatidilserina dalla parte interna a quella esterna del bilayer è considerata da alcuni autori come marker di invecchiamento cellulare [Schroit et.al., 1985].

Le proteine della membrana eritrocitaria si dividono in integrali e citoscheletriche.

2.1.1. Le proteine integrali

Queste proteine sono costituite da una parte idrofobica che attraversa la membrana, una parte idrofilica esposta verso l'esterno, che può legare catene glucidiche, ed un'altra parte idrofilica

esposta verso il citoplasma. Le proteine integrali della membrana eritrocitaria sono rappresentate dalla glicoforina e dalla proteina banda 3.

Glicoforina è una piccola proteina transmembrana costituita da 131 residui aminoacidici, che presenta una regione idrofila N-terminale esposta all'esterno della cellula, una regione centrale idrofobica che attraversa la membrana e una regione C-terminale idrofila rivolta verso il citoplasma. La regione esposta verso il citoplasma permette l'ancoraggio del citoscheletro al bilayer lipidico.

Proteina banda 3

È la più abbondante proteina integrale della membrana eritrocitaria e costituisce circa il 25 % del totale delle proteine di membrana. Ha un peso molecolare di circa 95 KDa e può essere presente sotto forma di dimero o tetramero [Nakashima et al., 1981]. È composta da un dominio transmembrana e due domini citoplasmatici (Fig. 1).

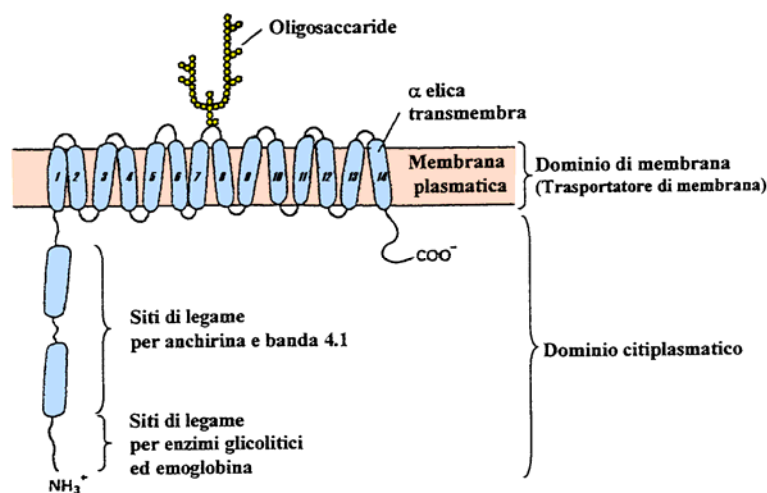


Fig. 1: Rappresentazione schematica della banda 3.

I tre domini della banda 3 possiedono ben precise e distinte funzioni cellulari [Groves e Tanner, 1999]:

- il dominio idrofobico transmembrana è una regione di circa 52 KDa, immersa nel doppio strato lipidico formando una serie di 12-14 ripiegamenti. Costituisce il canale anionico che consente lo scambio di Cl^- e HCO_3^- tra l'interno e l'esterno della cellula. Per questo motivo la banda 3 è chiamata anche lo scambiatore anionico o "anion exchanger 1" (AE 1). Questo dominio lega catene oligosaccaridiche contenenti i determinanti antigenici per i gruppi sanguinei;
- il dominio idrofilico N-terminale, di circa 43 KDa, comprende i residui aminoacidici 1-359 ed è chiamato il dominio citoplasmatico della banda 3 o "cytosolic domain of band 3" (cdb3).

Esso forma un peduncolo flessibile che si protende verso il citoplasma e serve come sito di ancoraggio per la struttura citoscheletrica e per alcune proteine citoplasmatiche come emoglobina o aldolasi;

- il dominio idrofilico C-terminale comprende gli ultimi 33 residui aminoacidici ed è rivolto anch'esso verso il lato citoplasmatico della membrana cellulare.

Negli eritrociti la banda 3 ha numerose funzioni biologiche. Come canale ionico gioca un ruolo cruciale nel trasporto dell'anidride carbonica (CO_2) dai tessuti ai polmoni (Fig. 2). Il CO_2 , che diffonde dai tessuti al sangue, entra negli eritrociti e viene rapidamente idratata ad acido carbonico (H_2CO_3) grazie all'enzima anidrasi carbonica. H_2CO_3 quindi si dissocia in H^+ e HCO_3^- e l'anione bicarbonato che si è formato esce quindi dall'eritrocita attraverso la banda 3, contro uno ione Cl^- che entra (105 coppie al secondo). Questo scambio elettroneutro permette l'eliminazione dell' HCO_3^- dagli eritrociti. A livello polmonare, invece, HCO_3^- rientra negli eritrociti (in cambio di Cl^-) dove si associa con H^+ dando H_2CO_3 . Il ricostituito H_2CO_3 , per mezzo dell'anidrasi carbonica, si dissocia a CO_2 , che viene eliminata, e H_2O . L'anidrasi carbonica è legata al dominio C-terminale idrofilico della banda 3 con un'interazione di tipo elettrostatico [Vince et al., 2000].

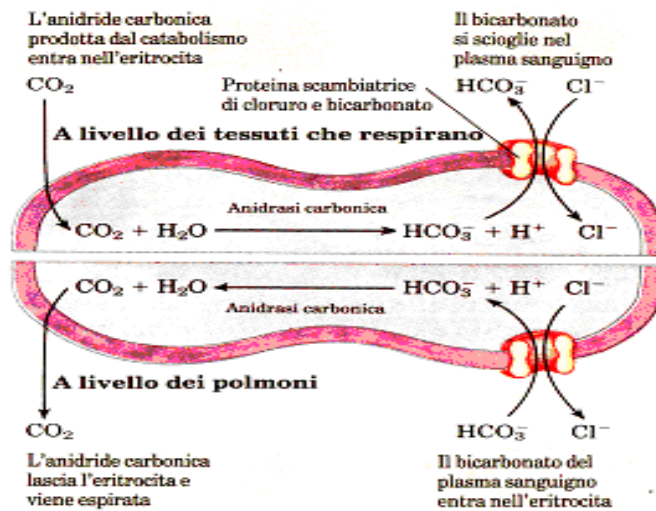


Fig. 2: Meccanismo di conversione dell'anidride carbonica a bicarbonato e suo trasporto attraverso l'eritrocita

Anche lo ione ossalato viene scambiato dagli eritrociti attraverso la banda 3. E' stato dimostrato come un'alterazione di questa proteina a livello dei residui Ser/Thr fosforilabili sia fondamentale nel regolare la velocità del flusso di ossalato tra l'interno e l'esterno dell'eritrocita. In alcuni casi, infatti, una velocità eccessiva nel trasporto dell'ossalato risulta alla base della nefrolitiasi ossalico calcica idiopatica dove l'eccesso di sale trovato a livello renale porta alla formazione delle

granulazioni presenti nel calcolo. La formazione di questi calcoli sembra essere correlata proprio ad una eccessiva permeabilità della banda 3 eritrocitaria all'anione [Baggio et al., 1993].

Come sito di ancoraggio, l'estremità N-terminale idrofilica (cdb3) può legare proteine citoscheletriche quali anchirina, banda 4.1 e 4.2, regolando così la forma eritrocitaria. Inoltre, la regione cdb3 può legare proteine citoplasmatiche come enzimi glicolitici [Low et al., 1993], che sono inattivi quando legati alla banda 3 e ritornano, invece, attivi quando rilasciati nel citoplasma. La banda 3 funge, quindi, anche da proteina regolatrice della glicolisi.

2.1.2. Proteine citoscheletriche

Le proteine citoscheletriche sono situate sulla superficie interna della membrana degli eritrociti (Fig. 3) e formano uno scheletro fibrillare aventi il ruolo di mantenere la forma dell'eritrocita.

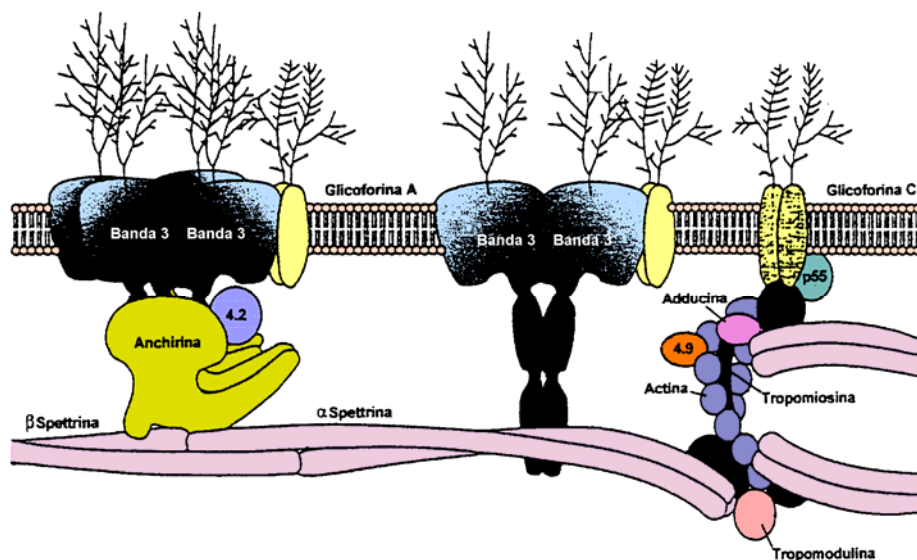


Fig. 3 : Organizzazione delle principali proteine del citoscheletro eritrocitario e le loro interazioni con la banda 3 e glicoforina.

Spettrina è la più abbondante fra le proteine citoscheletriche, rappresentando il 20-25 % del totale della massa proteica della membrana. E' una lunga molecola fibrosa costituita da due catene polipeptidiche, antiparallele, indicate come subunità α e subunità β . Assieme le subunità formano un dimero con una configurazione a doppia elica allungata alla quale si legano altre proteine citoscheletriche, tra cui l'anchirina [Morrow et al., 1980] e la banda 4.1 [Wolfe et al., 1980]. Queste ultime due proteine creano punti di ancoraggio tra la subunità β della spettina e le proteine integrali di membrana, quali la banda 3 e la glicoforina. I dimeri di spettina si associano in tetrameri [Liu et al., 1984], che formano assieme ad altre proteine come l'actina, la proteina 4.9, la 4.1, l'adducina e la tropomiosina, delle vere reti fibrillari che contribuiscono sia alla formazione che alla

stabilizzazione del citoscheletro. Tutto ciò assicura anche la sua deformabilità ed il mantenimento della forma biconcava dell'eritrocita.

Il citoscheletro consente agli eritrociti di mantenere la loro forma o di ripristinarla se viene temporaneamente alterata, ad esempio nel passaggio attraverso i capillari. Alcuni difetti ereditari nei componenti del citoscheletro possono manifestarsi come alterazioni di forma cellulare. La sferocitosi è una malattia ereditaria, caratterizzata da una specifica morfologia sferica dei globuli rossi, dovuta ad un'anomala organizzazione del citoscheletro che rende la membrana eritrocitaria fragile e soggetta a facile rottura.

Altra malattia ereditaria è l'anemia di Fanconi. Gli eritrociti dei malati presentano variazioni strutturali tipiche di acantocitosi causate, anche in questo caso, da un riarrangiamento citoscheletrico. Si osserva, inoltre, uno sbilancio ossidativo, caratterizzato da una eccessiva formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e/o una diminuzione nell'attività di enzimi antiossidanti (es. catalasi) con conseguenti lesioni subcellulari. Si ipotizza che questo alterato equilibrio dello stato ossidativo sia alla base delle modificazioni del legame tra actina e spettrina, due importanti proteine del citoscheletro, responsabili del mantenimento della forma delle cellule e della capacità della membrana di deformarsi [Malorni et al., 2000].

Varie osservazioni suggeriscono l'esistenza di interazioni tra il citoscheletro e le proteine integrali di membrana regolate dal contenuto di ATP all'interno del globulo rosso. Infatti, in seguito alla deplezione metabolica dell'ATP l'eritrocita diventa echinocita [Nakao et al., 1960]. Questo processo può essere reso reversibile ripristinando le riserve di glucosio degli eritrociti. I cambiamenti di forma riscontrati in seguito ad una variazione del contenuto di ATP sono stati correlati con una variazione del livello di fosforilazione di alcune importanti proteine costituenti il citoscheletro.

Tutti questi studi evidenziano che il citoscheletro eritrocitario è regolato in modo dinamico e reversibile.

3. Invecchiamento ed eliminazione

Alla fine della loro vita gli eritrociti sono rimossi dalla circolazione dai macrofagi. Poiché queste cellule mancano di nucleo non si può parlare di una classica apoptosi, ma di un meccanismo specifico che determina il loro riconoscimento da parte dei macrofagi.

3.1. Modello di rimozione attraverso l'aggregazione della banda 3

I globuli rossi invecchiati diventano più piccoli, più densi e più rigidi. Al loro interno alcuni enzimi perdono la loro attività e una grande parte dell'emoglobina viene denaturata e si lega alla superficie interna della membrana. Uno dei modelli proposti per la rimozione dell'eritrocita ha come punto centrale l'aggregazione della banda 3. L'aumentato stress ossidativo che si verifica verso la fine della vita del globulo rosso, porta alla formazione dei così detti emicromi o corpi di Heinz, condensazioni di emoglobina denaturata. Queste formazioni si legano alla proteina banda 3 determinando il legame incrociato dei domini citoplasmatici di due o più subunità di questa proteina. Si formano in questo modo aggregati di banda 3 che diventano antigeni per il riconoscimento anticorpale da parte degli anticorpi autologhi presenti nel circolo [Mannu et al., 1995]. Il legame degli anticorpi agli eritrociti invecchiati innescano la via del complemento che finisce con il riconoscimento da parte del macrofago e fagocitosi [Lutz et al., 1993].

Studi recenti [Pantaleo et al., 2008] evidenziano come il legame incrociato delle bande 3 è accompagnato anche dalla tirosin-fosforilazione della proteina (Fig. 4). Sembra che la fosforilazione della banda 3 provochi il suo sgancio dal citoscheletro sottostante e permetta così la formazione di aggregati che vengono in seguito riconosciuti dagli anticorpi circolanti.

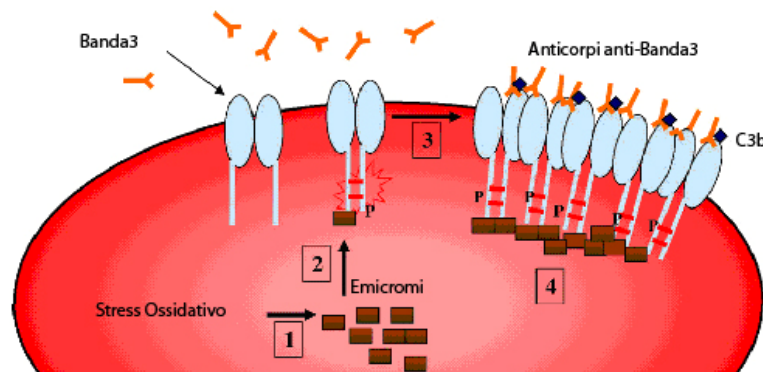


Fig. 4: Formazione di un antigene di riconoscimento dell'eritrocita invecchiato attraverso l'aggregazione della banda 3 [Pantaleo et al., 2008]

3.2. Modello di rimozione attraverso la proteolisi della banda 3

Per il riconoscimento anticorpale dell'eritrocita invecchiato sono necessari quindi cambiamenti conformazionali della banda 3. Tutto sommato l'identità molecolare di questi cambiamenti non è totalmente identificata, l'aggregazione delle bande 3 è una delle possibili ipotesi. E' noto che lo stress ossidativo al quale è sottoposto il globulo rosso nell'ultima parte della sua vita porti all'attivazione di alcuni enzimi proteolitici. Tale attivazione determina la rottura della banda 3 (Fig. 5) a livello del dominio transmembrana [Mandal et al., 2003; Schwarz-Ben Meir et al., 1991]. Questo provoca una modifica conformazionale della banda 3 che genera un neoantigene specifico dell'eritrocita invecchiato [Kay, 2004].

Ambedue i modelli presentati spiegano la perdita di interazione tra la membrana ed il citoscheletro, come indicato dalla aumentata mobilità della banda 3 e dalla diminuzione dei siti di affinità per l'anchirina. In tutti due i casi il processo ossidativo è un evento centrale, che determina la formazione degli emicromi, nel primo modello, e la sensibilità della banda 3 alla proteolisi, nel secondo modello.

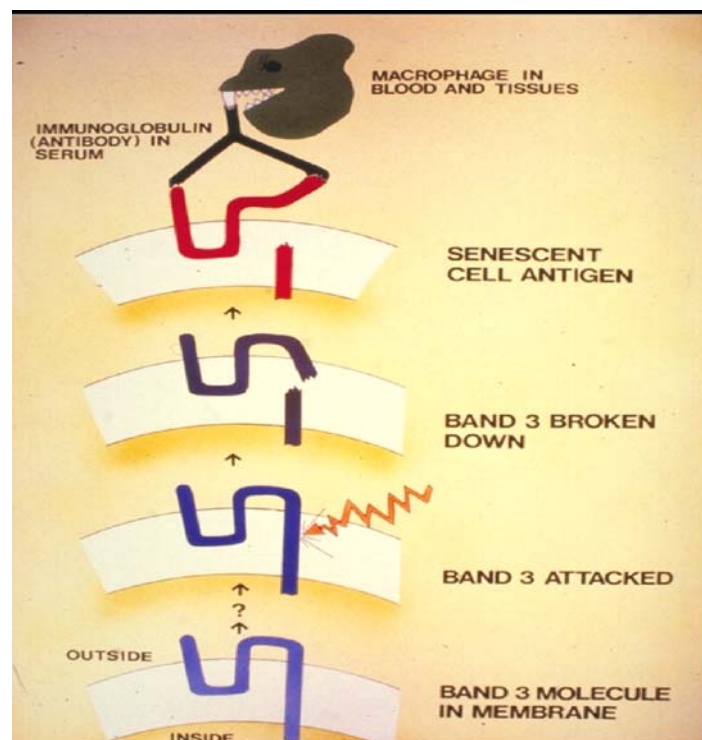


Fig. 5: Formazione di un antigene di riconoscimento dell'eritrocita invecchiato attraverso la proteolisi del dominio intracitoplasmatico della banda 3 [Bosman et al., 2005]

Processo di fosforilazione/defosforilazione della banda 3

1. Tirosin-fosforilazione della proteina banda 3

In condizioni basali la proteina banda 3 si presenta totalmente defosforilata a livello dei residui tirosinici e solo in condizioni particolari, come lo stress ossidativo od osmotico può diventare fosforilata. Detta fosforilazione avviene a livello del dominio intracitoplasmatico in quattro siti tirosinici. Tre dei quattro residui si trovano nella regione N-terminale, le tirosine 8, 21 e 359, e l'ultimo nella regione C-terminale, la tirosina 904 (Fig. 6).

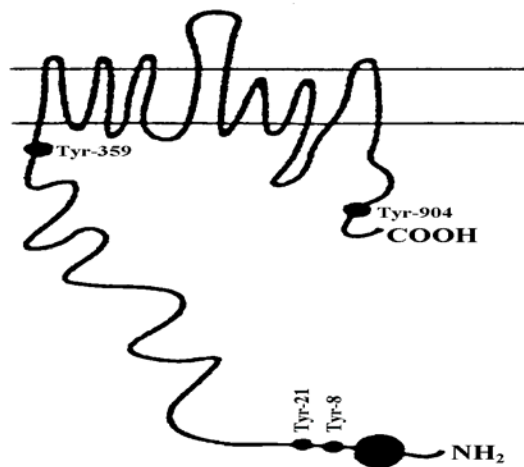


Fig. 6: Siti tirosinici fosforilabili della banda 3

La fosforilazione della banda 3 avviene secondo un meccanismo sequenziale (Fig. 7), ad opera di due tirosin-chinasi, la tirosin-chinasi Syk, appartenente alla famiglia Syk, e la tirosin-chinasi Lyn, appartenente alla famiglia Src. La chinasi Syk fosforila i residui tirosinici 8 e 21, creando siti di aggancio per i domini SH2 della seconda chinasi, Lyn, che una volta legata alla banda 3, fosforila gli altri due siti tirosinici, 359 e 904 [Brunati et al., 2000].

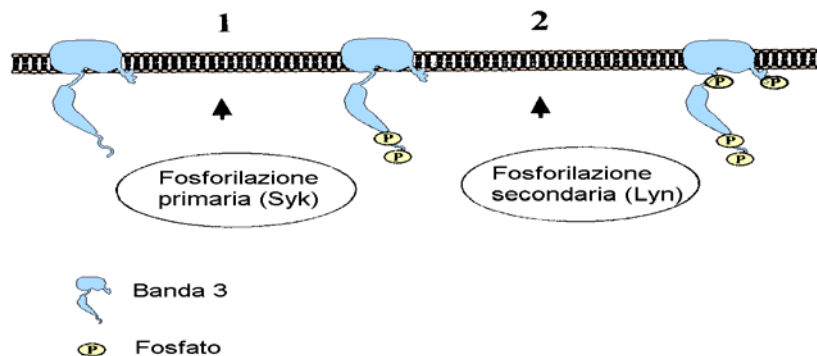


Fig. 7: Fosforilazione sequenziale della banda 3 [Brunati et al., 2000].

1.1. Le protein-chinasi eritrocitarie

Le protein chinasi sono considerate delle fosfotransferasi, ossia enzimi che catalizzano il trasferimento del gruppo fosforico terminale (γ) di un nucleotide, in genere dell' ATP, ad una proteina accettatrice.

Nell'eritrocita umano sono state identificate numerose protein-chinasi che si distinguono per la loro diversa specificità di substrato e distribuzione intracellulare.

Esistono 4 classi principali di chinasi:

- Protein-chinasi cAMP indipendenti o casein-chinasi;
- Protein-chinasi cAMP dipendenti;
- Protein-chinasi Ca^{2+} /fosfolipidi dipendenti;
- Protein-tirosin-chinasi.

Protein-tirosin-chinasi (PTK)

Le protein tirosin chinasi sono enzimi che catalizzano la fosforilazione dei residui tirosinici delle proteine e possono avere come substrato esogeno il Poly (Glu-Tyr). Tale classe comprende un gruppo di enzimi che contengono un dominio chinamico, altamente conservato, in grado di catalizzare il trasferimento, in modo specifico, del fosfato dall'ATP ai residui tirosinici di proteine substrato. Tale specificità non è ancora stata del tutto spiegata. Una caratteristica importante è comunque la presenza all'interno del dominio catalitico di una tasca contenente un residuo di prolina conservata in tutte le PTK. Tale residuo contribuisce all'interazione con l'anello fenolico della tirosina, mentre non favorisce il legame con residui di treonina e serina.

Le protein-chinasi specifiche per i residui tirosinici possono essere suddivise in due principali categorie: Tyr-chinasi recettoriali e Tyr-chinasi non recettoriali, a seconda che possano essere o meno, recettori per i fattori di crescita e differenziazione.

Alla classe di tirosin-chinasi non recettoriali appartengono le famiglie di chinasi Syk e Src, implicate nella fosforilazione della banda 3.

1.1.1. Le tirosin-chinasi della famiglia Syk

Gli enzimi appartenenti alla famiglia Syk sono tirosin-chinasi non recettoriali, presenti nella maggior parte delle cellule ematopoetiche: Limfociti B, T, macrofagi e globuli rossi, e sono mediatori chiave nella trasduzione dei segnali in queste cellule. Sono enzimi in grado di riconoscere le proteine bersaglio attraverso l'individuazione di sequenze dette ITAM (Immunoreceptor Tyrosin Based Activating Motif), aventi la sequenza aminoacidica: (Asp/Glu)-X-X-Tyr-X-X-Leu-(X)₆₋₈

Tyr-X-X-Leu, la quale, fosforilata a livello tirosinico, interagisce specificamente con i domini “Src homology” (SH2) di queste chinasi.

Alla famiglia Syk appartengono 2 diversi enzimi denominati ZAP-70 e Syk.

Struttura

Le chinasi della famiglia Syk condividono una struttura di base altamente conservata che, dall'estremità N-terminale alla C-terminale, prevede (Fig. 8):

- due domini SH2 (Src Homology 2), definiti N-SH2 e C-SH2, disposti in tandem; essi sono importanti per la regolazione dell'attività e per la localizzazione a livello della membrana plasmatica di queste chinasi;
- interdominio A, una regione di circa 50 aminoacidi tra N-SH2 e C-SH2. Essa rappresenta la regione maggiormente conservata nei due componenti della famiglia Syk, con una omologia di sequenza pari al 65 %; presenta una conformazione ad α -elica, importante per le interazioni proteina-proteina;
- interdominio B, una regione di connessione di circa 80-100 aminoacidi, localizzata tra C-SH2 e il dominio catalitico, importante nella regolazione dell'attività chinasi; essa fornisce residui fosfotirosinici per il legame di altre proteine aventi domini SH2, quali la PLC- γ , Vav e Cbl che possono essere substrati delle chinasi;
- un dominio catalitico, costituito da circa 300 aminoacidi, o dominio SH1; include i siti di legame per l'ATP e 2 siti di autofosforilazione. Questo dominio catalitico conferisce alle chinasi della famiglia Syk una spiccata specificità di sito;
- una coda C-terminale con funzione non ancora determinata.

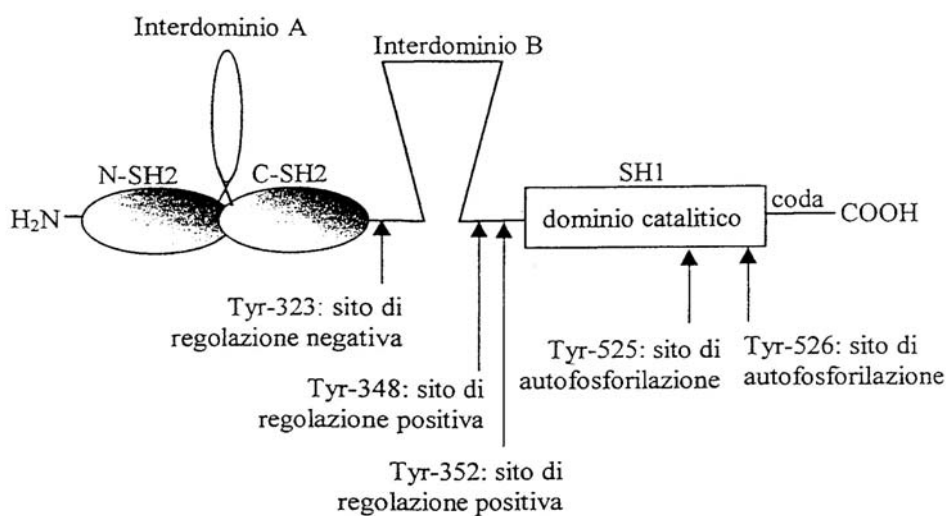


Fig. 8: Struttura schematica della tirosin-chinasi Syk

La chinasi Syk è presente in varie cellule e tessuti. E' stato dimostrato che la sua inibizione può essere benefica nel trattamento di malattie come l'artrite reumatoide [Bajpai et al., 2008], la rinite allergica e l'asma [Ulanova et al., 2005]. E' stata identificata sotto 2 distinte forme (Fig. 9):

- p72^{Syk}, che costituisce l'oloenzima;
- p36^{Syk}, considerato il prodotto proteolitico del p72^{Syk} [Zioncheck et al., 1988; Brunati et al., 1996], da cui deriva e di cui ne rappresenta il dominio catalitico, privo della sequenza tandem di SH2.

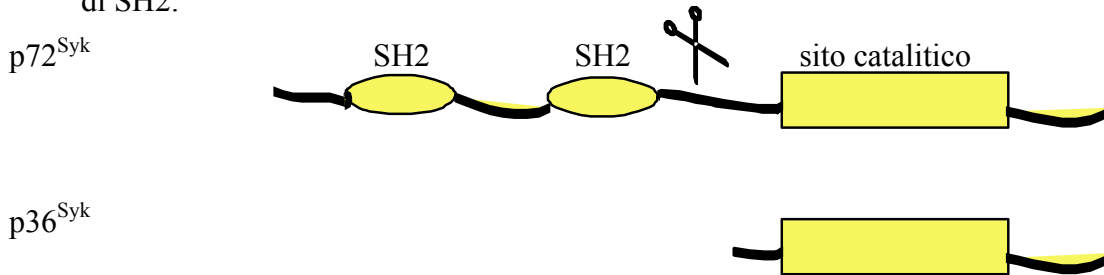


Fig. 9: p72^{Syk} e p36^{Syk}

L'attività enzimatica della tirosin chinasi Syk si esprime su diversi ligandi fisiologici noti, quali ad esempio:

- la regione citoplasmatica della banda 3 (cdb3), in particolare a livello delle tirosine 8 e 21 [Harrison et al., 1994];
- la regione citoplasmatica di immunorecettori quali TCR, BCR, FcεRI;
- enzimi quali PLC-γ, PLD, Vav-1 ed altri;
- componenti del citoscheletro quali la tubulina.

Diversi studi suggeriscono che l'attivazione delle chinasi Syk e ZAP-70 necessita della cooperazione della famiglia Src-chinasi [Sada et al., 2001]. In assenza di fosforilazione o di legame a domini ITAM, Syk adotta una conformazione inattiva. Di conseguenza al legame con domini P-ITAM, dopo l'autofosforilazione o la fosforilazione da parte della famiglia Src, l'attività chinasi è stimolata [Tsang et al., 2008].

1.1.2. Le tirosin-chinasi della famiglia Src

Storicamente uno dei primi geni ad essere clonati da *Sarcoma Virus* fu v-src. L'intera famiglia di tirosin-chinasi che condividono le principali caratteristiche strutturali con il prodotto di questo gene, pp60^{v-src}, prese il nome di Src.

Dieci sono i membri appartenenti a questa famiglia, così denominati: c-Src, c-Yes, Fyn, Yrk, c-Fgr, Lck, Lyn, Hck, Blk, Rak.

Questi enzimi sono espressi in vari tipi di cellule, alcuni invece sono presenti solo nelle linee emopoietiche (Lyn, Blk, Fgr e Lck). Nell'eritrocita umano sono presenti Lyn e Fyn.

Struttura

Partendo dall'estremità N-terminale all'estremità C-terminale, essi presentano (Fig. 10) [Brown e Cooper, 1996]:

- un dominio SH4 (Src Homology 4), comprendente i primi 16 residui aminoacidici, all'interno del quale è presente un residuo di glicina altamente conservato che viene facilmente miristilato [Buss e Sefton, 1985]. La miristilazione è importante nell'associazione di queste chinasi alle membrane cellulari [Resh, 1994]. Il legame con la membrana è stabilizzato poi da altri residui aminoacidici presenti nel dominio SH4;
- una regione di circa 40-70 aminoacidi, poco preservata tra i diversi membri della famiglia, che in alcuni casi consente il legame con proteine specifiche;
- un dominio SH3 in grado di interagire con sequenze ricche di prolina di altre proteine. I domini SH2 e SH3 sono coinvolti anche nella regolazione dell'attività chinasi della famiglia Src;
- un dominio SH2 costituito da una sequenza di 100 residui aminoacidici, che fu identificato per la prima volta all'interno della famiglia Src e successivamente in altre proteine. Esso ha la capacità di interagire con residui fosfotirosinici situati nella sequenza aminoacidica fosfotirosina-acido-acido-idrofobico;
- un dominio catalitico detto SH1, che catalizza la reazione di fosforilazione delle proteine substrato a livello dei residui tirosinici. Contiene la sequenza Gly-X-Gly-X-X-Gly, tipica del sito di legame dell'ATP di tutte le protein chinasi. E' conservata una lisina, in posizione 295 in Src, coinvolta nell'interazione durante la reazione fosforilativa e indispensabile per l'attività chinasi dell'enzima. Il residuo tirosinico 416 in Src è conservato in tutti i componenti della famiglia e la sua autofosforilazione stimola l'attività tirosin chinasi;
- una breve coda C-terminale di circa 15-17 aminoacidi che contiene un residuo tirosinico altamente conservato (Tyr-527 in Src). Questo residuo rappresenta il maggior sito di fosforilazione *in vivo* ed esercita un controllo negativo sull'attività chinasi.

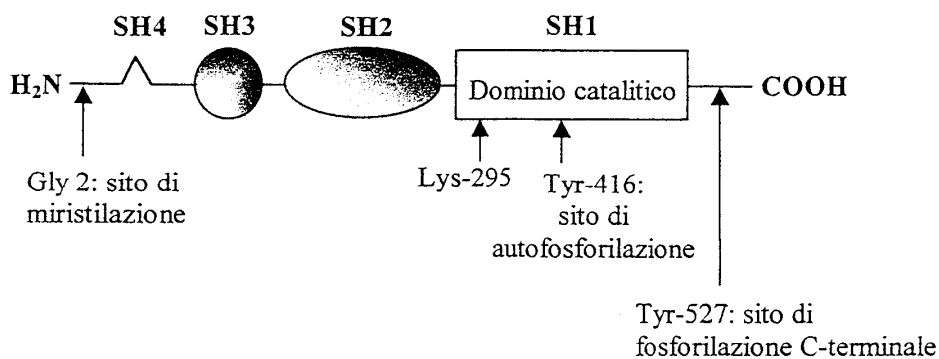


Fig. 10: Schema di struttura delle tirosin-chinasi della famiglia Src.

2. Defosforilazione della banda 3

2.1. Le protein fosfatasi

Mentre il compito delle protein-chinasi è quello di introdurre gruppi fosfato nelle proteine substrato, quello delle protein-fosfatasi, idrolizzando gli stessi gruppi fosforici, è quello di opporsi all'azione delle chinasi, determinando così la reversibilità del processo fosforilativo.

Le protein fosfatasi vengono suddivise in due gruppi, secondo la loro specificità di sito [Jia, 1997]:

- protein fosfatasi che defosforilano i siti serinici e treoninici [Cohen, 1989];
- protein fosfatasi che defosforilano i siti tirosinici [Tonks e Charbonneau 1989].

Protein tirosin fosfatasi

Le Protein Tirosin Fosfatasi (PTPasi) comprendono un'unica superfamiglia di enzimi che, pur avendo una limitata somiglianza tra loro, condividono un caratteristico dominio catalitico altamente conservato di circa 240-250 aminoacidi. Le PTPasi presentano anche una specifica regione variabile, localizzata alle estremità N- o C-terminale, responsabile delle diverse proprietà funzionali e strutturali di ognuna [Jia, 1997]. Nel dominio catalitico delle PTPasi è sempre presente un residuo di cisteina e uno di arginina separati da 5 aminoacidi, uno dei quali è l'acido aspartico: C(X)₅R. Per la catalisi è fondamentale la presenza del residuo di cisteina, il quale agisce come nucleofilo portando alla formazione dell'intermedio tiofosfato dell'enzima [Denu e Dixon, 1998]. La sostituzione della cisteina con serina porta ad una totale scomparsa dell'attività enzimatica. L'arginina, invece, dona un protone all'ossigeno della tirosina, contribuendo così alla scissione del legame fosfoestereo della proteina substrato. L'acido aspartico crea un ponte idrogeno con l'ossigeno del gruppo fosfato legato all'enzima, stabilizzando così la forma enzimatica intermedia [Zhang et al., 2000]. Mutazioni che portano alla sostituzione di uno di questi ultimi due residui, pur

non determinando la totale scomparsa dell'attività enzimatica, ne causano comunque una notevolissima riduzione [Jia, 1997].

Meccanismo di catalisi

La reazione fosfatasi (Fig. 11) si può riassumere in due stadi:

- I stadio: la cisteina presente nel sito catalitico dell'enzima compie un attacco nucleofilo al fosforo del gruppo fosfato, contenuto nella tirosina del substrato [Brautigan, 1992], determinandone il rilascio. La defosforilazione della proteina substrato è così realizzata, mentre l'enzima è stato trasformato in un tiofosfato [Walton e Dixon, 1993];
- II stadio: stadio lento della reazione in cui l'intermedio enzimatico viene attaccato da una molecola di acqua, determinando il ripristino dell'enzima ed il rilascio del fosfato inorganico nel solvente.

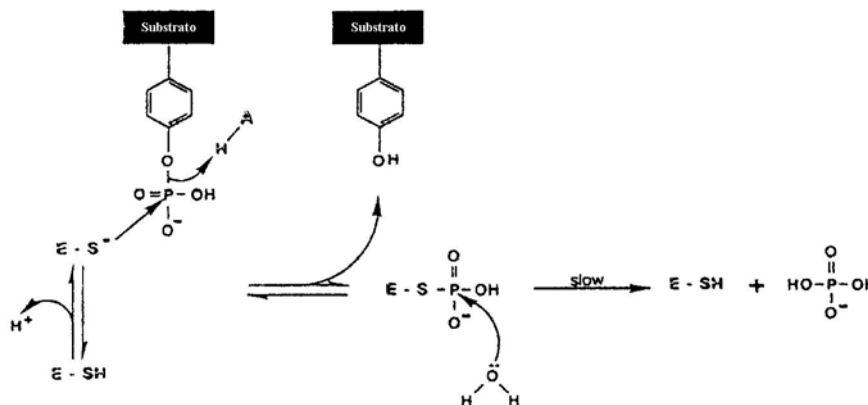


Fig. 11: Meccanismo di defosforilazione

Le PTPasi non sono inibite dall'acido okadaico, classico inibitore per le Ser/Thr fosfatasi, ma sono tutte sensibili al vanadato, che forma legami di tipo covalente con lo zolfo della cisteina nel sito catalitico. Inoltre l'attività di tutti questi enzimi è indipendente dalla presenza di ioni metallici.

Classificazione

La superfamiglia di PTPasi può essere ulteriormente suddivisa in 3 famiglie principali:

- Fosfatasi con specificità duale (capacità di idrolizzare fosfati monoesterici, sia dei residui serinici-treoninici che tirosinici);
- Tirosin-Fosfatasi propriamente dette;
- Fosfatasi a basso peso molecolare.

Tirosin-Fosfatasi propriamente dette

Tutti i membri di questa famiglia di fosfatasi condividono un dominio catalitico di circa 230 aminoacidi, dei quali 71 risultano altamente conservati.

Questa famiglia comprende:

- le tirosin fosfatasi recettoriali;
- le tirosin fosfatasi non recettoriali.

Le protein tirosin fosfatasi non recettoriali o intracellulari contengono frequentemente domini non catalitici, che possono influenzare la loro localizzazione cellulare. Contengono un residuo tirosinico altamente conservato, che fa parte di una sequenza particolare – KRNY – (residui 43-46), definita “sottodominio di riconoscimento della fosfotirosina”. Tra i domini non catalitici si trovano: i domini SH2, SH3, sequenze ricche di prolina, motivi citoscheletrici e sequenze idrofobiche.

2.1.1 Le fosfatasi contenenti domini SH2 (Fig. 12) costituiscono una sottoclasse particolare di tirosin-fosfatasi non-recettoriali. A questa sottoclasse appartengono le fosfatasi SHP-1 e SHP-2. Il tandem di domini SH2 riconosce proteine contenenti tirosine fosforilate. Tali domini permettono il legame tra il substrato fosforilato e l'enzima che agisce promuovendone la defosforilazione.



Fig. 12: Struttura delle tirosin-fosfatasi contenenti domini SH2 (SHP-1 e SHP-2)

Tirosin-fosfatasi SHP-2

SHP-2 è una fosfatasi largamente espressa, presente in molte cellule ematopoietiche, anche nel citoplasma del globulo rosso. Essa è costituita da :

- due domini SH2 adiacenti, posti all'estremità N-terminale;
- un dominio catalitico posto all'estremità C-terminale, che contiene due siti conservati tirosin fosforilabili;
- un dominio C-terminale ricco di proline, che può interagire con proteine aventi un dominio SH3.

I domini SH2 legano, specificatamente, residui fosfotirosinici all'interno di un motivo bersaglio di sequenza aminoacidica (I/V/L/S)XYXX(L/V), comunemente chiamato ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Inibitory Motif). Esso presenta in posizione -2 e +3, rispetto ai residui tirosin fosforilati, un aminoacido idrofobico. Questo riconoscimento determina l'attivazione delle

fosfatasi. Entrambi gli SH2 sono stati visti legare le sequenze ITIM, ma pare che l'SH2 all'estremità N-terminale abbia molto probabilmente anche un ruolo nella regolazione dell'attività della stessa SHP-2.

La fosfatasi SHP-2 è la PTP più studiata ed il meccanismo di attivazione di tale enzima è stato identificato grazie alla determinazione della struttura proteica [Denu e Dixon, 1998].

Possiamo riconoscere due forme riferibili alla SHP-2, note come forma "aperta" e forma "chiusa" [Huyer e Alexander, 1999]. Quando la protein-fosfatasi non è legata ad un substrato si trova nella conformazione chiusa, in cui il dominio SH2 all'estremità N-terminale interagisce direttamente, per un'estesa regione, con il dominio catalitico inibendo l'accesso al sito attivo [Denu e Dixon, 1998]. Questa interazione sta alla base della bassa attività catalitica della SHP-2 non legata ad alcun substrato.

L'SH2 posto verso l'estremità C-terminale, al contrario, crea poche interazioni con il sito catalitico, ma determina una maggiore specificità di legame al substrato, posizionando l'enzima in maniera corretta [Tamir et al., 2000].

In quasi tutti i casi la fosfatasi SHP-2 ha un ruolo di segnale positivo, attivando il segnale. Attraverso la defosforilazione di uno o più siti specifici, SHP-2 può determinare l'allontanamento di un segnale negativo oppure può agire per attivare direttamente una specifica proteina fosfotirosinica defosforilandola. L'unica famiglia conosciuta per essere attivata da una defosforilazione è la famiglia delle PTKs [VanVactor et al., 1998].

E' stata messa in evidenza la fosforilazione di due residui tirosinici (542 e 580) situati nella regione C-terminale della fosfatasi SHP-2 e sono state inoltre proposte due funzioni per questo processo di fosforilazione:

1. adattatore nel reclutamento di proteine come Grb2 o SHIP, attraverso i loro domini SH2 [Bennett et al., 1994];
2. regolazione dell'attività fosfatasica. Sembra che la fosforilazione dei due siti stimoli l'attività fosfatasica [Feng et al., 1993].

Uno dei substrati della fosfatasi SHP-2 è la proteina banda 3., che viene defosforilata dalla fosfatasi attraverso il meccanismo descritto nella figura 13: al residuo fosfo-tirosinico 359 della banda 3 fosforilata si lega il dominio SH2 della tirosin-fosfatasi SHP-2. Quest'ultima, una volta legata, defosforila gli altri tre residui fosfo-tirosinici della banda 3: 8, 21 e 904 [Bordin et al., 2002].

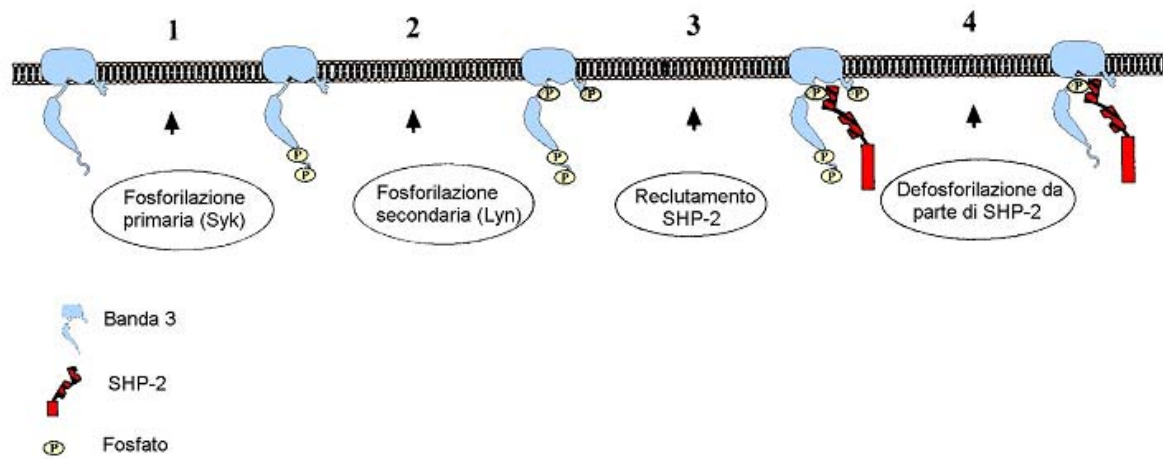


Fig. 13: Defosforilazione della banda 3 da parte della tirosin-fosfatasi SHP-2 [Bordin et al., 2002].

Tirosin-fosfatasi SHP-1

E' una fosfatasi espressa principalmente nelle cellule emopoietiche ed epiteliali [VanVactor et al., 1998]. Essa ha un ruolo fondamentale nel differenziamento, nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule B del sangue. Strutturalmente è caratterizzata da :

- due domini adiacenti SH2 situati all'estremità N-terminale;
- un dominio catalitico situato all'estremità C-terminale, il quale contiene due siti conservati fosfotirosinici;
- una coda C-terminale.

Strutturalmente le fosfatasi SHP-1 e SHP-2 presentano un'alta percentuale di identità di sequenza, fino a 59% nei domini SH2 e il dominio catalitico. Le principali differenze, che portano alla distinta azione delle due fosfatasi, sono localizzate al livello della regione C-terminale [Poole e Jones, 2005].

I domini SH2 della SHP-1 legano residui fosfotirosinici all'interno delle sequenze ITIM, come descritto per il SHP-2. Entrambi domini SH2 sono stati visti legare sequenze ITIM, ma quello all'estremità N-terminale molto probabilmente, ha anche un ruolo nella regolazione dell'attività della stessa SHP-1, come visto per la SHP-2. Quando entrambi i domini SH2 legano una sequenza ITIM, si ha un'aumentata specificità ed una maggiore attività per i suoi substrati [Tamir et al., 2000]. Studi di genetica mutazionale hanno dimostrato che il dominio SH2 al C-terminale ha un ruolo nell'indirizzare SHP-1 al suo substrato ed inoltre facilita l'interazione stessa col substrato. Rimane ancora da chiarire il ruolo dei residui tirosinici presenti nella coda C-terminale, ma pare che l'attività di SHP-1 sia positivamente regolata dal legame di questa regione con fosfopeptidi acidi [Tamir et al., 2000].

A differenza della fosfatasi SHP-2, la SHP-1 ha un ruolo di segnale negativo: va infatti ad attenuare il segnale stesso.

2.1.2. Fosfatasi a basso peso molecolare (LMW PTP)

E' una distinta famiglia di PTPasi largamente espressa, dai procarioti ai mammiferi, aventi una massa molecolare di circa 17-18 KDa. La fosfatasi a basso peso molecolare è stata purificata anche dal eritrocita umano e caratterizzata come un enzima acido (pH ottimale 5-6) con attività su *pNPP*, inibito da metalli pesanti e vanadato [Dissing e Svensmark, 1990]. Sono state identificate tre alleli (Acp1A, Acp1B, Acp1C) che codificano per due isoenzimi chiamati f (*fast*) e s (*slow*) in base alla loro mobilità elettroforetica. Corrispondenti dei due isoenzimi sono stati identificati anche in altri tessuti come ad esempio nel fegato di ratto, AcP1 e AcP2 [Manao et. al., 1992], in placenta umana, HCPTP-A e HCPTP-B [Waheed et al., 1988]. AcP1, HCPTP-A e B_{slow} sono indicate come IF1 (isoforma 1) e AcP2, HCPTP-B e B_{fast} come IF2 (isoforma 2). IF1 e IF2 sono diverse una dall'altra nella sequenza aminoacidica da 40 a 73, nell'affinità per il substrato e nella sensibilità ad attivatori ed inibitori.

Eccetto che per la regione catalitica, C(X)₅R, non presentano alcun'altra omologia con le altre PTPasi [Raugei et al., 2002]. Il meccanismo di catalisi rimane lo stesso e prevede la presenza dei tre residui conservati (cisteina per la catalisi, arginina e acido aspartico per la formazione e stabilizzazione dello stato intermedio). Nella funzionalità di questo enzima un ruolo importante sembra averlo anche due residui tirosinici adiacenti, 131 e 132, situati nella vicinanza del sito catalitico (Fig. 14). Questi residui possono essere fosforilati da chinasi appartenenti alla famiglia Src (Src, Lck, Fyn). La fosforilazione del residuo 131 provoca un aumento dell'attività enzimatica di 25 volte, invece la fosforilazione del residuo 132 non influenza l'attività catalitica dell'enzima, ma partecipa al riconoscimento di questo da parte del dominio SH2 della proteina Grb2, componente della via Grb2/MAPK [Bucciantini et al., 1999].

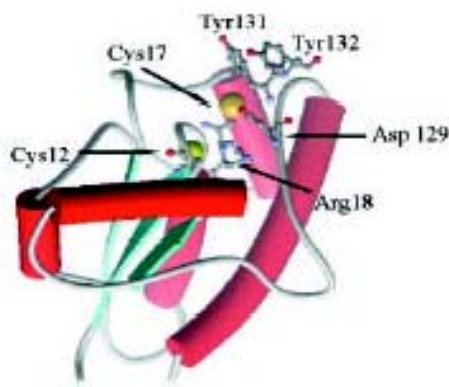


Fig. 14: Struttura delle fosfatasi a basso peso molecolare

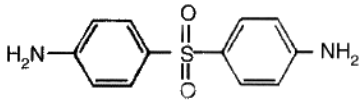
Un altro processo, che può modificare l'attività enzimatica, è l'ossidazione dei due residui di cisteina situati nel sito catalitico, 12 e 17, processo che induce la formazione di un ponte disolfuro

con effetto inibitorio sull'attività catalitica. Il recupero dell'attività enzimatica può comunque avvenire in presenza di sostanze riducenti o del glutatione ridotto [Raugei et al., 2002] .

Per tanto tempo si è creduto che la fosfatasi a basso peso molecolare fosse un enzima esclusivamente citoplasmatico. Cirri et al., 1998, invece ha dimostrato come nelle piastrine LMW PTP sia localizzato anche nel citoscheletro della cellula e nelle strutture associate alla membrana plasmatica. Inoltre è stato dimostrato che solo la frazione citoscheletrica è fosforilata suggerendo ruoli diversi per le diverse frazioni dell'enzima, in funzione della sua localizzazione.

Le fosfatasi a basso peso molecolare si associano e defosforilano molti recettori per i fattori di crescita: PDGFr, il recettore per l'insulina, il EGFr, partecipando alla regolazione dei segnali di trasduzione che portano alla divisione cellulare [Raugei et al., 2002]. Substrato per la LMW PTP è risultato anche il peptide sintetico contenete 13 aminoacidici attorno alla fosfo-tirosina 8 della banda 3 [Stefani et al., 1993] e il frammento citoplasmatico della banda 3 fosforilato [Boivin e Galand, 1986].

Dapsone e idrossilamindapsone



Dapsone

Il dapsone (4,4'-diamminodifenilsolfone, DDS) è un potente farmaco antinfiammatorio e antiparassitario, usato in diverse patologie come asma, sarcoma di Kaposi, artrite reumatoide, malaria, nella terapia per polmonite da *Pneumocystis carinii* in pazienti affetti da AIDS ed inoltre è efficace nel controllo della dermatite erpetiforme.

Il DDS è assorbito rapidamente e quasi completamente dal tratto gastrointestinale. I picchi di concentrazione plasmatica del dapsone si raggiungono entro 2-8 ore dopo la somministrazione. Il $t_{1/2}$ di eliminazione è circa di 20-30 ore. Dopo l'assorbimento nel tratto gastrointestinale, il DDS è trasportato attraverso il circolo portale al fegato, dove viene metabolizzato attraverso due vie distinte: N-acetilazione, che porta al monoacetil-dapsone (MADDS), e N-idrossilazione, che porta ad idrossilammin-dapsone (DDS-NHOH).

L'acetilazione del DDS è mediata da N-acetiltransferasi citosoliche del fegato (NAT). Anche gli eritrociti sono capaci di acetilare il farmaco. Il dapsone acetilato non è tossico, ma lo risulta quando viene idrossilato [Israili et al., 1973].

La N-idrossilazione del dapsone, e del suo acetil-derivato, avviene ad opera del citocromo P-450 ed in particolare è stata attribuita agli isoenzimi CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 [Coleman et al., 1989].

Tutti gli effetti avversi del farmaco sono messi in relazione al suo metabolita DDS-NHOH [Cream, 1970]. Le reazioni indesiderate sono abbastanza frequenti ed includono emolisi (di solito non così grave da dare un'anemia conclamata), metaemoglobinemia, anoressia, nausea e vomito, febbre, dermatite allergica e neuropatia.

Il DDS ed i suoi metaboliti possono subire reazioni di ossidazione e riduzione negli eritrociti, nei neutrofili, come pure nel midollo osseo. All'interno dell'eritrocita [Israili et al., 1973], il DDS-NHOH si lega al complesso osso-ferroe (Fe²⁺O₂) dell'ossiemoglobina portando alla formazione di metaemoglobina (Fe³⁺) e di idrogeno perossido (H₂O₂) (Fig. 15). In questo processo il DDS-NHOH è convertito in nitrosoarene (DDS-NO), poco stabile. Il potere riducente del glutatione (GSH) presente negli eritrociti rigenera dal DDS-NO il DDS-NHOH, che così può ossidare altre molecole di emoglobina, continuando il ciclo redox. Durante questo processo il DDS-NHOH esaurisce il glutatione in pochi minuti. Benché DDS-NHOH possa spontaneamente ossidare a DDS-NO in presenza di ossigeno, i nitroso derivati non possono reagire con l'emoglobina, ma devono essere ridotti a DDS-NHOH. Poiché la metaemoglobina può essere ripristinata nuovamente ad

emoglobina dalla reduttasi eritrocitaria NADH-dipendente, non è proprio una reazione tossica in senso stretto, poiché una volta ridotta la metaemoglobina l'eritrocita è ancora capace di trasportare ossigeno.

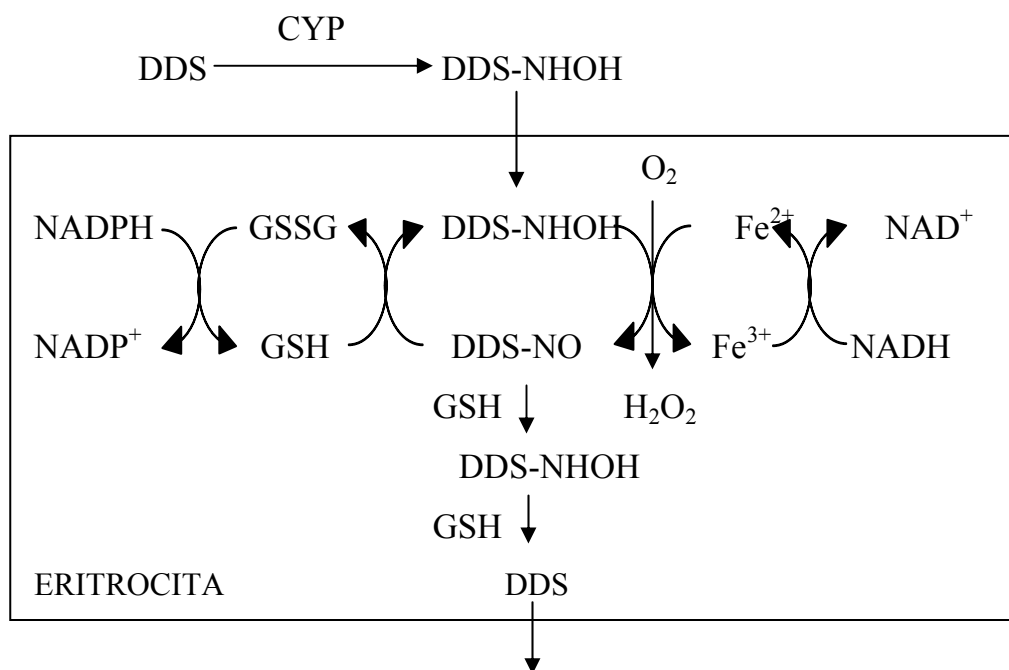


Fig. 15: Metabolismo del dapone all'interno del globulo rosso

Il processo della metaemoglobinemia può essere visto come un meccanismo elaborato ed altamente efficace di detossificazione: difatti gli eritrociti captano il DDS-NHOH proteggendo così i leucociti da livelli del farmaco che possono risultare tossici. Inoltre negli eritrociti si può avere la riduzione di DDS-NHOH a DDS, che può diffondere ad altre cellule: ciò può contribuire al complessivo processo di diffusione del farmaco dal plasma al sito di azione terapeutica. È infine probabile che il dapone “prodotto” dagli eritrociti a partire dal suo metabolita, venga riossidato dal fegato a DDS-NHOH, e così può aver luogo un processo “ciclico” dove il farmaco viene alternativamente metabolizzato e detossificato, ritardando così la sua eliminazione.

L'idrossilammina acetilata, o monoacetildapone-idrossilammina, può anch'essa essere ridotta dall'eritrocita a MADDS. Si è visto che il monoacetil dapone-idrossilammina è equipotente con DDS-NHOH per la formazione di metaemoglobina; però, la velocità iniziale di ossidazione dell'emoglobina mediata dall'idrossilammina acetilata è più elevata paragonata a quella del DDS-NHOH, probabilmente a causa dell'elevata solubilità lipidica del derivato acetilato che porta ad una maggiore diffusione attraverso la membrana eritrocitaria [Coleman, 1995].

L'attività emolitica del DDS-NHOH (e dei farmaci arilamminici in generale) nell'uomo, è stata associata ad uno stress ossidativo, all'interno degli eritrociti, indotto dal farmaco stesso. Difatti, da studi riguardanti gli effetti del DDS-NHOH in eritrociti di ratti, si è osservata una rapida perdita di GSH con concomitante legame di glutatione alle proteine (proteine-SSG) e formazione di legami

disolfuri tra molecole di emoglobina (con formazione di polimeri) e tra l'emoglobina e le proteine scheletriche di membrana [Grossman et al, 1992]. Questo danno, indotto alle proteine scheletriche, è considerato l'inizio alla prematura rimozione di eritrociti intatti danneggiati, da parte della milza [Jollow et al, 1995]. Questi risultati fanno ipotizzare che l'anemia emolitica indotta da DDS-NHOH non sia dovuta a perossidazione lipidica: le specie attive dell'ossigeno, formate dalla reazione del DDS-NHOH con ossiemoglobina, sono troppo reattive per raggiungere il bilayer lipidico della membrana cellulare, ed invece reagiscono coi gruppi sulfidrilici di GSH ed emoglobina, generando i corrispondenti radicali liberi tiolici [Bradshaw et al, 1997]. I radicali tiolici sono sufficientemente stabili da raggiungere la membrana cellulare e sufficientemente reattivi da interagire coi gruppi tiolici delle proteine, ma non hanno sufficiente solubilità lipidica per accedere ai lipidi ed iniziare una perossidazione lipidica [McMillan et al, 1998].

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Negli eritrociti umani il processo di fosforilazione/defosforilazione dei residui tirosinici delle proteine di membrana è implicato nella regolazione di diverse funzioni fra cui la regolazione del metabolismo [Low et al., 1993], il trasporto attraverso le membrane [De Franceschi et al., 1997], il volume e la forma cellulare [Bordin et al., 1995] e recentemente è stato proposto il suo coinvolgimento anche nella morte cellulare [Pantaleo et al., 2008].

Tra le proteine della membrana, la proteina banda 3 rappresenta il principale substrato dell'attività tirosin chinasi [Harrison et al., 1994] la cui azione è rivolta principalmente verso quattro tirosine: Tyr⁸, Tyr²¹ e Tyr⁹⁰⁴, che condividono un intorno acido, e la Tyr³⁵⁹ inserita, invece, in una sequenza basica [Brunati et al., 2000].

A catalizzare in vivo la fosforilazione di queste quattro tirosine intervengono due tirosin chinasi: la prima, appartenente alla famiglia Syk, rappresentata da p72^{Syk}, e la seconda che appartiene, invece, alla famiglia Src ed è rappresentata dal Lyn [Brunati et al., 2000].

La fosforilazione della banda 3 avviene in una maniera sequenziale, in cui il Syk catalizza la cosiddetta “fosforilazione primaria” dei residui tirosinici 8 e 21 della proteina. Una volta fosforilate, queste tirosine vengono riconosciute dal dominio SH2 del Lyn che vi si lega e può così procedere alla “fosforilazione secondaria” dei residui tirosinici 359 e 904 della banda 3 [Brunati et al., 2000].

Mentre la localizzazione della chinasi Lyn in prossimità del substrato è facilmente spiegata attraverso il suo legame alle fosfotirosine 8 e 21 della banda 3, non esiste ancora nessuna evidenza riguardante il meccanismo di fosforilazione della proteina da parte della chinasi Syk.

Durante la senescenza del globulo rosso si accumulano delle modifiche a livello della superficie esterna della cellula che la rendono riconoscibile da parte dei macrofagi. Queste modifiche coinvolgono l'aggregazione della proteina banda 3 [Kay MMB, 2004] accompagnata dalla sua tirosin-fosforilazione [Pantaleo et al., 2008] oppure la calcio-dipendente proteolisi della proteina [Bosman et al., 2005]. L'attivazione degli enzimi proteolitici è un processo caratteristico della senescenza dell'eritrocita [Bratosin et al., 2001]. Sempre una calcio-dipendente proteolisi è anche la proteolisi della tirosin-chinasi p72^{Syk}, contenente due domini SH 2 e un dominio catalitico, che conduce alla formazione della p36^{Syk}, contenente solo il dominio catalitico dell'enzima [Zioncheck et al., 1988].

In questo studio indaghiamo la possibilità che la proteolisi del p72^{Syk} e la formazione del p36^{Syk} sia lo stimolo che induce la fosforilazione della banda 3 da parte della chinasi Syk. In questo modo si potrebbe spiegare anche il coinvolgimento della tirosin-fosforilazione della banda 3 nell'invecchiamento del globulo rosso.

Negli eritrociti umani in condizioni basali, le proteine di membrana, in particolare la banda 3, che rappresenta il principale substrato delle tirosin-chinasi, sono quasi totalmente defosforilate nei

residui tirosinici. Solo l'alterazione dell'equilibrio tra l'attività tirosin-chinasica e tirosin-fosfataseica consente di indurre la tirosin-fosforilazione delle proteine di membrana. Ciò può essere indotto sperimentalmente sottoponendo le cellule a stress ossidativo, che provoca l'inibizione dell'attività tirosin-fosfataseica [Harrison et al., 1994], o allo stress osmotico. In tali condizioni la banda 3 viene fosforilata nei suoi quattro siti tirosinici 8, 21, 359 e 904 nella maniera sopra descritta. Allontanato lo stimolo il livello di tirosin-fosforilazione può essere ripristinato. La defosforilazione della banda 3 è opera delle tirosin-fosfatasi presenti nel globulo rosso. E' stato già descritto il meccanismo di defosforilazione da parte della fosfatasi SHP-2 [Bordin et al., 2002]. Esso prevede che la fosfatasi si legghi alla fosfotirosina 359 della banda 3, tramite i suoi domini SH2. Questo legame attiva l'enzima che procede alla defosforilazione dei siti 8, 21 e 904 della banda 3.

Tuttavia, gli eritrociti umani sono contraddistinti dalla presenza di una notevole attività tirosin-fosfataseica che non si esaurisce in presenza di inibitori specifici di SHP-2, quali la calpeptina [Bordin et al., 2002], indicando, perciò, la presenza di altre tirosin-fosfatasi nella cellula.

Poiché un'altra tirosin-fosfatasi, SHP-1, è caratteristica delle cellule ematopoietiche, abbiamo concentrato la nostra attenzione su questo enzima. Dopo aver evidenziato la presenza di SHP-1 negli eritrociti, abbiamo cercato di individuarne la funzione ed i meccanismi che ne regolano l'attività. Il nostro obiettivo era di capire se la banda 3 poteva essere un substrato per questa fosfatasi e quali fossero le condizioni ed il meccanismo d'azione di questo enzima.

Il nostro interesse si è rivolto anche allo studio delle tirosin-fosfatasi acide indicate da alcuni [Boivin et al., 1986] come coinvolte nel processo di defosforilazione del dominio citoplasmatico della banda 3 (cdb3). Dopo aver purificato e parzialmente caratterizzato una Tyr-fosfatasi di basso peso molecolare dal citoplasma del globulo rosso, abbiamo verificato se la banda 3 potesse esserne un substrato.

Recentemente è stato proposto il coinvolgimento della tirosin-fosforilazione della banda 3 nella regolazione della morte cellulare dell'eritrocita [Pantaleo et al., 2008]. Per caratterizzare meglio questo ruolo della tirosin-fosforilazione della banda 3 abbiamo studiato gli effetti che l'idrossilamindapsone (DDS-NHOH), sostanza in grado di indurre l'emolisi, induce negli eritrociti. DDS-NHOH è un metabolita del dapsona, farmaco antinfiammatorio e antiparassitario utilizzato nel trattamento di varie malattie come lebbra, polmonite da *Pneumocystis carinii* in pazienti affetti da AIDS ed alcune malattie immunitarie. DDS-NHOH è responsabile della metemoglobinemia associata al trattamento con dapsona [Israili et al., 1973]. Non è stato ancora individuato il meccanismo attraverso il quale DDS-NHOH induce la morte dell'eritrocita. E' stato però già riportato che il composto non porta né alla perossidazione lipidica, né all'esternalizzazione della fosfatidilserina [McMillan et al., 2005]. Perciò la causa della morte prematura dell'eritrocita

dovrebbe coinvolgere una modifica dell'assetto delle proteine di membrana. L'obiettivo del nostro studio era quello di indagare sulle possibili modifiche delle proteine di membrana eritrocitaria indotte dal DDS-NHOH. Abbiamo valutato sia il livello di tirosin-fosforilazione delle proteine di membrana, che l'aggregazione della banda 3 ed il suo riconoscimento da parte degli anticorpi autologhi, utilizzando varie concentrazioni del composto e vari tempi d'incubazione.

In conclusione, lo scopo di questo lavoro era quello di individuare i fattori che regolano la tirosin-fosforilazione della banda 3, quali l'attivazione della tirosin-chinasi Syk, della tirosin-fosfatasi SHP-1 e delle tirosin-fosfatasi acide. Inoltre era la nostra intenzione indagare sul possibile coinvolgimento della tirosin-fosforilazione della banda 3 nella senescenza del globulo rosso.

o rosso.

MATERIALI E METODI

1. MATERIALI

Sono stati utilizzati:

- sangue venoso di soggetti adulti fornito da donatori sani volontari;
- DEAE-Sepharose (Pharmacia);
- acrilamide e bisacrilamide (Serva);
- anticorpi monoclonali anti-fosfotirosina (Upstate) ed anti-banda 3 (Sigma);
- anticorpo anti-Syk (C-20) contro i residui 616-635 della Syk chinasi (Santa Cruz Biotechnology);
- anticorpo policlonale anti-SHP-1 (BD Transduction Laboratories);
- anticorpo policlonale anti-SHP-2 (C-18) (Santa Cruz Biotechnology);
- anticorpo policlonale anti-LMW PTP (Abigent);
- anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit coniugati con la perossidasi (BioRad Laboratories)
- anti-human IgG-HRP (Bioss - TEMA Ricerca);
- p36^{Syk} e p72^{Syk} sono stati forniti per gentile concessione dalla professoressa Brunati;
- idrossilamindapsone (Toronto Research Chemicals Inc);
- inibitore PP2 (Calbiochem) ed inibitori proteasici (Roche);
- [γ -³²P]ATP (Amersham International);
- membrane di nitrocellulosa (BioRad Laboratories);
- sistema di rivelazione antigene-anticorpo (Amersham);
- mercaptoetanololo, EDTA e NaN₃ (Merk).

Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalla Sigma.

Il pervanadato viene ottenuto nella reazione del H₂O₂ 100mM con ortovanadato 100mM in rapporto 3:2.

2. METODI

2.1 Preparazione degli eritrociti

Il sangue fresco venoso, trattato con citrato, proveniente da donatori sani, viene centrifugato a 750xg. Dopo la centrifugazione si ottengono tre frazioni: una corrispondente ai globuli rossi, una al di sopra degli eritrociti corrispondente ai globuli bianchi ed alle piastrine, ed infine un sopranatante costituito da plasma.

Plasma, globuli bianchi e piastrine vengono eliminati per aspirazione. I globuli rossi vengono ripresi in tampone fosfato salino (PBS) pH 7.5, mescolati delicatamente e centrifugati come sopra.

Si aspirano, anche in questo caso, il sopranatante ed i globuli bianchi residui, quindi si procede per altre due volte allo stesso tipo di lavaggio.

Alla fine di questa operazione si ottengono gli eritrociti impaccati, pronti per essere utilizzati nei vari esperimenti.

2.2 Trattamento degli eritrociti

Gli eritrociti, preparati come descritto nel paragrafo 2.1 vengono risospesi al 20% di ematocrito nel tampone PBS e quindi vengono incubati come tali oppure con l'aggiunta di diamide 2mM, NEM 1.5 mM, pervanadato 0.5 mM per 30 minuti a 35°C, in presenza o in assenza di PP2 (10 µM), inibitore della chinasi Lyn.

Gli eritrociti sempre al 20% dell'ematocrito sono stati inoltre trattati con concentrazioni crescenti di dapsona o idrossilamindapsona (da 0.15 a 0.6 mM) per tempi diversi d'incubazione.

Terminata l'incubazione i campioni vengono centrifugati per 3 minuti a 750xg ed il sopranatante viene aspirato.

2.3 Emolisi

Per effettuare una emolisi completa e per ottenere delle membrane quasi totalmente prive di emoglobina è necessario impiegare soluzioni emolizzanti aventi una concentrazione compresa tra 10 e 20 mOsm ed un pH superiore a 6.8.

Sulla base di queste indicazioni, i globuli rossi impaccati, trattati o non-trattati, vengono ripresi in tampone fosfato ipotonico secondo un rapporto di una parte globuli rossi impaccati e 29 parti tampone, mescolati energicamente per 5 minuti e, infine, centrifugati a 20000xg per 20 minuti.

Il tampone fosfato ipotonico è composto da:

- 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 8.0;
- 30 µM PMSF;

- 0.02 % NaN₃;
- 1 mM vanadato;
- cocktail di inibitori proteolitici.

Dalla centrifugazione si ottengono due frazioni: il citoplasma ed il precipitato, rappresentato dalle membrane eritrocitarie.

2.4 Preparazione del citoplasma al 60% di saturazione con solfato d'ammonio

Dopo l'emolisi, la frazione citoplasmatica può essere saturata al 60% con solfato d'ammonio, lasciata ad agitare a 0°C per 60 minuti e centrifugata a 30000xg per 20 minuti.

Dopo aver eliminato il soprannatante, il precipitato viene risospeso in tampone Imidazolo pH 7 e dializzato per 24 ore contro ripetuti cambi dello stesso tampone.

Il tampone Imidazolo è così composto:

- 25 mM Imidazolo, pH 7.0;
- 10 % glicerolo;
- 0.1 % Triton X-100;
- 10 mM 2-mercaptoetanololo;
- 1 mM EDTA;
- 0.05 mM PMSF;
- 0.02% NaN₃.

2.5 Preparazione delle membrane

Dopo l'emolisi degli eritrociti, le membrane recuperate, ancora contaminate da emoglobina e residui di emolisato, sono sottoposte ad un lavaggio eseguito con la stessa soluzione ipotonica usata per l'emolisi e centrifugate per 20 minuti a 20000xg. Il soprannatante viene eliminato e le membrane ottenute, prive di emoglobina, possono essere utilizzate per condurre diverse analisi.

La determinazione quantitativa delle proteine di membrana è stata effettuata con il metodo di Folin.

2.6 Preparazione delle frazioni di membrana

Membrane depletate delle proteine periferiche sono state ottenute incubando le membrane in una soluzione contenente 0.01 N NaOH a 0°C per 30'. Il residuo insolubile, recuperato centrifugando a 140000 x g, è stato lavato due volte in tampone Tris 25 mM, pH 8 contenente 0.02% NaN₃, 0.03 mM PMSF, e 1 µg/ml leupeptina, e risospeso nello stesso tampone Tris.

Membrane depletate dei fosfolipidi sono state preparate trattando le membrane con cloroformio-metanolo. Il residuo è stato risospeso in tampone Tris.

Preparazione del dominio intracitoplasmatico della banda 3, cdb3, sono state ottenute incubando le membrane depletate dalle proteine periferiche (ottenute come descritto prima) con α -chimotripsina a 0°C per 45'. La reazione è stata fermata con l'aggiunta di PMSF (200 μ g/ml) e leupeptina (1 μ g/ml) ed il residuo insolubile è stato recuperato centrifugando a 140000 x g per 30 min. Il pellet è stato lavato due volte in tampone fosfato 7.5 mM pH 8 contenente 200 μ g/ml PMSF e 1 μ g/ml leupeptina, e risospeso nello stesso tampone.

Estrazione delle proteine integrali di membrana

Le membrane sono state solubilizzate per un'ora a 0°C in un tampone costituito da Tris 25 mM, a pH 7.5, Triton X-100 all'1% ed inibitori proteasici, e sottoposte ad ultracentrifugazione per 40 minuti a 100000xg. Sono stati ottenuti una frazione Triton solubile, rappresentante l'estratto Triton, ed una Triton insolubile, ovvero il citoscheletro.

2.7 Elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

Le membrane (10 μ g) trattate con dodicil solfato di sodio (SDS) al 2% concentrazione finale e con 2-mercaptoetanololo al 1% concentrazione finale, vengono incubate per 5' a 100°C. SDS, un detergente anionico, fa sì che tutte le proteine del campione assumano la stessa carica negativa. La separazione su gel di poliacrilamide delle diverse proteine avviene perciò in funzione del loro peso molecolare. Il trattamento con 2-mercaptoetanololo a temperatura elevata (100°C), provoca poi la rottura dei legami disolfuro intra e intermolecolari.

Il gel viene ottenuto attraverso la polimerizzazione di un monomero principale, l'acrilamide, e di un monomero di legame, la N,N'-metilen-bis-acrilamide.

La gelificazione avviene al riparo dall'aria ed a temperatura ambientale in presenza di un catalizzatore, il TEMED e di un agente ossidante, il persolfato d'ammonio. Il risultato è un gel flessibile, inerte, trasparente ed insolubile in acqua.

2.8 Western Blot

E' una tecnica che prevede il trasferimento delle singole proteine, separate in un gel di poliacrilamide, su di un foglio di nitrocellulosa.

Il tampone utilizzato per l'elettrotrasferimento è costituito da:

- TRIS 25 mM;
- glicina 192 mM;
- metanolo 20%;
- SDS 0.1%, pH 8.0.

Immunorivelazione

Al termine del blotting la membrana di nitrocellulosa viene saturata per 30 minuti in un tampone Tris- HCl 50 mM (pH 7.5) contenente 3% BSA.

- La nitrocellulosa viene poi incubata per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario.

Dopo tre lavaggi della cartina di nitrocellulosa con il tampone Tris 50 mM contenente 0.1% Tween la membrana viene incubata per 30 minuti con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi. Quindi si procede ad altri tre lavaggi con lo stesso tampone di lavaggio e infine si esegue la rivelazione con il sistema di rivelazione di chemiluminescenza ECL su lastra fotografica di tipo Kodak X OMAT 5.

La membrana di nitrocellulosa, una volta rivelata, può essere sottoposta ad un altro trattamento anticorpale e per fare ciò bisogna estrarre l'anticorpo già aggiunto. A tale scopo la membrana viene immersa per 30 minuti, a 55°C, nell'apposito tampone di estrazione anticorpi, costituito da:

- Tris 62.5 mM, pH 6.7;
- SDS 2%;
- mercaptoetanolo 100 mM.

Dopo questo trattamento si procede come indicato sopra con l'aggiunta del nuovo anticorpo primario.

2.9 Purificazione della fosfatasi a basso peso molecolare (LMW PTP)

Il citoplasma (400 ml) proveniente da 20 ml di eritrociti impaccati è stato sottoposto a cromatografia a scambio ionico su colonna di DEAE Sepharose (18 ×3 cm). Detta resina era stata equilibrata con un tampone A contenente 25 mM fosfato di sodio, 1mM EDTA, 0.02% NaN₃, 0.05 mM PMSF, 10mM mercaptoetanolo (pH 7.5). L'emoglobina non si lega alla resina e viene raccolta nel tampone di lavaggio della colonna A. Le restanti proteine legate alla resina sono state eluite utilizzando un gradiente lineare di 800 ml NaCl da 0 a 0.7 M nello stesso tampone A. Sono state raccolte frazioni da 5 ml. L'attività fosfataseica è stata saggiata su *pNPP* a pH 5. Si è ottenuto un unico picco simmetrico di attività fosfataseica eluito tra 0.16- 0.22 M NaCl. Le frazioni contenenti tale attività sono state riunite e la soluzione è stata saturata con (NH₄)₂SO₄ 3.5 M. Si procede alla centrifugazione (30000×g per 30') ed il precipitato (contenente tutta l'attività fosfataseica) è risospeso in 3 ml di tampone B contenente 25 mM imidazolo, 1mM EDTA, 0,5 M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.05mM PMSF, 10mM mercaptoetanolo (pH 7).

La sospensione è stata poi sottoposta ad una gel filtrazione su una colonna di G-75 Sephadex (125 × 32.5 cm) equilibrata ed eluita con lo stesso tampone B. Sono state raccolte frazioni da 2 ml. L'attività fosfataseica, saggiata sempre su *pNPP* a pH 5, ha rivelato un unico picco simmetrico eluito

con 298 ml. Le frazioni contenenti tale attività sono state raccolte e concentrate su diaflo utilizzando la membrana YMIO fino ad un volume di 3 ml. Con questa semplice procedura la fosfatasi acida era purificata fino quasi all'omogeneità. Per conservarla bisogna tenerla in frigo a 0°C, in freezer perdendo l'attività.

2.10 Tirosin-fosforilazione della banda 3 di membrana e del dominio intracitoplasmatico della banda 3, cdb 3

a. Tirosin-fosforilazione della banda 3 di membrana e del cdb3 con p36^{Syk} e p72^{Syk}

Le membrane (10 µg) o il cdb3 (3 µg) sono state incubate a 30°C per vari tempi d'incubazione in 30 µl di soluzione tampone Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 contenente 10 mM MnCl₂, 20 µM [γ -³²P]ATP (3x10⁶ cpm/nmol) e 0.1 mM vanadato, in presenza di p36^{Syk} (10 ng), o p72^{Syk} (20 ng). Quando necessario, prima dell'incubazione, è stato aggiunto 100 µg/ml leupeptina. Dopo incubazione la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 2% SDS e 1% β -mercaptoetanolo e trattamento a 100°C per 5'. I campioni sono stati sottoposti a SDS/PAGE. I gel risultati dopo la corsa elettroforetica sono stati colorati con Coomassie Blue, trattati con 2 M NaOH a 55°C per 1 h e quindi essiccati e sottoposti ad autoradiografia. L'incorporazione di ³²P nella banda 3 e cdb3 è stata misurata con Packard Instant Imager.

Per il calcolo delle K_m e del V_{max} dei due isoenzimi sono state utilizzate concentrazioni crescenti di substrato, cdb3 o banda 3 di membrana.

b. Tirosin-fosforilazione sequenziale della banda 3 di membrana da parte delle tirosin-chinasi Syk e Lyn

30 µg di membrane eritrocitarie sono state fosforilate incubandole in 90 µl di tampone di fosforilazione in presenza di p36^{Syk} 150 nM, per 10 minuti a 30°C. Il tampone di fosforilazione è composto da:

- Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ;
- MnCl₂ 10 mM;
- [γ -³²P]ATP 50 µM (attività specifica 1000 cpm/pmol);
- vanadato 0.1 mM.

Le membrane così fosforilate sono state centrifugate per 20 minuti a 20000xg. Il precipitato è stato poi lavato per tre volte nel tampone C contenente imidazolo 25 mM, pH 7, EDTA 1 mM, NaN₃ 0.02%, glicerolo 10%, β -mercaptoetanolo 10 mM, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 50 µM, e ripreso nello stesso tampone.

Le membrane così preparate vengono incubate per altri 10 minuti a 30°C in 90 µl di soluzione tampone di fosforilazione in presenza di 300 nM Lyn. Dopo tale operazione si centrifuga il tutto ed il precipitato viene lavato 3 volte nel tampone C.

2.11 Immunoprecipitazione

Alle proteine estratte con Triton dalle membrane, come descritto nel paragrafo 2.6, oppure al citoplasma al 60 % di saturazione con solfato d'ammonio (paragrafo 2.4) viene aggiunta la proteina A sefarosio equilibrata in Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, contenente NaN₃ 0,02%, ed il tutto viene lasciato in agitazione a 4°C per 45 minuti. I campioni vengono poi centrifugati 3 minuti a 1000xg. In questo modo vengono allontanate le proteine (o altro) che possono adsorbirsi in maniera aspecifica alla resina.

I sopranatanti risultanti dalla centrifugazione vengono trattati con l'anticorpo adeguato, ed il tutto si lascia ad agitare a 4°C per 24 ore. Si aggiunge poi la proteina A sefarosio che si lascia a contatto con l'immunocomplesso a 4°C per 45 minuti. Si centrifuga 3 minuti a 1000xg e si lava per tre volte con il tampone TRIS-HCl 50 mM, a PH 7.5, contenente gli inibitori proteolitici. I campioni ottenuti vengono poi risospesi nello stesso tampone utilizzato per i lavaggi.

2.12 Attività tirosin-chinasica eritrocitaria totale

Il lisato totale eritrocitario (15 µg), ottenuto mediante vari cicli di congelamento/scongelo degli eritrociti intatti, viene incubato nel tampone di fosforilazione (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MnCl₂ 10 mM, [γ-³²P]ATP 50 µM, vanadato 0.1 mM), in presenza di 3 µg di cdb3. I campioni vengono incubati per 10 minuti a 30°C e poi la reazione viene bloccata con SDS 2 % e mercaptoetanolo 1 % (concentrazioni finali). Dopo l'incubazione per 5 minuti a 100°C, i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi in SDS-PAGE 10 % (paragrafo 2.7). Il gel così ottenuto è colorato con Coomassie blue e trattato con 2 M NaOH per 60' a 55°C per eliminare le fosfo-serine e fosfo-treonone. I gel vengono seccati e sottoposti all'autoradiografia. L'incorporazione di ³²P nelle proteine è stata misurata con Packard Instant Imager.

2.13 Attività tirosin-fosfatase

a. Attività tirosin-fosfatase eritrocitaria totale

3 µl di lisato totale eritrocitario, ottenuto attraverso congelamento/scongelo ripetuto degli eritrociti intatti, sono stati incubati per 10' a 30°C con 3 µg (³²P)cdb3 in 30 µl di tampone Imidazolo 25 mM pH 7 contenente 1mM ditiotreitolo. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di SDS-

mercaptoetanolo seguita dall'ebollizione per 5'. Il campione è sottoposto al SDS-PAGE seguito dall'autoradiografia. Il dosaggio di ^{32}P -cdb3 viene fatto con con Packard Instant Imager.

b. L'attività tirosin-fosfatase del SHP-1 e LMW PTP sulla banda 3 viene saggiata incubando la fosfatasi SHP-1 nel tampone Imidazolo 25 mM pH 7, contenente ditionitrito (DTT) 8 mM, oppure la fosfatasi a basso peso molecolare nel tampone sodio acetato 0.5 M pH 5 contenente ditionitrito (DTT) 8 mM, con il substrato rappresentato da 3 μg di membrane eritrocitarie fosforilate da Syk e Lyn (paragrafo 2.10 b) o attraverso l'incubazione dell'eritrocita intatto con inibitori fosfatasi, come diamide (paragrafo 2.2). I campioni rimangono in incubazione per 20 minuti a 30°C, quindi la reazione di defosforilazione viene bloccata aggiungendo 2% di SDS e 1% di mercaptoetanolo e sottoponendo i campioni a incubazione a 100°C per 5 minuti.

I campioni così trattati vengono poi analizzati su SDS/PAGE 10% ed il gel ottenuto viene sottoposto a Western blot e rivelato con anticorpi anti-P-Tyr.

Per il calcolo delle K_m della LMW PTP sulla banda 3 sono state utilizzate concentrazioni crescenti di substrato.

c. Attività fosfatase della LMW PTP su *pNPP*

La fosfatasi acida a basso peso molecolare è stata incubata con 20 mM *p*-nitrofenilfosfato in tampone acetato di sodio 0.5 M contenente 1mM DTT e a vari pH, per 10' a 30°C. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 1ml NaOH 1M. L'estinzione del *pNPP* è stata misurata a 410 nm ($\epsilon_{410}=1.8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'attività fosfatase è stata espressa come μmol di *p*-nitrofenolo liberato/(min mg) di proteina. La quantità di proteine totali era determinata secondo il metodo di Folin.

Per il calcolo delle K_M della LMW PTP sul *pNPP* sono state utilizzate concentrazioni crescenti di substrato.

2.14 Mappatura dei frammenti proteolitici della ^{32}P -Tyr-banda 3 di membrana

Le membrane (30 μg), precedentemente fosforilate con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ come descritto nel paragrafo 2.10 b, vengono incubate a 30°C per 20 minuti nel tampone di defosforilazione, imidazolo per SHP-1 e acetato per LMW PTP, contenente DTT, in presenza oppure in assenza della fosfatasi.

Dopo essere stati solubilizzati con SDS e mercaptoetanolo a 100 °C, per 5 minuti, i campioni sono sottoposti ad SDS-PAGE ed elettrotrasferiti su carta di nitrocellulosa. La banda corrispondente alla banda 3 fosforilata, identificata mediante autoradiografia, viene tagliata e successivamente digerita con tripsina in tampone bicarbonato all'1% (pH 8.9) (Bordin et al., 2002). In questo modo, la banda

3 viene, non solo estratta dalla carta di nitrocellulosa, ma anche scissa in peptidi a livello dei residui di lisina e arginina. I peptidi così ottenuti vengono liofilizzati, risospesi nel tampone bicarbonato e sottoposti ad una prima corsa elettroforetica su strato sottile di cellulosa (TCL) per 1 ora a 1000V. Successivamente si procede con una cromatografia ascensionale in un tampone contenente piridina, acido acetico, butanolo e acqua in rapporto 25%: 7.5%: 37.5%: 30%. La lastra di cellulosa viene quindi asciugata ed i peptidi così separati vengono identificati mediante autoradiografia.

2.15 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite con Student's t-test. Le differenze sono state considerate significative quando $p < 0.05$.

RISULTATI

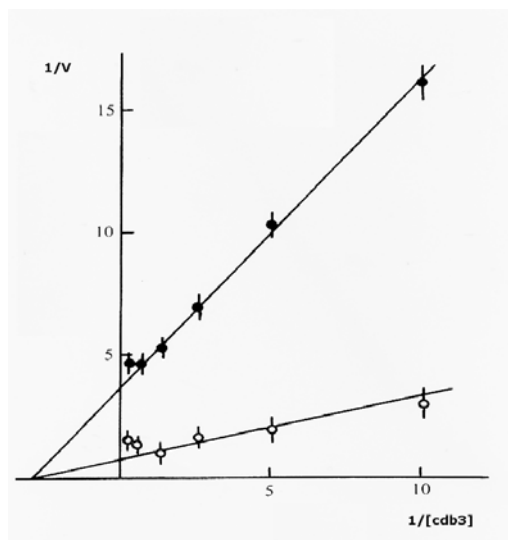
Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 attraverso la proteolisi della tirosin-chinasi p72^{Syk}

1. Fosforilazione del dominio citoplasmatico della banda 3 (cdb 3) da parte di p36^{Syk} e p72^{Syk}

La proteina banda 3 viene fosforilata da due tirosin-chinasi in maniera sequenziale: inizialmente la tirosin-chinasi Syk fosforila le tirosine 8 e 21 della proteina, creando siti di aggancio per i domini SH 2 della tirosin-chinasi Lyn, che legandosi in questo modo al suo substrato, diventa in grado di fosforilare le tirosine 359 e 904 della banda 3. Se il meccanismo di azione è descritto per la chinasi Lyn, non è stato ancora caratterizzato come avviene la fosforilazione indotta dalla chinasi Syk.

La tirosin-chinasi Syk è stata purificata sotto due forme, una chiamata p72^{Syk}, contenente due domini SH2 e un sito catalitico, e il suo prodotto di proteolisi, contenente solo il dominio chinasi. Le due forme della tirosin-chinasi Syk sono state utilizzate per fosforilare il dominio citoplasmatico della banda 3 (cdb3) isolato e purificato dalla stessa proteina di membrana. I due enzimi presentano lo stesso K_m (0.3 μ M) ma diversa efficienza di fosforilazione, p72^{Syk} risultando meno efficiente verso questo substrato (Fig. 1.1). Questa diversa efficienza può essere dovuta alla presenza dei domini SH2, che esercitano un parziale effetto inibitorio sull'adiacente subunità catalitica dell'enzima. Mancando dei due domini SH2, la forma proteolizzata dell'enzima, p36^{Syk}, può così catalizzare la reazione in maniera più efficiente.

Fig. 1.1



Tyr-fosforilazione del cdb3 da parte di p72^{Syk} (●) e p36^{Syk} (○)

Concentrazioni crescenti di cdb3 sono state incubate a 30°C per 10' in 30 μ l di soluzione tampone Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 contenente 10 mM MnCl₂, 20 μ M [γ -³²P]ATP (3×10^6 cpm/nmol) e 0.1 mM vanadato ed in presenza di 10 ng p36^{Syk} (○), o di 20 ng p72^{Syk} (●). Dopo l'incubazione i campioni trattati 5' a 100°C in

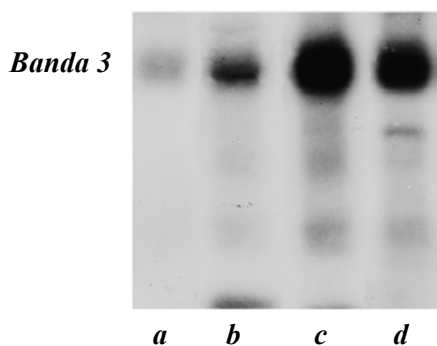
presenza di 2% SDS e 1% 2-mercaptoetanolo sono stati sottoposti a SDS-PAGE. La banda corrispondente a $^{32}\text{P-cdb3}$ è stata tagliata dal gel e la radioattività è stata misurata in un contatore di scintillazione liquido. $[\text{cdb3}]$ è stata valutata come μM e $1/V$ come $1/\text{cpm} \times 10^3$. I valori rappresentano \pm deviazione standard (SD) di quattro esperimenti eseguiti in triplicato.

Si può dedurre da questo esperimento che il processo di fosforilazione della banda 3 può essere regolato attraverso la formazione dell'isoenzima p36^{Syk} , più efficiente nella fosforilazione del dominio intracitoplasmatico della banda 3.

2. Fosforilazione delle membrane eritrocitarie catalizzata da p72^{Syk} e da p36^{Syk}

Nel globulo rosso il substrato della chinasi Syk è l'intera proteina banda 3 di membrana. Quindi abbiamo verificato la nostra ipotesi utilizzando come substrato, per i due enzimi, la membrana eritrocitaria (Fig. 1.2). La differenza di efficienza di fosforilazione dei due isoenzimi è risultata ancora più accentuata rispetto a quando il substrato era il cdb3 purificato. In Fig. 1.2 si nota come l'intensità della banda 3 fosforilata dal p36^{Syk} (linea c) è molto maggiore rispetto a quella fosforilata da p72^{Syk} (linea b). In questo caso, i domini SH2 potrebbero, oltre ad inibire parzialmente il sito catalitico del p72^{Syk} , stabilire anche dei legami con la membrana plasmatica tali da allontanare l'enzima dal suo substrato.

Fig. 1.2



La fosforilazione delle membrane eritrocitarie catalizzata da p72^{Syk} e da p36^{Syk}

Membrane isolate ($10 \mu\text{g}$) sono state incubate a 30°C per $10'$ come tali (linea a) o in presenza di p72^{Syk} (20 ng) (linea b) o p36^{Syk} (10 ng) (linea c). Linea d – $10 \mu\text{g}$ membrane isolate erano pre-incubate con ATP e p36^{Syk} (10 ng). Dopo un lavaggio per rimuovere sia il p36^{Syk} che ATP, le membrane erano incubate con p72^{Syk} e $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a 30°C per $10'$. L'incubazione è stata stoppata con l'aggiunta di SDS e mercaptoetanolo. Dopo l'incubazione per $5'$ a 100°C i campioni sono stati sottoposti a SDS-PAGE. I gel sono stati trattati con NaOH per rimuovere fosfo-Ser e fosfo-Thr e sottoposti ad autoradiografia per 6 ore. La figura è rappresentativa di 4 esperimenti separati.

Quando le membrane sono state pre-incubate con $p36^{Syk}$ e ATP non radioattivo e in seguito, dopo opportuno lavaggio per allontanare il $p36^{Syk}$ e l'ATP, sono state reincubate con $p72^{Syk}$ e $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (linea d), il livello di fosforilazione della banda 3 è risultato molto maggiore rispetto a quello ottenuto senza la pre-incubazione (cfr. linee d e b). Questo conferma l'ipotesi che la minore attività del $p72^{Syk}$ sulla banda 3 di membrana è dovuta ad una specie di impedimento sterico esercitato dai domini SH2. La tirosin-fosforilazione della banda 3 da parte del $p36^{Syk}$ determina la modifica conformazionale della proteina rendendola più accessibile per la successiva fosforilazione con il $p72^{Syk}$. In questo caso quest'ultimo enzima risulta molto più efficiente nel fosforilare il suo substrato.

Con questo esperimento non solo abbiamo confermato il ruolo della proteolisi del $p72^{Syk}$ nel generare un'enzima molto più efficiente nella fosforilazione della banda 3, ma abbiamo anche dimostrato come la prefosforilazione della banda 3 con $p36^{Syk}$ prepara la proteina per la successiva fosforilazione con $p72^{Syk}$.

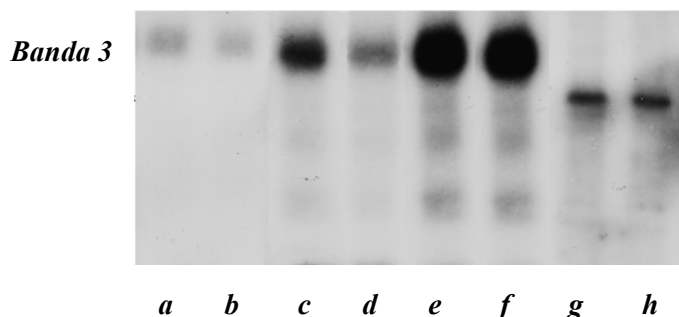
3. Effetto degli agenti anti-proteasici sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 catalizzata da $p36^{Syk}$ e $p72^{Syk}$

Sulla membrana eritrocitaria sono presenti enzimi proteolitici, che possono essere attivate durante la senescenza della cellula [Bratosin et al., 2001], contribuendo in questo modo all'attivazione del $p72^{Syk}$ attraverso la sua trasformazione in $p36^{Syk}$.

Per verificare questa ipotesi abbiamo confrontato il livello di fosforilazione della banda 3 indotto dalla $p72^{Syk}$ (Fig. 1.3, linee c, d) con quello ottenuto dalla fosforilazione con $p36^{Syk}$ (linee e, f) in membrane preparate in presenza o in assenza di leupeptina, noto inibitore proteasico. La fosforilazione indotta da $p72^{Syk}$ in presenza di leupeptina (linea d) è risultata molto ridotta in confronto a quella ottenuta in assenza del inibitore (linea c). Lo stesso effetto si nota anche nelle membrane alle quali non è stato aggiunto il $p72^{Syk}$ esogeno, e quindi la fosforilazione è stata catalizzata solo dall'enzima endogeno (cfr. linea b e linea a). Quando la fosforilazione delle membrane è stata indotta dal $p36^{Syk}$, l'aggiunta di leupeptina non ha modificato il livello di fosforilazione della banda 3 (cfr. linea f con linea e).

Questi risultati suggeriscono l'idea che al livello della membrana eritrocitaria, le proteasi endogene proteolizzano una parte dell'enzima $p72^{Syk}$ attivandolo e inducendo così un'elevata tirosin-fosforilazione della banda 3. Detta proteolisi è prevenuta dall'aggiunta di leupeptina che porta ad un livello basso di fosforilazione della banda 3.

Fig. 1.3



L'effetto degli inibitori proteasici sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 mediata da p72^{Syk} e p36^{Syk}

Le membrane eritrocitarie (10 µg) preparate in presenza (linee b, d, f) o in assenza (linee a, c, e) di leupeptina 100 µg/ml, sono state incubate come tali (linee a, b), con p72^{Syk} (20 ng) (linee c, d) o p36^{Syk} (10 ng) (linee e, f) e [γ -³²P]ATP a 30°C per 10'. I campioni sono stati analizzati attraverso SDS-PAGE ed i gel sono stati sottoposti a trattamento con NaOH come descritto nei "Materiali e Metodi" e poi ad autoradiografia per 6 ore. La figura è rappresentativa di 4 esperimenti separati.

4. Legame del p72^{Syk} alla membrana eritrocitaria

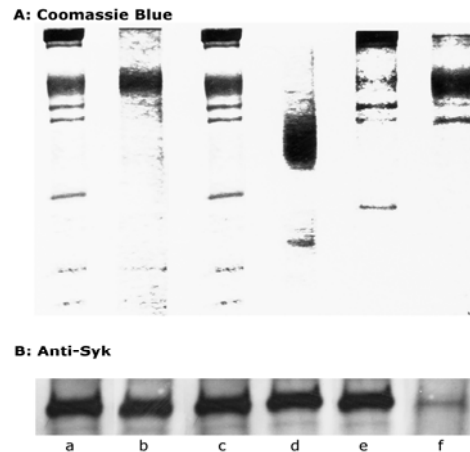
Nella membrana eritrocitaria si distinguono due popolazioni di banda 3: una legata al citoscheletro attraverso il suo dominio intracitoplasmatico, che rappresenta il 35% del totale della proteina e l'altra 65%, rappresenta la frazione di banda 3 libera nella membrana. Il nostro intento era quello di capire verso quale delle due popolazioni della banda 3 era diretta l'attività chinasi dei due isoenzimi p72^{Syk} e p36^{Syk}.

Poiché, tra i due, solo il p72^{Syk} è in grado di legarsi alle membrane attraverso i domini SH2, abbiamo incubato questo isoforma con le membrane ed in seguito abbiamo estratto le membrane con Triton X-100 (Fig. 1.4, linee e, f). Dopo la centrifugazione l'enzima aggiunto è stato ritrovato quasi completamente nel citoscheletro (linea e). Questa frazione di membrana, insolubile in Triton, è rappresentata dalle proteine periferiche e dalla banda 3 legata al citoscheletro (35%). Nella frazione solubile in Triton della membrana, che è rappresentata dalle proteine intrinseche e che contiene la banda 3 non legata al citoscheletro (65%), invece, si trovano solo piccole tracce di p72^{Syk} (linea f).

Per identificare meglio il sito di legame del p72^{Syk} abbiamo preparato varie subfrazioni di membrana: membrane depletate dalle proteine periferiche (linea b), dai fosfolipidi solubili in cloroformio/metanolo (linea c), membrane senza proteine periferiche e senza il dominio intracitoplasmatico della banda 3 (cdb3) (linea d). Il p72^{Syk} aggiunto esogenamente a tutte queste preparazioni di membrana ha mantenuto però l'abilità di legarsi (Pannello B), indicando che nessuna di queste formazioni, le proteine periferiche, i fosfolipidi, il dominio intracitoplasmatico della banda 3, non è sito di legame.

Presi assieme, questi risultati indicano che l'enzima probabilmente si lega alla banda 3 citoscheletrica, e più precisamente, al suo dominio transmembrana, essendo l'unica struttura che rimane dopo tutte le varie estrazioni eseguite.

Fig. 1.4



Legame del p72^{Syk} a varie sub-frazioni di membrana

Membrane isolate (15µg) (linea a), depletate dalle proteine periferiche (linea b), fosfolipidi (linea c), o sia proteine periferiche che il dominio intracitoplasmatico della banda 3 (cdb3) (linea d) sono state incubate con p72^{Syk} e lavate. Le linee e e f mostrano membrane preincubate con p72^{Syk}, estratte con Triton X-100 1% e separate per centrifugazione in citoscheletro (linea e) e la frazione solubile in Triton (linea f). Pannello A mostra il pattern proteico delle subfrazioni di membrana ottenuto con la colorazione Coomassie Blue.

Pannello B: tutte le preparazioni sono state sottoposte a Western blot e immunorivelate con anticorpi anti Syk.

5. Analisi delle subfrazioni di banda 3 come substrato per le due chinasi isoforme

Una volta identificato il sito di legame del p72^{Syk} alle membrane siamo stati interessati ad analizzare il pattern di fosforilazione delle due popolazioni di banda 3, legata e non-legata al citoscheletro, indotto dai due isoenzimi, p72^{Syk} e p36^{Syk}.

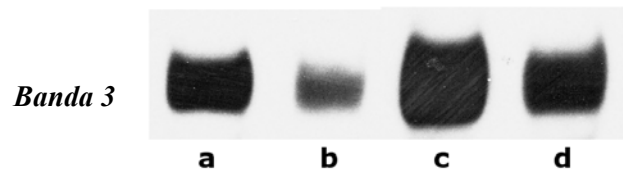
Le membrane fosforilate con p72^{Syk} (Fig. 5, linee a, b) o con p36^{Syk} (linee c, d), sono state estratte con Triton X-100 e la tirosin-fosforilazione della banda 3 è stata valutata sia nell'estratto Triton che nel citoscheletro. La figura 1.5 mostra chiaramente che le due isoforme fosforilano la banda 3 proporzionalmente alla sua quantità nelle due frazioni di membrana, cioè 35% nel citoscheletro (linee b, d) e 65% nella frazione solubile (linee a, c). Questo avviene, ovviamente secondo l'efficienza caratteristica di ognuno degli enzimi, p36^{Syk} inducendo un livello di fosforilazione maggiore del p72.

Siccome il legame di p72^{Syk} avviene principalmente al citoscheletro della cellula, sarebbe da pensare che la sua attività chinastica interessi la popolazione di banda 3 presente in questa frazione della membrana. Quello che si ottiene, in realtà, è la fosforilazione di ambedue le frazioni di banda

3 sia legata al citoscheletro che libera nella membrana. Poiché la fosforilazione delle due frazioni di membrana è stata eseguita senza l'aggiunta di inibitori proteasici, è presumibile dedurre che, durante l'incubazione, sia avvenuta la proteolisi del $p72^{\text{Syk}}$ e la sua trasformazione in $p36^{\text{Syk}}$, che mancando del dominio di legame alle membrane, è libero di fosforilare anche la frazione alla quale il $p72^{\text{Syk}}$ non è legato.

Fig. 1.5:

Anti P-Tyr



Pattern di fosforilazione della banda 3 solubile in Triton X-100 (linee a, c) e citoscheletrica (linee b, d) da parte di $p72^{\text{Syk}}$ -(a, b) e $p36^{\text{Syk}}$ -(c, d).

Le membrane isolate (15 μg) sono state incubate con $p72^{\text{Syk}}$ (20 ng) (linee a, b) o $p36^{\text{Syk}}$ (10 ng) (linee c, d) in presenza di ATP per 10 min a 30°C . Dopo un lavaggio per rimuovere il nucleotide in eccesso, i campioni sono stati trattati con Triton X-100 1% per 5 min a 0°C e centrifugati a 140,000 x g per 30 min. Il pellet insolubile era risospeso in tampone Tris fino allo stesso volume di partenza. Le due frazioni risultate, estratto Triton (linee a, c) e citoscheletro (linee b, d), sono state analizzate attraverso SDS-PAGE seguito dal Western Blotting e immunorivelazione con anticorpi anti P-Tyr.

Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 mediante la tirosin-fosfatasi SHP-1

1. Effetto di diamide , NEM o pervanadato sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 negli eritrociti umani: coinvolgimento della tirosin-fosfatasi SHP-1

La regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 avviene sia attraverso le tirosin-chinasi, che attraverso le tirosin-fosfatasi. Questi ultimi enzimi intervengono nella totale defosforilazione delle proteine, caratteristica delle condizioni basali della cellula.

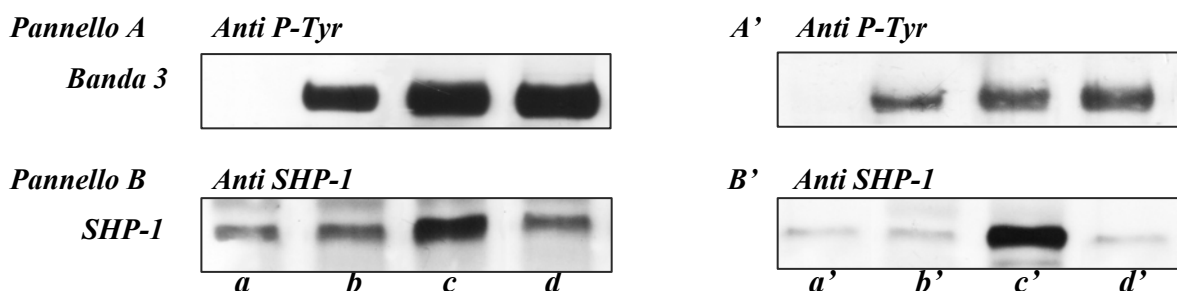
E' stato già caratterizzato il meccanismo di defosforilazione della banda 3 da parte della tirosin-fosfatasi SHP-2, che una volta legato alla fosfo-tirosina 359 della banda 3, defosforila gli altri tre siti tirosinici fosforilati della proteina, 8, 21 e 904.

Alla stessa classe di tirosin-fosfatasi contenenti domini SH2 appartengono le fosfatasi SHP-2 e SHP-1. Noi abbiamo identificato anche questo secondo enzima nel globulo rosso e abbiamo indagato sugli effetti che esso potrebbe avere sulla tirosin-fosforilazione della banda 3.

Per indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3, gli eritrociti sono stati incubati con diamide (Fig. 2.1, linee b, b'), un blando ossidante noto per agire a livello dei residui cisteinici delle proteine inducendo la formazione di ponti disolfuro o con N-etilen maleimide (NEM) (linee c, c'), un agente alchilante, o infine, con pervanadato (linee d), un forte perossidante. Tutti questi composti, agendo sulla cisteina presente nel sito catalitico delle tirosin-fosfatasi, sono inibitori dell'attività di questi enzimi. Come già riportato [Bordin et al., 2005], tutte queste condizioni inducono un'alta fosforilazione della banda 3, che è ridotta a circa metà in presenza di PP2, un noto inibitore della famiglia di chinasi Src. In questo modo è confermato il meccanismo di fosforilazione sequenziale della banda 3 da parte di due chinasi, di cui una appartenente alla famiglia Src.

Utilizzando la rivelazione con l'anticorpo anti-SHP-1 abbiamo identificato questa tirosin-fosfatasi sulla membrana eritrocitaria in condizioni basali (Pannello B, linea a). Abbiamo inoltre mostrato che, solo quando la fosforilazione della banda 3 era indotta dal trattamento degli eritrociti con NEM (linea c), ma non con diamide (linea b) o con pervanadato (linea d), si è verificata anche la traslocazione del SHP-1 dal citoplasma alla membrana (Pannello B). L'aggiunta di PP2, pur riducendo notevolmente la fosforilazione della banda 3, non ha alcun effetto sulla quantità di SHP-1 presente sulla membrana, né in condizioni basali (linea a'), né in caso di trattamento con NEM (linee b'-d').

Fig. 2.1:



Fosforilazione della banda 3 e reclutamento della fosfatasi SHP-1

Gli eritrociti (ematocrito al 20%) vengono incubati con diamide 2 mM (linee b, b'), NEM 1.5 mM (linee c, c') o con pervanadato 0.5 mM (linee d, d') in assenza (pannelli A, B) o presenza di PP2 5 μ M (pannelli A', B'). Le membrane (10 μ g) di ciascun campione, isolate come descritto in "Materiali e Metodi" sono state analizzate con la tecnica del Western blot e rivelate con anticorpo anti-P-Tyr (pannelli A, A') ed anti-SHP-1 (pannelli B, B').

La linea a riporta i risultati ottenuti dalle membrane delle cellule di controllo.

La figura è rappresentativa di tre diversi esperimenti.

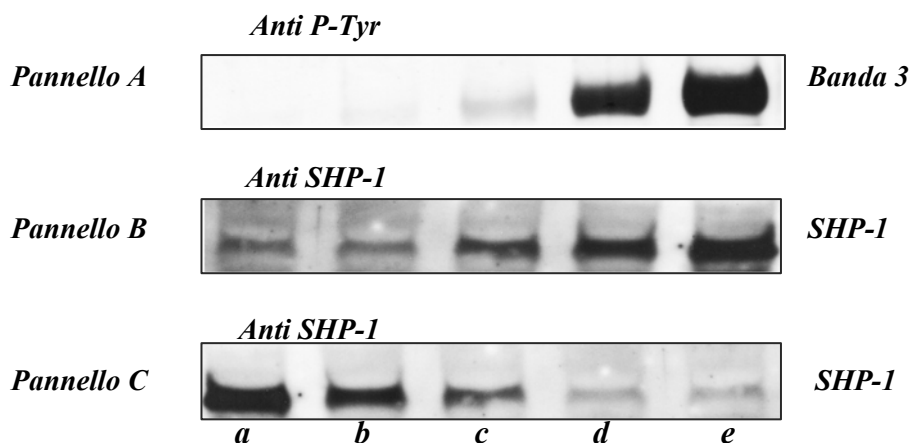
Questi risultati dimostrano che la traslocazione del SHP-1 dal citoplasma alla membrana è un processo indipendente dalla tirosin-fosforilazione della banda 3. Tale traslocazione, quindi, non avviene attraverso l'interazione dei domini SH2 della fosfatasi con le fosfo-tirosine della banda 3, come descritto per la fosfatasi SHP-2.

2. Effetto del NEM sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 e sul reclutamento del SHP-1 alle membrane

Per meglio valutare il reclutamento della fosfatasi SHP-1 alle membrane, gli eritrociti intatti sono stati incubati con concentrazioni crescenti di NEM. Come riportato in Fig. 2.2, sia il livello di fosforilazione della banda 3 (pannello A), che la traslocazione di SHP-1 alle membrane (pannello B), risultano direttamente proporzionali alla concentrazione di NEM utilizzata. L'aumento della quantità di fosfatasi nelle membrane è accompagnato da una diminuzione proporzionale nella controparte citoplasmatica (pannello C).

Il confronto degli ultimi due pannelli consente anche di stimare che il contenuto di SHP-1 nelle membrane in condizioni basali è di circa 5% e che, in seguito al trattamento con NEM, la quantità di enzima reclutato alla membrana raggiunge il 20% del totale.

Fig. 2.2



Effetto dose-dipendente del NEM sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 (pannello A), e sul reclutamento della fosfatasi SHP-1 dal citosol (pannello C) alle membrane (pannello B).

Gli eritrociti (ematocrito al 20%) vengono incubati senza trattamento (linea a), o con 0.5 mM (linea b), 1 mM (linea c), 1.5 mM (linea d) o 2 mM (linea e) di NEM. Le membrane (10 µg) (pannelli A e B) ed il citoplasma (1 µg) (pannello C) sono analizzate attraverso Western blot e rivelate con anticorpo anti-P-Tyr (Pannello A), e anti-SHP-1 (Pannelli B, C).

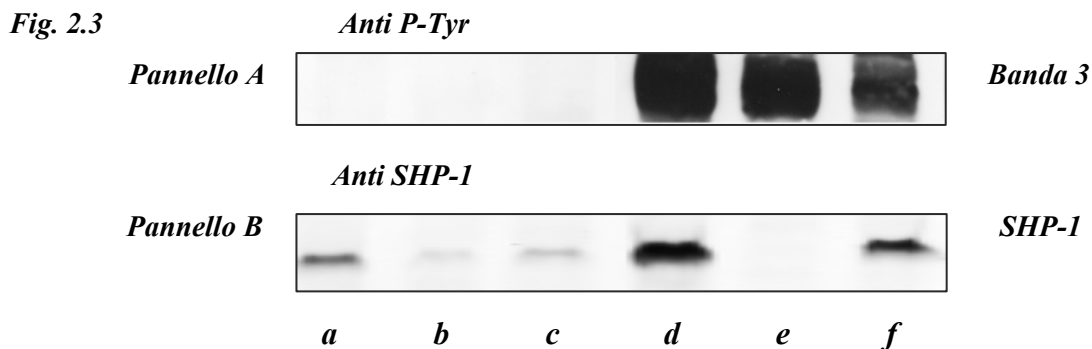
La figura è rappresentativa di tre diversi esperimenti.

3. Localizzazione della SHP-1 nella membrana eritrocitaria

Per identificare il sito di legame della tirosin-fosfatasi SHP-1 alla membrana, abbiamo estratto con 1% Triton X-100 le membrane provenienti da eritrociti non trattati (Fig. 2.3, linee a-c) o trattati con 2mM di NEM (linee d-f) e abbiamo analizzato il pattern di tirosin-fosforilazione della banda 3 e la corrispondente distribuzione della fosfatasi SHP-1 nelle due frazioni formate, solubile e insolubile, rappresentate dalla componente estraibile e dal citoscheletro.

Il 60% della tirosin-fosforilazione risultava a carico della frazione solubile della membrana, che comprende il 65% della banda 3 dell'eritrocita, mentre il restante 40% della fosforilazione coinvolge la frazione insolubile della membrana, che comprende il 35% della banda 3.

L'immunorivelazione con anticorpo anti-SHP-1 (pannello B) indicava che in condizioni basali (linee a-c) la fosfatasi era localizzata in quantità quasi uguale nella frazione solubile (linea b) come in quella citoscheletrica (linea c). In seguito al trattamento con NEM, non solo la fosfatasi veniva richiamata alle membrane (linea d), ma essa si localizzava completamente a livello della frazione citoscheletrica (linea f), richiamando anche l'enzima localizzato prima nella frazione solubile (linea e).



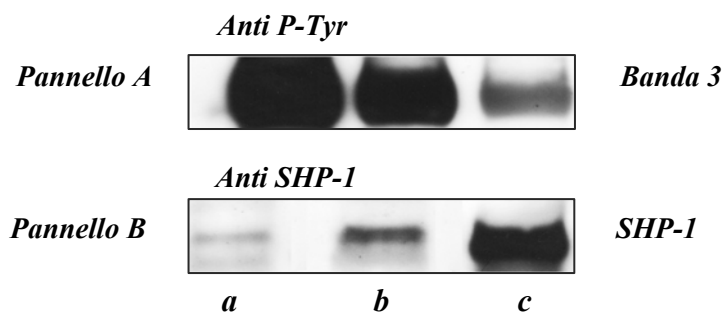
Distribuzione della fosfatasi SHP-1 nelle varie frazioni di membrana in seguito al trattamento con NEM. Gli eritrociti al 20% di ematocrito vengono incubati in presenza (linee d-f) o in assenza (linee a-c) di 2 mM NEM. Le membrane sono state estratte in tampone TRITON X-100 e sottoposte ad ultracentrifugazione. Membrane (10 µg) (linee a, d), estratti Triton (provenienti da 10 µg di membrane) (linee b, e) e porzione citoscheletrica (proveniente da 10 µg di membrane) (linee c, f) sono state analizzate con Western blot e rivelate con anticorpo anti-P-Tyr (pannello A) e con anticorpo anti-SHP-1 (pannello B). La figura è rappresentativa di tre diversi esperimenti.

Possiamo dedurre, ancora una volta, che il reclutamento di questa fosfatasi non sia mediato dal classico meccanismo di riconoscimento delle tirosine fosforilate (appartenenti alla banda 3) da parte dei domini SH2 della fosfatasi SHP-1, in quanto la traslocazione dell'enzima non avviene alla frazione Triton-solubile contenente la maggior parte della banda 3 fosforilata. Una possibile spiegazione per il reclutamento della fosfatasi al citoscheletro è quella che il trattamento con NEM induce una modifica conformazionale della membrana eritrocitaria, tale da richiamare il SHP-1 in questa frazione della membrana.

4. Banda 3, substrato per la fosfatasi SHP-1

Per valutare se la banda 3 possa essere un substrato della fosfatasi SHP-1, l'enzima è stato immunoprecipitato sia dalle membrane (Fig. 2.4, linea b) che dal corrispondente citoplasma (linea c) di eritrociti in condizioni basali, e la sua attività è stata testata su membrane eritrocitarie che in precedenza sono state sequenzialmente fosforilate da Syk e da Lyn. L'immunorivelazione dei campioni con anticorpi anti-P-Tyr (pannello A) indica una notevole defosforilazione della banda 3 (linee b, c), maggiore quando l'enzima era immunoprecipitato dal citoplasma, in quanto questo compartimento cellulare contiene più quantità di fosfatasi, come indicato dalla successiva immunorivelazione con anticorpi anti-SHP-1 (pannello B).

Fig. 2.4



Attività tirosin-fosfatase degli immunoprecipitati SHP-1 (SHP-1-IP), di membrana e di citoplasma, sulla banda 3 tirosin-fosforilata.

Immunoprecipitati SHP-1 vengono preparati come descritto nella sezione Metodi partendo dalle membrane (linea b) e dal citoplasma (linea c) di eritrociti in condizioni basali. Gli immunocomplessi vengono poi incubati a 30°C per 20 minuti con membrane eritrocitarie (10 µg) precedentemente fosforilate in sequenza dalle chinasi Syk e Lyn, sottoposti a Western blot, e rivelati con anticorpi anti-P-Tyr (pannello A) o anti-SHP-1 (pannello B).

La linea a rappresenta le membrane eritrocitarie fosforilate, incubate in assenza di immunocomplessi.

La figura è rappresentativa di quattro diversi esperimenti.

5. Siti fosfo-tirosinici della banda 3 defosforilati dalla fosfatasi SHP-1

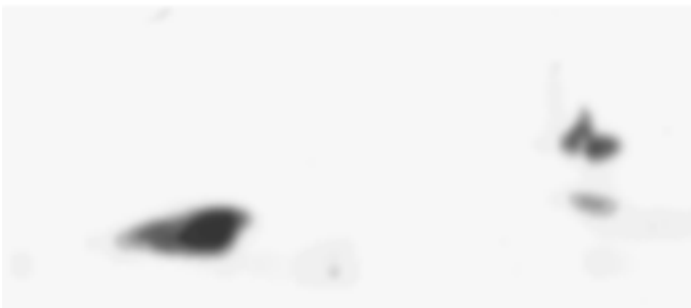
Per valutare la specificità di sito della SHP-1, campioni di membrane eritrocitarie sono stati prima fosforilati dalle chinasi Syk e Lyn in presenza di [γ -³²P]ATP e poi sono state incubate in presenza o assenza di SHP-1 immunoprecipitata dal citoplasma eritrocitario. Dopo aver sottoposto i campioni ad SDS-PAGE ed aver elettrotrasferito le proteine su nitrocellulosa, la banda 3 è stata identificata mediante autoradiografia. Successivamente, la banda 3 è stata estratta dalla nitrocellulosa e parzialmente digerita con tripsina. I peptidi risultanti sono stati analizzati in due dimensioni tramite una corsa elettroforetica su strato sottile di cellulosa, seguita da una cromatografia ascensionale. La digestione con tripsina della banda 3 ha portato alla formazione di quattro peptidi contenenti uno dei residui tirosinici 8, 21, 359 e 904. Il confronto dei peptidi risultati dal campione di controllo, contenente la banda 3 fosforilata (pannello A), con quelli risultati dal campione contenente la banda 3 prima fosforilata e poi defosforilata da SHP-1 (pannello B), ha portato all'identificazione dei residui fosfo-tirosinici defosforilati dalla fosfatasi. Anche SHP-1, come già dimostrato per SHP-2 [Bordin L. et. al., 2002], defosforila le fosfotirosine circondate da residui più acidi, 8, 21 e 904. La ³²P-Tyr 359, invece, circondata da residui neutri, e quindi localizzata nel frammento meno mobile, rimane ancora fosforilata, anche dopo l'aumento della quantità di fosfatasi utilizzato o prolungando il tempo di defosforilazione.

Fig. 2.5

Pannello A



Pannello B



Mappatura dei frammenti proteolitici della banda 3 ed identificazione delle ³²P-tirosine defosforilate dalla fosfatasi SHP-1.

Le membrane eritrocitarie, precedentemente fosforilate dalle chinasi Syk e Lyn in presenza di [μ -³²P]ATP, sono state incubate in assenza (pannello A) o in presenza (pannello B) di SHP-1 immunoprecipitata dal citoplasma di eritrociti non trattati. La banda 3 radioattiva è stata tagliata dalla nitrocellulosa e digerita con tripsina. I peptidi risultati dalla digestione sono stati prima sottoposti ad elettroforesi su strato sottile di cellulosa e successivamente ad una cromatografia ascensionale. Alla fine, i peptidi radioattivi sono stati identificati mediante autoradiografia.

I pannelli sono rappresentativi di tre separati esperimenti.

In conclusione, sia SHP-1 come l'altra tirosin-fosfatasi contenente domini SH2, SHP-2, defosforilano la banda 3 al livello delle stesse fosfo-tirosine 8, 21 e 904, ma attraverso meccanismi diversi: la SHP-2 si lega al residuo fosfo-tirosinico 359 e poi defosforila le altre tre fosfo-tirosine, mentre la SHP-1 si lega alla frazione citoscheletrica della membrana eritrocitaria, ma non al livello della banda 3, e defosforila gli stessi tre siti della proteina. La fosfo-tirosina 359 rimane ancora fosforilata e per la sua defosforilazione c'è bisogno dell'intervento di un'altra tirosin-fosfatasi.

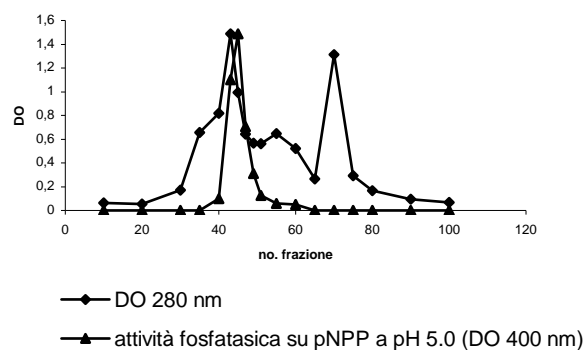
Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 mediante le Tirosin-Fosfatasi a Basso Peso Molecolare (LMW PTP)

1. Purificazione di una tirosin-fosfatasi acida dal citoplasma dell'eritrocita umano

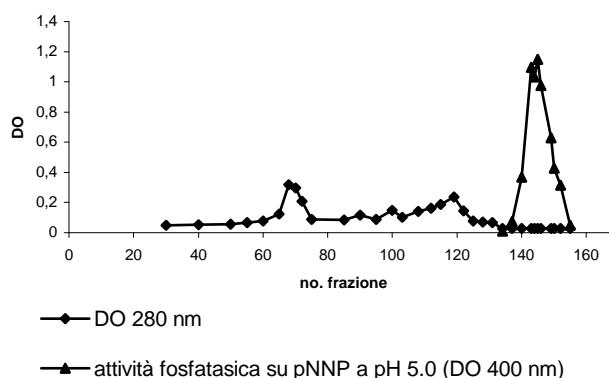
Nell'intento di ottenere la totale defosforilazione della banda 3, dal citoplasma del globulo rosso, abbiamo purificato una fosfatasi in grado di defosforilare il para-notrofenilfosfato (*pNPP*) ad un pH acido. Abbiamo sviluppato un metodo di purificazione molto semplice caratterizzato dalle seguenti tappe: una cromatografia a scambio ionico su DEAE-Sepharose seguita da precipitazione fino a 70% con solfato d'ammonio e quindi da una gel filtrazione su una colonna Sephadex G-75. A tale scopo abbiamo preparato 400ml di citoplasma proveniente dal trattamento dei globuli rossi in un tampone ipotonico. Questo citoplasma è stato cromatografato su colonna di DEAE-Sepharose precedentemente equilibrata con un tampone fosfato. Le proteine sono state eluite con un gradiente continuo di NaCl da 0 a 0.7 M. L'attività su *pNPP* è stata recuperata in un unico picco simmetrico eluito con 0.16-0.22 M NaCl (Fig. 3.1 A). Le frazioni contenenti il picco sono state raccolte e concentrate con solfato d'ammonio fino ad una concentrazione di 70%. Il precipitato, contenente tutta l'attività fosfataseica, è stato recuperato mediante centrifugazione. Dopo essere stato ripreso con 3 ml tampone imidazolo, il precipitato è stato caricato su la colonna Sephadex G-75, precedentemente equilibrata con tampone imidazolo contenente 0.5 M NaCl. Le proteine sono state eluite con lo stesso tampone. Questa nuova purificazione ha portato all'identificazione di un nuovo picco simmetrico di attività fosfataseica eluito con 298 ml tampone, cioè, in una regione corrispondente a delle proteine con il peso molecolare di circa 20 KDa, come mostrato dalla taratura della colonna (Fig. 3.1 B). E' stato ottenuto un picco quasi puro, giudicando dalla D.O. a 280nm rivelata in questa regione.

Fig. 3.1

Pannello A: DEAE-Sepharose



Pannello B: G-75 Sephadex



Purificazione della fosfatasi acida a basso peso molecolare

Pannello A: Cromatografia a scambio ionico DEAE Sepharose. La colonna (18 ×3 cm) è stata equilibrata con 25 mM sodio fosfato, 1mM EDTA, 0.02% NaN₃, 0.05 mM PMSF, 10mM mercaptoetano (pH 7.5). Sono stati caricati su colonna 20 ml citoplasma e l'eluizione è stata eseguita in 800ml gradiente continuo di NaCl 0- 0.7M. Sono state determinate l'attività fosfataseica su pNPP a pH 5 (▲) e la concentrazione proteica (A₂₈₀, ■).

Pannello B: Gel filtrazione su G-75 Sephadex. Il preparato enzimatico ottenuto dopo la prima colonna è stato caricato su una colonna di G-75 Sephadex (125× 32.5 cm) equilibrata con tampone contenente 25 mM imidazolo, 1mM EDTA, 0,5 M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.05mM PMSF, 10mM mercaptoethanol (pH 7), utilizzato anche per l'eluizione dell'enzima. Sono state determinate l'attività fosfataseica su pNPP a pH 5 (▲) e la concentrazione proteica (A₂₈₀,◆).

Partendo da un volume relativamente piccolo di citoplasma, contenente 1677 mg di proteine totali, proveniente da sangue fresco (lo stoccaggio a -80°C inattiva l'enzima), abbiamo ottenuto 1,2 mg di proteina finale con un'alta attività specifica. Come risulta nella Tabella 1 è stata ottenuta un'attività specifica di 3166.66 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, corrispondente ad un recupero dell'attività totale del 35 %. L'enzima finale era stabile a 4°C per qualche mese. Per prolungare la sua stabilità l'enzima può essere trattato con 3.5 mM solfato d'ammonio.

Tabella 1:

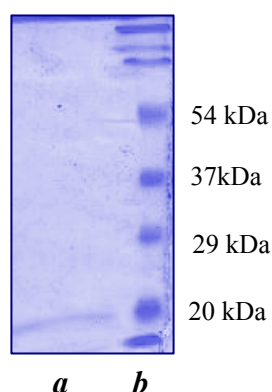
Tapa	Proteine (mg)	Unità	Attività specifica	Recupero (%)
Emolisato	1677	10 800	6,4	100
DEAE-sepharose	29,04	9860	340	91
70% ammonio solfato	8,4	4161	495	38
G-75 Sephadex	1,2	3800	3166,66	35

2. Caratterizzazione della fosfatasi acida purificata

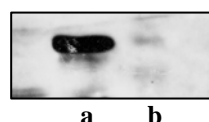
Un'aliquota del preparato ottenuto come sopra indicato è stata sottoposta a SDS-PAGE 15%. Il gel ottenuto, colorato con Coomassie Blue, ha rivelato un'unica banda di peso molecolare attorno a 20 kDa, come indicato in Fig. 3.2 A. Il Western blot seguito da immunorivelazione con anticorpi anti-LMW PTP del campione mostra che la fosfatasi purificata è la tirosin-fosfatasi acida a basso peso molecolare o "Low Molecular Weight Phospho-tyrosine Phosphatase" (LMW PTP) (Fig. 3.2 B).

Fig. 3.2

Pannello A:



Pannello B:

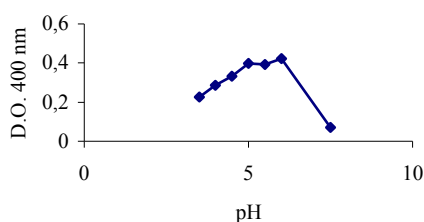


Identificazione della fosfatasi a basso peso molecolare

L'uscita della gel filtrazione è stato concentrato e caricato su gel di poliacrilamide al 15% e sottoposto all'elettroforesi. In seguito il gel è stato colorato con Coomassie Blue (Pannello A) o trasferito su nitrocellulosa e immunorivelato con anticorpi anti-LMW PTP (Pannello B). Linea a rappresenta l'enzima purificato, mentre linea b i marker di peso molecolare.

L'attività fosfataseica dell'enzima sul *pNPP* a 30°C è stata saggiata in un range di pH tra 3 e 7.5, mostrando un pH ottimale tra 5 e 6. Quindi abbiamo scelto il pH 5 per il saggio dell'attività di questo enzima negli esperimenti successivi.

Fig. 3.3



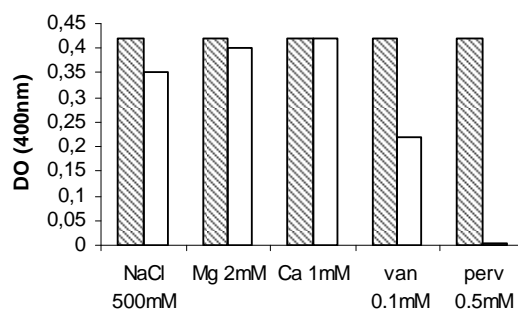
Influenza del pH sull'attività enzimatica della fosfatasi acida.

L'attività della fosfatasi a basso peso molecolare purificata è stata misurata incubando l'enzima, per 5' a 30°C, con il *pNPP* a vari pH. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di NaOH 1M. È stata misurata la D.O. a 400 nm.

Abbiamo calcolato la costante di Michaelis-Menten (K_m) ed il V_{max} dell'enzima purificato, avendo come substrato *p*NPP. A pH 5 abbiamo ottenuto valori di 0.8 mM e 16 $\mu\text{mol}/\text{minmg}$ rispettivamente per questi parametri.

Figura 3.4 mostra l'influenza dei sali e degli inibitori tirosin-fosfatasi sull'attività dell'enzima purificato. Come si può notare, l'attività fosfatasi su *p*NPP a 30°C e pH 5 è influenzata pochissimo da NaCl 500mM e da sali di calcio 1mM o magnesio 2mM. L'aggiunta di alcuni inibitori tirosin-fosfatasi, come vanadato a 0.1 mM e pervanadato a 0.5 mM, riducevano invece fortemente l'attività fosfatasi dell'enzima (Fig. 3.4). Inoltre essa veniva totalmente inibita da metalli pesanti come Cu e Zn a 1mM.

Fig. 3.4



Influenza dei sali e degli inibitori fosfatasi sull'attività enzimatica della fosfatasi acida.

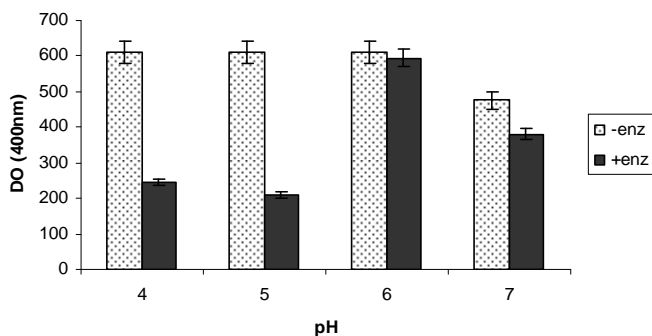
L'enzima è stato incubato per 5' a 30°C, con il pNPP in presenza di NaCl 500mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 1 mM, vanadato 0.1 mM e pervanadato 0.5 mM. L'attività è stata determinata misurando la D.O. a 400nm, dopo l'aggiunta di 1 mM NaOH.

3. LMW PTP defosforila la proteina banda 3

a. pH ottimale

Per investigare se la banda 3 potesse essere un substrato per la fosfatasi a basso peso molecolare, abbiamo incubato a vari pH le membrane eritrocitarie precedentemente tirosin-fosforilate con diamide in presenza o in assenza dell'enzima purificato e abbiamo analizzato il livello di tirosin fosforilazione della banda 3. Come mostrato nella Fig. 3.5 la banda 3 viene tirosin-defosforilata dalla fosfatasi aggiunta ed il pH ottimale di defosforilazione è compreso tra 4 e 5. A pH 6 o 7 si nota solo una minima defosforilazione. A pH 7 inoltre sono attive anche le fosfatasi intrinseche di membrana, quindi la defosforilazione della banda 3 è un effetto cumulativo dell'attività di queste ultime e della fosfatasi a basso peso molecolare estrinseca aggiunta.

Fig. 3.5



Influenza del pH sulla defosforilazione della banda 3 da parte della fosfatasi a basso peso molecolare

Le membrane fosforilate con diamide, contenenti 2.5 µg banda 3, sono state incubate per 30' a 30°C con la fosfatase acida (15 U) a vari pH. La reazione è stata fermata con l'aggiunta di SDS-mercaptoetanololo seguita dall'incubazione a 100°C per 5'. I vari campioni sono stati analizzati con SDS-PAGE seguito da Western Blotting e immunorivelazione con anticorpi anti-P-Tyr e anti Banda 3. . I valori rappresentano ± deviazione standard (SD) di quattro esperimenti eseguiti in triplicato.

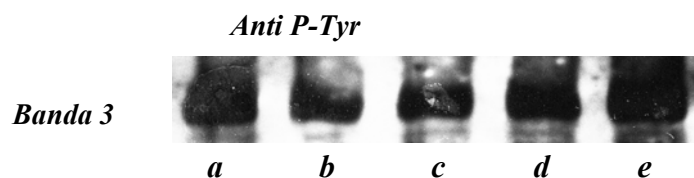
Per gli esperimenti successivi abbiamo scelto sempre il pH 5 per il saggio dell'attività tirosin-fosfatase dell'enzima quando come substrato viene utilizzata la banda 3.

E' stata calcolata la K_m dell'enzima utilizzando come substrato la banda 3 che è risultata essere pari a 0.8 mM.

b. L'effetto degli inibitori tirosin-fosfatase sull'attività dell'enzima purificato

La defosforilazione della banda 3 con la fosfatasi a basso peso molecolare è stata eseguita in presenza dei noti inibitori tirosin-fosfatase, diamide (Fig. 3.6, linea c), NEM (linea d) e pervanadato (linea e). Dalla Fig. 3.6, confrontando la banda 3 defosforilata in presenza degli inibitori (linee c, d, e) con quella defosforilata in assenza di inibitori fosfatase (linea b), si può dedurre l'effetto che i composti esercitano sul processo defosforilativo: la presenza della diamide riduce il livello di tirosin-defosforilazione della banda 3 indotta dalla fosfatase, ma in maniera minore rispetto al NEM (cfr. linee c e d con linea b). Il pervanadato, invece, forte inibitore fosfatase, ad una concentrazione di 0.5 mM, ristabilisce completamente il livello di tirosin-fosforilazione iniziale della banda 3 (cfr. linea e con linea a).

Fig. 3.6



Influenza degli inibitori fosfatasi sulla defosforilazione della banda 3 da parte della fosfatasi a basso peso molecolare

Le membrane fosforilate con diamide, contenenti 2.5 µg banda 3, sono state incubate per 30' a 30°C con la fosfatase acida (15 U) in tampone acetato a pH 5 in assenza (linea b) o in presenza di 2 mM diamide (linea c), 2 mM N-etilen-maleimide (NEM) (linea d) o 0.5 mM pervanadato (linea e). Linea a rappresenta membrane incubate senza la fosfatasi acida. La reazione è stata fermata con l'aggiunta di SDS-mercaptoetanolo seguita dall'incubazione a 100°C per 5'. I vari campioni sono stati analizzati con SDS-PAGE seguito da Western Blotting e immunorivelazione con anticorpi anti-P-Tyr.

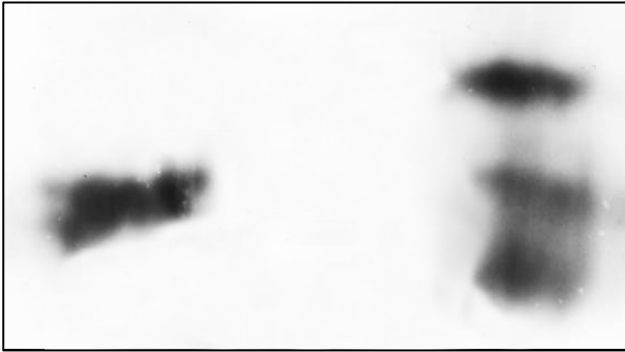
4. Siti fosfo-tirosinici della banda 3 defosforilati della fosfatasi acida a basso peso molecolare

Per identificare quali dei quattro siti fosfo-tirosinici della banda 3 sono interessati dalla defosforilazione con la LMW PTP, le membrane eritrocitarie sono state prima fosforilate con le chinasi Syk e Lyn in presenza di [γ -³²P]ATP e poi sono state incubate in presenza o assenza della fosfatasi acida purificata. Dopo aver sottoposto i campioni ad SDS-PAGE ed elettrotrasferimento su nitrocellulosa, la banda 3 è stata identificata mediante autoradiografia. La proteina è stata poi estratta dalla nitrocellulosa e digerita con tripsina. I peptidi risultanti sono stati analizzati tramite un'elettroforesi bidimensionale su strato sottile di cellulosa, seguita da una cromatografia ascensionale. Fig 3.7 mostra la mappa bidimensionale dei quattro peptidi, contenenti i quattro siti tirosinici fosforilati della banda 3: 8, 21, 359 e 904, risultati dai campioni incubati in assenza (pannello A) o in presenza (pannello B) della fosfatasi a basso peso molecolare. Il confronto tra i due pannelli dimostra chiaramente come la defosforilazione da parte della LMW PTP interessi tutti e quattro i residui tirosinici fosforilati della proteina.

Si è ottenuto, quindi, per la prima volta la defosforilazione totale della proteina banda 3 della membrana eritrocitaria, un processo di importanza fisiologica, in quanto ristabilisce l'equilibrio basale tra i processi di fosforilazione e defosforilazione della proteina.

Fig. 3.7

Pannello A:



Pannello B:



Mappatura dei frammenti proteolitici della banda 3 ed identificazione delle ³²P-tirosine defosforilate dalla fosfatasi a basso peso molecolare.

Le membrane eritrocitarie, precedentemente fosforilate dalle chinasi Syk e Lyn in presenza di [μ -³²P]ATP, sono state incubate in assenza (pannello A) o in presenza (pannello B) della fosfatasi a basso peso molecolare purificata dal citoplasma degli eritrociti. La banda 3 radioattiva è stata tagliata dalla nitrocellulosa e digerita con tripsina. I peptidi risultati dalla digestione sono stati prima sottoposti ad elettroforesi su strato sottile di cellulosa e successivamente ad una cromatografia ascensionale. Alla fine, i peptidi radioattivi sono stati identificati mediante autoradiografia.

I pannelli sono rappresentativi di due separati esperimenti.

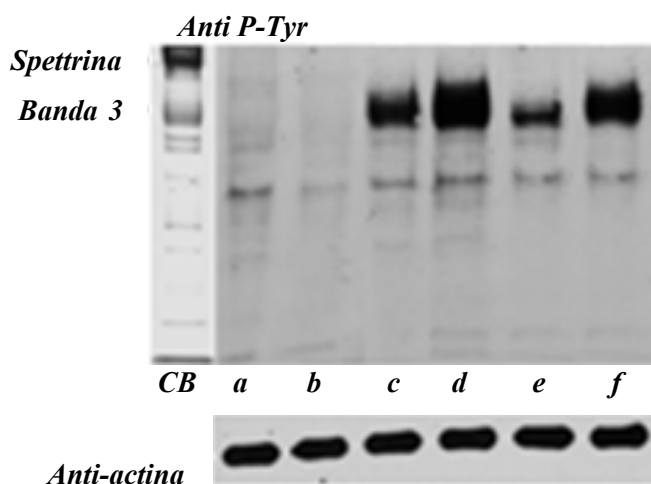
Idrossilamindapsona induce la rimozione prematura degli eritrociti attraverso la riorganizzazione della membrana

1. Induzione della tirosin-fosforilazione della banda 3 da parte del DDS-NHOH

La tirosin-fosforilazione della banda 3 è coinvolta nella regolazione di alcuni processi cellulari come la glicolisi [Low et al., 1993], il trasporto attraverso le membrane [De Franceschi et al., 1997], il volume e la forma cellulare [Bordin et al., 1995] e recentemente è stato proposto anche il suo coinvolgimento nella regolazione della morte cellulare [Pantaleo A. et al., 2008]. Per caratterizzare meglio quest'ultimo ruolo della tirosin-fosforilazione della banda 3, abbiamo utilizzato l'idrossilamindapsona (DDS-NHOH), sostanza in grado di indurre l'emolisi dell'eritrocita.

Gli eritrociti umani sono stati incubati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH per 30', con l'intento di seguire gli effetti che questo composto potrebbe avere sulle proteine della membrana eritrocitaria. Si è notato un incremento del livello della tirosin-fosforilazione delle proteine di membrana, soprattutto della proteina banda 3, in maniera dose dipendente raggiungendo un massimo a 0.3 mM di DDS-NHOH (Fig. 4.1, linea d). A più alte concentrazioni si nota un decremento della tirosin-fosforilazione della banda 3. L'utilizzo del dapsona, invece non ha portato alla modifica del livello di tirosin fosforilazione a nessuna concentrazione o tempo di incubazione (Fig. 4.1).

Fig. 4.1



L'effetto del DDS e DDS-NHOH sulla tirosin-fosforilazione della banda 3.

Gli eritrociti sono stati incubati con concentrazioni crescenti di DDS (nessuna capace di innescare la fosforilazione della banda 3, quindi mostrata solo una concentrazione (linea b)) o di DDS-NHOH: 0.15 mM (linea c), 0.3 mM (linea d), 0.6 mM (linea e). Le membrane (10 µg) erano analizzate attraverso Western blotting e immunorivelati con anticorpi anti fosfo-tirosina o anti actina per il controllo quantitativo. Il pattern di membrane provenienti da eritrociti trattati con 1 mM diamide (linea f) è stato utilizzato per

confrontare il livello di tirosin-fosforilazione. Linea CB: colorazione con Coomassie Blue delle proteine della membrana eritrocitaria.

Confrontando l'abilità del DDS-NHOH di indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3 con quella della diamide, il livello massimo raggiunto dal DDS-NHOH era comparabile con quello ottenuto da 1mM diamide. Quando è stato aggiunto anche PP2, inibitore delle chinasi Src, il livello di tirosin-fosforilazione della banda 3 indotto dal DDS-NHOH cala drasticamente (dati non mostrati), confermando che la fosforilazione della banda 3 avviene anche in questo caso secondo il meccanismo sequenziale in due fasi, coinvolgenti le tirosin-chinasi Syk e Lyn, già descritto.

2. Livello di tirosin-fosforilazione della banda 3 ed il reclutamento degli enzimi implicati in questo processo

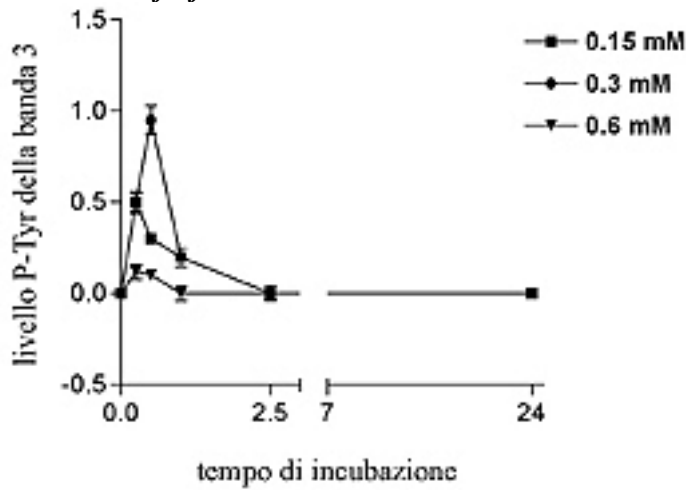
Per caratterizzare meglio le alterazioni indotte dal DDS-NHOH negli eritrociti umani, abbiamo testato le stesse concentrazioni di prima, con tempi crescenti di incubazione. Come mostrato in Fig. 4.2, DDS-NHOH induce un massimo di tirosin-fosforilazione della banda 3 in 30' a 0.3 mM, fosforilazione che viene completamente reversata dopo 45' di incubazione. Una relativamente bassa concentrazione di DDS-NHOH (0.15 mM) ha effetto dopo 15', pero a una più bassa intensità, effetto che sparisce più rapidamente, dopo 30' di incubazione. L'aggiunta di 0.6 mM DDS-NHOH induce solo una leggera tirosin-fosforilazione della banda 3 che sparisce quasi completamente dopo 30' di incubazione (pannello A).

Quando le membrane erano analizzate con anticorpi anti-Syk (pannello B) o anti-SHP-2 (pannello C), veniva rivelato un reclutamento di ambedue gli enzimi in maniera dose e tempo dipendente. Le membrane trattate con 0.6 mM mostravano un contenuto di enzimi sei volte maggiore rispetto al controllo.

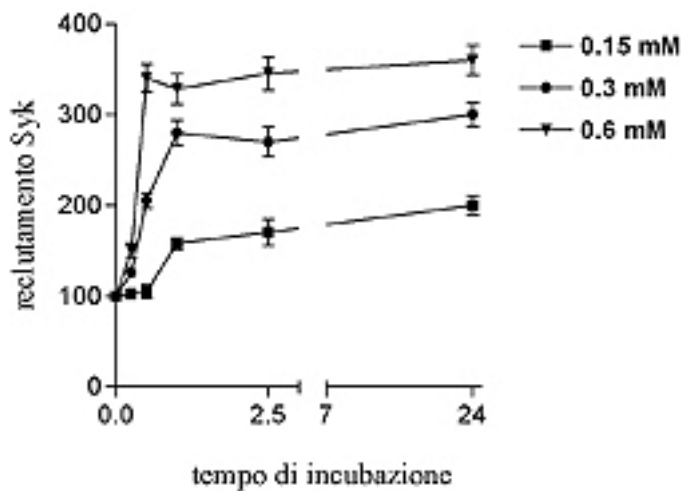
In un lavoro precedente abbiamo dimostrato che la traslocazione di Syk alle membrane, come conseguenza al trattamento con una serie di sostanze in grado di indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3, è un evento indipendente dalla tirosin-fosforilazione [Bordin et. al., 2005]. Anche nel caso del DDS-NHOH il reclutamento del Syk avviene in maniera indipendente dalla tirosin-fosforilazione. La traslocazione del SHP-2 alle membrane, fin'ora nota, invece, segue la tirosin-fosforilazione del residuo 359 della banda 3 indotta da Lyn, che è il sito di aggancio per questa fosfatasi. Nel caso del DDS-NHOH, il reclutamento del SHP-2 ha un andamento diverso, non fosforilazione-dipendente. Questo può essere dovuto alle modifiche di membrana indotte da questo composto che producono dei nuovi siti di legame per la fosfatasi.

Fig. 4.2

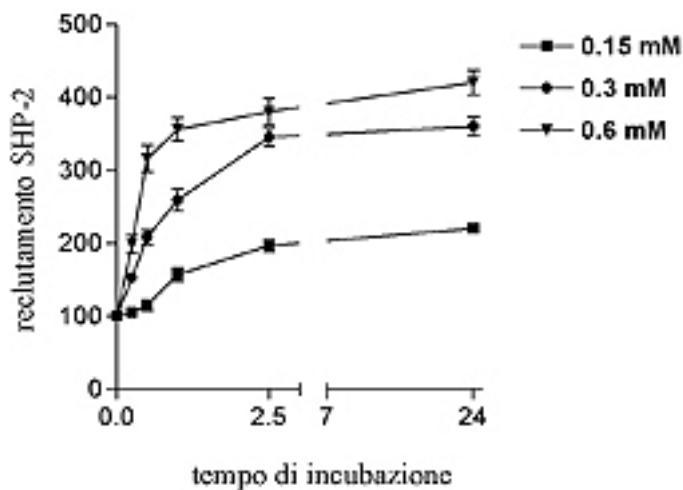
Pannello A: Effetto del DDS-NHOH sulla tirosin-fosforilazione della banda 3



Pannello B: Effetto del DDS-NHOH sul reclutamento del Syk



Pannello C: Effetto del DDS-NHOH sul reclutamento del SHP-2



Effetto dose e tempo dipendente del DDS-NHOH sul processo di tirosin-fosforilazione della membrana

Gli eritrociti sono stati trattati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH e incubati a 35°C. Sono state prese aliquote a vari tempi di incubazione e sono state ottenute le membrane da ognuna di loro. Le membrane (10 µg) sono state analizzate attraverso Western blotting e immunorivelati con anticorpi anti fosfo-tirosina (Pannello A), anti Syk (Pannello B), o anti SHP-2 (Pannello C).

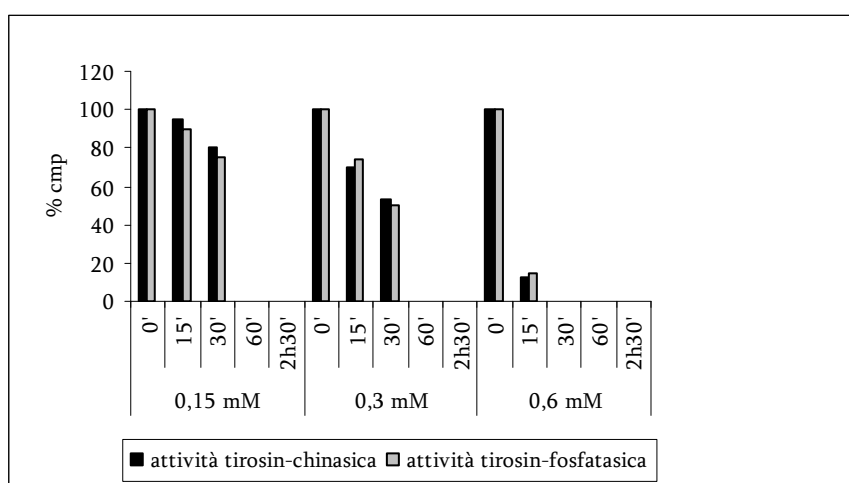
La figura è rappresentativa di sei distinti esperimenti.

Analisi densitometrica: Le bande corrispondenti alla tirosin-fosforilazione della banda 3, Syk e SHP-2 sono state contate in un densitometro. L'intensità delle bande del Syk e SHP-2 in cellule non stimolate è stata considerata 100%, invece il valore arbitrario di 1 è stato assegnato all'intensità della banda corrispondente alla tirosin-fosforilazione della banda 3 ottenuta dal trattamento con 1 mM diamide. I risultati rappresentano medie di quattro esperimenti separati eseguiti in duplicato \pm SEM, $p < 0.01$.

3. Effetto del DDS-NHOH sull'attività enzimatica

In Fig. 4.3 sono presentate le attività chinasiche e fosfatasiche totali espresse nelle cellule dopo i trattamenti con le varie concentrazioni di DDS-NHOH e ai vari tempi di incubazione. A questo proposito, le cellule sono state sottoposte a vari cicli di congelamento/scongelo e le attività sono state saggiate utilizzando come substrato cdb3, per l'attività chinasiche o ^{32}P -cdb3, per l'attività fosfatasiche. Abbiamo trovato che tutte e due le attività erano inibite dal composto in maniera dose e tempo dipendente e che la totale inattivazione è stata raggiunta dopo 60' di incubazione con 0.15 e 0.3 mM. Per 0.6 mM si è avuta l'inibizione totale già dopo 15'.

Fig. 4.3



Attività tirosin-chinasica e tirosin-fosfatase

Gli eritrociti sono stati trattati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH per vari tempi d'incubazione e sottoposti a vari cicli di congelamento/scongelo. Delle aliquote (3 μ l) di lisato totale, così ottenuto, sono state incubate con cdb3, per l'attività chinasiche o ^{32}P -cdb3, per l'attività fosfatasiche. I valori sono espressi in percentuale rispetto al valore di controllo (N=3), $p < 0.05$.

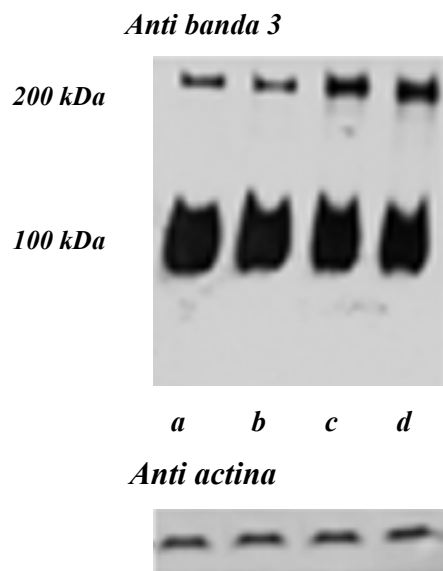
Questi risultati suggeriscono che l'innescò della tirosin-fosforilazione della banda 3 non è dovuto ad uno sbilanciamento tra le attività chinasiche e fosfatasiche, ma più probabilmente ad una favorevole interazione chinasi-substrato, al meno fino a 0.3 mM nei primi 30'. Il prolungamento del tempo

d'incubazione o l'aumento della concentrazione del composto determinano non solo la totale scomparsa della fosforilazione, ma anche la totale inibizione degli enzimi implicati. Questo comportamento suggerisce una sorta di progressione del meccanismo d'azione del composto.

4. Effetto del DDS-NHOH sull'aggregazione della banda 3

Uno dei meccanismi proposti per la rimozione del globulo rosso prevede l'aggregazione della banda 3 come marker di riconoscimento da parte degli anticorpi autologhi. E' stato dimostrato che lo stress ossidativo porta alla formazione di ponti bisolfuro tra le molecole di banda 3 inducendo la sua aggregazione. Per caratterizzare meglio il meccanismo di azione di DDS-NHOH abbiamo indagato sulla possibilità di formazione di aggregati di banda 3. Le membrane provenienti da eritrociti incubati con varie concentrazioni di DDS-NHOH, preparate in condizioni non riducenti, sono state analizzate con anticorpi anti-banda 3. Come si può notare in Fig. 4.3 e 4.4 il composto induce l'incremento di una banda a 180-200 kDa, che rappresenta aggregati ad alto peso molecolare (HMWA) di banda 3, a concentrazioni maggiori di 0.15 mM (Fig. 4.3). Questo riarrangiamento di membrana diventa più evidente quando si prolunga il tempo d'incubazione (Fig. 4.4), confermando un effetto progressivo del composto.

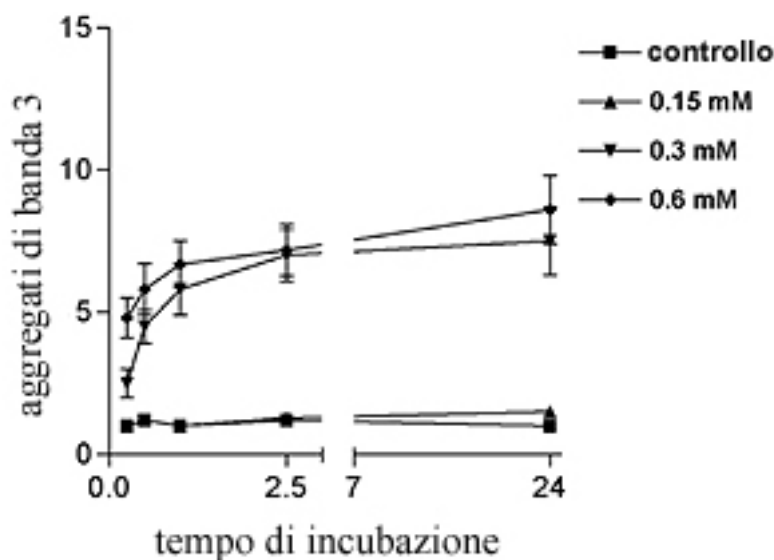
Fig. 4.3



Effetto dose-dipendente del DDS-NHOH sulla aggregazione della banda 3

Gli eritrociti sono stati trattati con 0.15 mM (linea b), 0.3 mM (linea c) e 0.6 mM (linea d) DDS-NHOH per 30'. Le membrane (1µg) sono state analizzate con la tecnica di SDS/PAGE in condizioni non-riducenti, trasferite su nitrocellulosa e immunorivelate con anticorpi anti-banda 3 o anti-actina per controllo. La figura è rappresentativa di sei diversi esperimenti.

Fig. 4.4



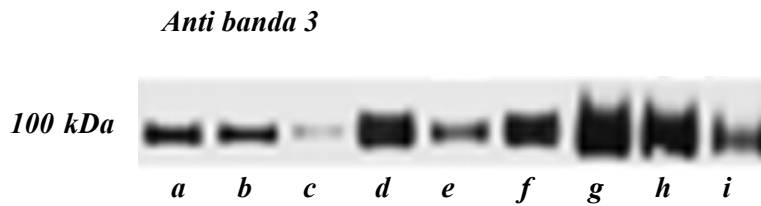
Effetto tempo-dipendente del DDS-NHOH sulla aggregazione della banda 3

Gli eritrociti sono stati trattati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH o solvente (controllo) per vari tempi d'incubazione. Le membrane ($1\mu\text{g}$) sono state analizzate con la tecnica di SDS/PAGE in condizioni non-riducenti, trasferite su nitrocellulosa e immunorivelate con anticorpi anti-banda 3. I valori mostrati nel grafico sono stati ottenuti con l'analisi densitometrica dell'intensità delle bande. Un'unità è stata considerata l'intensità degli aggregati di banda 3 in cellule non stimolate. I risultati rappresentano medie di sei esperimenti separati realizzati in duplicato \pm SEM, $p < 0.01$.

5. Riorganizzazione del citoscheletro indotta da DDS-NHOH

In seguito, abbiamo voluto sapere quale delle due popolazioni di banda 3, libera o legata al citoscheletro, sia implicata nell'aggregazione. Le cellule sono state trattate con 0.3 mM DDS-NHOH per 30', condizioni che inducono il massimo livello di tirosin-fosforilazione della banda 3, e per un tempo più lungo d'incubazione (fino a 24 ore), quando la fosforilazione è assente. Le membrane ottenute dalle cellule così trattate sono state estratte con Triton X-100 e sono state separate le due frazioni: Triton-solubile e Triton-insolubile. Fig. 4.5 mostra che nei primi 30' di incubazione l'aggregazione della banda 3 interessa solo la frazione della proteina solubile in Triton, mentre prolungando il tempo d'incubazione, non solo la quantità di aggregati aumenta, ma si nota anche una riorganizzazione della membrana con il citoscheletro contenente quasi tutta la banda 3 organizzata in complessi ad alto peso molecolare.

Fig. 4.5



Distribuzione degli aggregati ad alto peso molecolare della banda 3 tra le frazioni Triton-solubile ed –insolubile

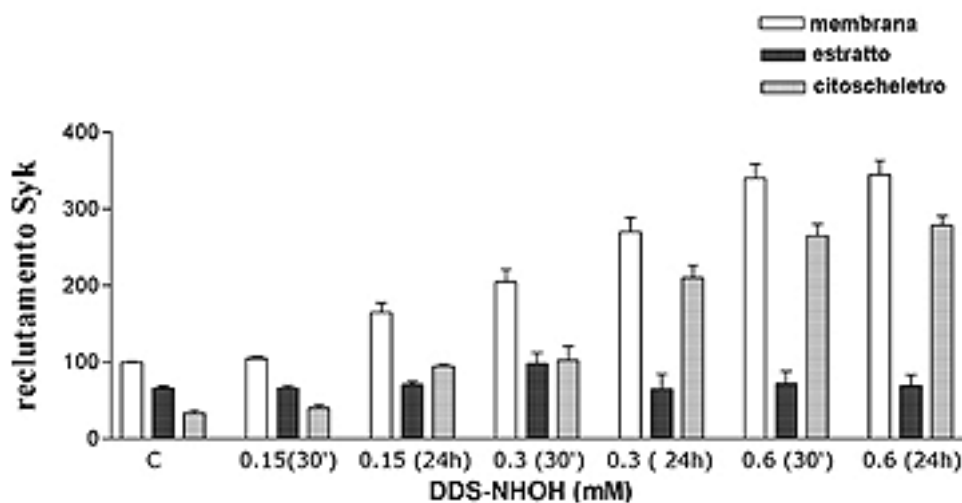
Gli eritrociti sono stati trattati con 0.3 mM DDS-NHOH (linee d-i) o con il solvente (linee a-c), per 30' (linee d-f) o per un tempo prolungato (2h30' e 24h, che mostrano pattern simili) (linee g-i). Le membrane (10 μ g) sono state estratte con Triton X-100. Le membrane (linee a, d, g) e le frazioni Triton-solubile (linee b, e, h) ed –insolubile (citoscheletro) (linee c, f, i), ottenute attraverso l'ultracentrifugazione, sono state analizzate con la tecnica di SDS/PAGE in condizioni non-riducenti, trasferite su nitrocellulosa e immunorivelate con anticorpi anti-banda 3. La figura è rappresentativa di cinque separati esperimenti.

6. Effetto del DDS-NHOH sulla redistribuzione enzimatica

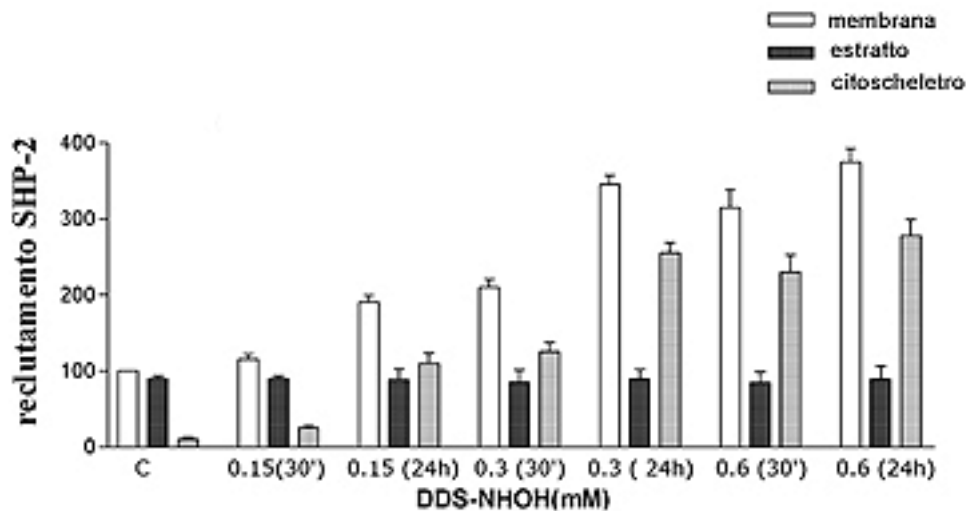
In seguito abbiamo analizzato la distribuzione dei principali enzimi implicati nella fosforilazione/defosforilazione della banda 3, Syk e SHP-2, rispettivamente, nelle frazioni Triton-solubile e –insolubile. Dopo l'incubazione degli eritrociti con le varie concentrazioni di DDS-NHOH e a vari tempi d'incubazione, le cellule sono state lisate e le membrane ottenute sono state estratte con Triton X-100. L'analisi delle frazioni risultate dimostra una prevalenza di legame di entrambi gli enzimi alla frazione citoscheletrica a tutte le concentrazioni e tempi d'incubazione.

Fig. 4.6

Pannello A: Ridistribuzione del Syk indotta da DDS-NHOH



Pannello B: Ridistribuzione del SHP-2 indotta da DDS-NHOH



Distribuzione degli enzimi dopo il trattamento con DDS-NHOH.

Gli eritrociti sono stati incubati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH o con il solvente (nel controllo) per 30', 2h30' e 24h. Le membrane (10 μ g) sono state estratte con Triton X-100. Le membrane totali, l'estratto Triton e la frazione Triton-insolubile sono state analizzate attraverso SDS-PAGE e immunorivelati con anticorpi anti-Syk (pannello A) o anti-SHP-2 (pannello B).

L'intensità delle bande corrispondenti al Syk e SHP-2 è stata contata in un densitometro. La quantità di Syk e SHP-2 presente nelle cellule non-stimate è stata considerata 100%. I risultati sono medie di tre separati esperimenti eseguiti in duplicato \pm SEM.

7. DDS-NHOH induce il legame degli anticorpi autologhi alle membrane eritrocitarie

Studi anteriori hanno messo in evidenza la tossicità del DDS-NHOH sugli eritrociti di ratto. L'emotossicità di questo composto è stata valutata attraverso la risposta emolitica del globulo rosso del ratto associata ad un'accelerata rimozione dell'eritrocita dalla circolazione. Studi paralleli sugli eritrociti umani hanno rivelato che, nonostante le alterazioni citoscheletriche indotte da DDS-NHOH, non ci sono evidenze dirette di una risposta emolitica o di riduzione della vita della cellula [McMillan et al., 1995].

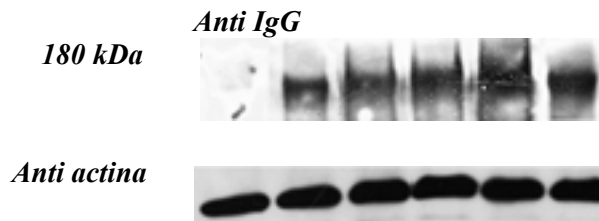
La rimozione degli eritrociti umani riguarda le cellule che presentano alterazioni significative indotte dai danni provocati dall'invecchiamento naturale, dalla tossicità o dalla malattia, ed è mediata dal riconoscimento anticorpale [Kay, 2005].

Analizzando le membrane provenienti da eritrociti umani sottoposti a trattamento con DDS-NHOH a varie concentrazioni e tempi di incubazione in presenza del plasma autologo (P-PP) attraverso l'immunorivelazione con anticorpi anti- IgG umani, abbiamo notato un aumento della presenza

degli anticorpi autologhi sulle membrane in maniera sia dose (Fig. 4.7) che tempo (Fig. 4.8) dipendente. In questo modo abbiamo riportato l'evidenza diretta dell'effetto del DDS-NHOH nell'eritrocita umano, che determina il riconoscimento anticorpale da parte degli anticorpi presenti nel circolo, caratteristica che porta alla rimozione della cellula.

Anche in questo caso si può notare un effetto progressivo del composto, con un iniziale debole riconoscimento anticorpale a 30' di incubazione con 0.3 e 0.6 mM, che aumenta fino a 24 ore di incubazione.

Fig. 4.7



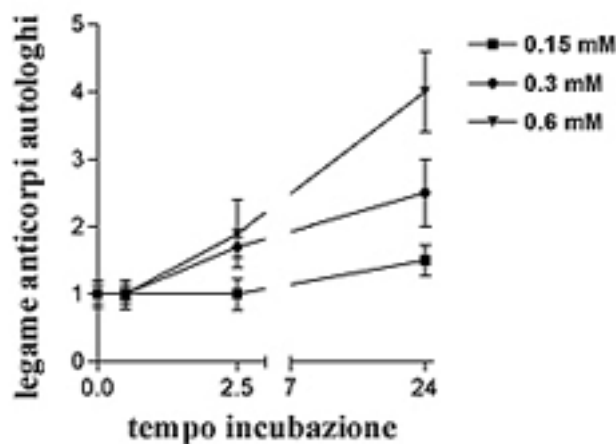
DDS-NHOH induce il legame degli anticorpi autologhi

Gli eritrociti sono stati trattati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH e incubati per 24h a 35°C in plasma autologo diluito in tampone PBS. Le membrane (15 µg) sono state analizzate con la tecnica di Western Blotting in condizioni non-riducenti e immunorivali con anticorpi anti- IgG umani o anti-actina come controllo quantitativo.

La linea Ctrl- rappresenta eritrociti incubati in PBS; Ctrl+ è stato ottenuto incubando gli eritrociti in plasma autologo con l'aggiunta di 2 mM diamide.

Figura è rappresentativa di tre separati esperimenti.

Fig. 4.8



DDS-NHOH induce il legame degli anticorpi autologhi

Gli eritrociti sono stati trattati con concentrazioni crescenti di DDS-NHOH e incubati per vari tempi di incubazione a 35°C in plasma autologo diluito in tampone PBS. Le membrane (15 µg) sono state analizzate con la tecnica di Western Blotting in condizioni non-riducenti e immunorivali con anticorpi anti- IgG umani o anti-actina come controllo quantitativo.

Le bande corrispondenti agli anticorpi autologhi sono state contate in un densitometro. La quantità di IgG legate alle cellule non-stimate è stata considerata arbitrariamente come unità. I risultati sono medie di sei esperimenti separati eseguiti in duplicato \pm SEM.

Questi dati, assieme a quelli che riguardano la formazione degli aggregati ad alto peso molecolare di banda 3, indicano una progressiva alterazione della membrana eritrocitaria che finisce con il riconoscimento anticorpale, condizione essenziale per l'eliminazione della cellula danneggiata. In questo processo la tirosin-fosforilazione iniziale della banda 3 non è che un segno delle modifiche successive subite della proteina.

CONCLUSIONI

Negli eritrociti umani il processo di fosforilazione/defosforilazione dei residui tirosinici delle proteine di membrana, specialmente della proteina banda 3, è implicato nella regolazione di diverse funzioni fra cui la regolazione del metabolismo [Low et al., 1993], il trasporto attraverso le membrane [De Franceschi et al., 1997], il volume e la forma cellulare [Bordin et al., 1995]. Recentemente è stato proposto il coinvolgimento di questo processo anche nella rimozione dell'eritrocita invecchiato [Pantaleo et al., 2008]. Il globulo rosso invecchiato subisce sulla superficie esterna delle modifiche, che lo rendono riconoscibile da parte degli anticorpi autologhi. Uno dei più probabili antigeni per gli anticorpi autologhi è rappresentato dalle modifiche conformazionali subite dalla proteina banda 3.

Come conseguenza dell'aumentato stress ossidativo, che caratterizza la senescenza cellulare, la proteina banda 3 può formare degli aggregati ad alto peso molecolare [Lutz et al., 1993] o può essere tirosin-fosforilata. La tirosin-fosforilazione della banda 3 avviene in maniera sequenziale, ad opera di due tirosin-chinasi, Syk e Lyn, che fosforilano i residui tirosinici 8, 21 e rispettivamente 359 e 904 [Brunati et al., 2000]. Mentre l'attivazione della chinasi Lyn è dovuta al legame dei suoi domini SH2 con le fosfo-tirosine 8 e 21 della banda 3, il segnale che attiva la tirosin-chinasi Syk rimane ancora sconosciuto.

La tirosin-chinasi Syk è stata purificata come oloenzima, chiamato $p72^{Syk}$, contenente due domini SH2 e un dominio catalitico, e come il prodotto di proteolisi dell'oloenzima, chiamato $p36^{Syk}$, contenente solo il dominio chinasi. Noi dimostriamo che il $p36^{Syk}$ è la forma più attiva dell'enzima, come risulta dalla sua più alta efficienza nel fosforilare sia il dominio intracitoplasmatico purificato della banda 3 (cdb 3), che la banda 3 di membrana. $p72^{Syk}$ presenta una più bassa efficienza di fosforilazione probabilmente dovuta alla presenza dei domini SH2 che possono, da una parte, esercitare un effetto inibitorio sul dominio catalitico dell'enzima, formare legami con le strutture di membrana, tali da allontanare l'enzima dal suo substrato, la banda 3.

Poiché sulla membrana eritrocitaria sono presenti enzimi proteolitici, che vengono attivati durante la senescenza [Bratosin et al., 2001], contribuendo così all'attivazione del $p72^{Syk}$ attraverso la sua trasformazione in $p36^{Syk}$, ipotizziamo che la funzione fisiologica della proteolisi del $p72^{Syk}$ sia quella di promuovere l'innescamento della tirosin-fosforilazione della banda 3. Infatti, la proteolisi del $p72^{Syk}$, portando alla rimozione dei domini SH2, facilita l'interazione del $p36^{Syk}$ formato con il suo substrato. La proteolisi potrebbe interessare solo poche molecole di $p72^{Syk}$, sufficienti per preparare le membrane per la successiva fosforilazione, catalizzata dall'oloenzima. La prefosforilazione della banda 3 da parte del $p36^{Syk}$ inducendo una modifica conformazionale della proteina, la rende più accessibile alla successiva fosforilazione da parte del $p72^{Syk}$. Che il meccanismo sia questo è

dimostrato dal fatto che l'aggiunta di leupeptina, inibitore della proteolisi del p72^{Syk}, determina un forte calo della fosforilazione della banda 3.

Nonostante il legame preferenziale del p72^{Syk} alla frazione citoscheletrica della membrana eritrocitaria, l'enzima non fosforila maggiormente la popolazione di banda 3 presente in questa frazione, ma ambedue le frazioni di banda 3, sia legata al citoscheletro, che libera nella membrana, in maniera proporzionale alla quantità di proteina presente nelle due sub-frazioni. Questo potrebbe essere spiegato dalla presenza sulle membrane degli enzimi proteolitici che trasformano il p72^{Syk} in p36^{Syk}, che non essendo più legato alle membrane, è libero di fosforilare omogeneamente tutte le bande 3 di membrana.

In conclusione, i riarrangiamenti di membrana e l'attivazione degli enzimi proteolitici, noti soprattutto nella senescenza del globulo rosso, potrebbero indurre, il reclutamento del p72^{Syk} alle membrane e la sua proteolisi con formazione di p36^{Syk}. Tutto questo porta alla fosforilazione della banda 3.

Negli eritrociti umani, il livello di tirosin-fosforilazione della banda 3 è altamente controllato e regolato anche dall'azione delle tirosin-fosfatasi. E' stato già identificato il meccanismo di defosforilazione della banda 3 da parte della tirosin-fosfatasi SHP-2. Essa si lega, attraverso i suoi domini SH2 alla fosfotirosina 359 della banda 3. Quando la fosfatasi è legata diventa molto attiva e defosforila gli altri tre residui fosfo-tirosinici della banda 3, 8, 21 e 904.

Un'altra tirosin-fosfatasi caratteristica della linea cellulare ematopoietica è la fosfatasi SHP-1. Essa appartiene, assieme alla SHP-2, alla famiglia di tirosin-fosfatasi non recettoriali contenenti il dominio SH2. Noi abbiamo identificato la tirosin-fosfatasi SHP-1 al livello del globulo rosso. Questo enzima è localizzato principalmente nel citoplasma e solo in piccola quantità sulla membrana plasmatica (5%). Il reclutamento della SHP-1 alle membrane non dipende dalla fosforilazione delle proteine di membrana ma dall'effettore usato. Infatti, sostanze in grado di indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3, come diamide e pervanadato, non alterano la distribuzione di SHP-1 tra membrane e citoplasma. Solo il trattamento degli eritrociti con NEM, oltre ad indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3, determina anche il reclutamento della fosfatasi dal citoplasma alle membrane. Tale reclutamento avviene esclusivamente alla frazione citoscheletrica. Questi risultati suggeriscono che il reclutamento della fosfatasi alla membrana non avviene attraverso l'interazione tra i domini SH2 dell'enzima con le fosfo-tirosine del substrato, ma implicano un riarrangiamento della membrana indotto dall'effettore. Inoltre la traslocazione dell'enzima al citoscheletro porta a pensare che la sua attività fosfatasica è diretta verso la frazione della banda 3 legata al citoscheletro (35% della quantità totale di banda 3).

L'importanza della localizzazione della SHP-1, tuttavia, rimane secondaria rispetto alla sua funzione all'interno della cellula. Infatti, la dimostrazione che la banda 3 viene nettamente defosforilata da questa fosfatasi, immunoprecipitata sia dalle membrane che dal citoplasma, ha portato un nuovo contributo alla determinazione del complesso sistema di regolazione del livello di tirosin-fosforilazione delle proteine della membrana eritrocitaria. Abbiamo trovato che SHP-1 defosforila i residui fosfo-tirosinici 8, 21 e 904 della banda 3. Queste fosfo-tirosine coincidono con quelle già identificate come bersagli dell'attività enzimatica di SHP-2. Tuttavia, nonostante si possa intuire una certa sovrapposizione dei ruoli delle due tirosin-fosfatasi, è opportuno sottolineare che, mentre l'attività di SHP-2 dipende strettamente dal suo reclutamento alla banda 3, tale riconoscimento non è necessario nel caso di SHP-1.

Abbiamo finora messo in evidenza come avviene la defosforilazione di tre dei quattro residui tirosinici della banda 3 da parte delle fosfatasi SHP-1 e SHP-2. Poiché in condizioni basali la proteina banda 3 si presenta totalmente defosforilata è necessario l'intervento di un'altra tirosin-fosfatasi per la defosforilazione anche della fosfo-tirosina 359 della proteina.

Dal citoplasma dei globuli rossi, attraverso una semplice procedura, abbiamo purificato un enzima capace di defosforilare il para-nitrofenilfosfato (*pNPP*). La caratterizzazione dell'enzima purificato (K_m , V_{max} , agenti inibitori) e la risposta agli anticorpi anti-Low Molecular Weight Phospho-Tyrosine Phosphatase (LMW PTP) hanno portato alla sua identificazione come la fosfatasi a basso peso molecolare.

L'enzima purificato è in grado di defosforilare non solo il dominio citoplasmatico della banda 3 (cdb 3), ma anche la banda 3 di membrana ad un pH ottimale pari a 5. Quindi, essendo una fosfatasi acida, interviene nel processo di defosforilazione in condizioni in cui le altre fosfatasi SHP-1 e SHP-2 sono inattive.

Molto importante è la sua capacità di defosforilare tutti i quattro siti tirosinici della banda 3. Abbiamo per la prima volta realizzato la defosforilazione totale di questa proteina, e, in questo modo, abbiamo reso completamente reversibile il processo di fosforilazione, riportando la banda 3 nelle condizioni basali.

E' stato proposto il coinvolgimento della tirosin-fosforilazione della banda 3 nel processo di senescenza del globulo rosso [Pantaleo et al., 2008]. Per indagare su questa ipotesi abbiamo utilizzato il metabolita del dapsona, l'idrossilamindapsona (DDS-NHOH), sostanza in grado di indurre l'emolisi dell'eritrocita. Nell'eritrocita, il DDS-NHOH innesca una catena di reazioni che iniziano nel citoplasma con la formazione di metaemoglobina, continua con l'inibizione delle tirosin-chinasi e -fosfatasi e termina con una generale riorganizzazione della membrana.

Questo composto è in grado di indurre la tirosin-fosforilazione della banda 3 che raggiunge il massimo dopo 30' di incubazione a 0.3 mM. A dosi maggiori o con l'incremento del tempo d'incubazione il livello di tirosin-fosforilazione diminuisce fino a scomparire totalmente. Il reclutamento degli enzimi Syk e SHP-2 alle membrane indotto dal composto avviene in maniera dose e tempo dipendente, quindi l'andamento della tirosin-fosforilazione della banda 3 non può essere spiegato attraverso il reclutamento al substrato degli enzimi implicati in tale processo. La fosforilazione della banda 3 indotta dal DDS-NHOH sembra piuttosto essere dovuta ad una favorevole interazione tra le chinasi ed il substrato, almeno fino al momento in cui il DDS-NHOH non ne inibisce l'attività.

La tirosin-fosforilazione della banda 3 segnala l'inizio di una serie di modifiche a livello della membrana concretizzate nell'aggregazione della proteina, che interessa inizialmente la frazione mobile, estraibile, della banda 3, ma che poi si sposta nella frazione citoscheletrica. Si ha così una prova della riorganizzazione della membrana eritrocitaria dovuta al prolungato trattamento dell'eritrocita con DDS-NHOH.

La formazione degli aggregati ad alto peso molecolare di banda 3 determina poi il legame degli anticorpi autologhi alla superficie esterna degli eritrociti, portando così alla rimozione prematura della cellula dalla circolazione.

Possiamo concludere che il DDS-NHOH induce un'effetto progressivo sulla membrana del globulo rosso umano, che inizia con la tirosin-fosforilazione della banda 3 e finisce con l'aggregazione di questa proteina e con il legame degli anticorpi autologhi. Quindi la tirosin-fosforilazione della banda 3 potrebbe essere un segnale delle successive modifiche della membrana, culminanti nella rimozione della cellula da parte dei macrofagi.

BIBLIOGRAFIA

Anderson R.A., Marchesi V.T. Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide. *Nature* 318: 295-298, 1985.

Baggio B., Bordin L., Clari G., Gambaro G., Moret V. Functional correlation between the Ser/Thiophosphorylation of band 3 and band 3-mediated transmembrane anion transport in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1148: 157-160, 1993.

Bajpai M., Chopra P., Dastidar S.G., Ray A. Spleen tyrosine kinase: a novel target for therapeutic intervention of rheumatoid arthritis. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 17: 641-659, 2008.

Bennett A.M., Tang T.L., Sugimoto S., Walsh C.T., and Neel B.G. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(15): 7335-7339, 1994.

Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm *Biorheology* 27: 327-344, 1990.

Boivin P., Galand C. The human red cell acid phosphatase is a phosphotyrosine protein phosphatase which dephosphorylates the membrane protein band 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 557-564, 1986.

Bordin L., Brunati A.M., Donella-Deana A., Baggio B., Toninello A., Clari G. Band 3 is an anchor protein and a target for SHP-2 tyrosine phosphatase in human erythrocytes. *Blood* 100: 276-282, 2002.

Bordin L., Clari G., Moro I., Dalla Vecchia F., Moret V. Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 249-257, 1995.

Bordin L., Ion Popa F., Brunati A.M., Clari G., Low P.S. - Effector-induced Syk-mediated phosphorylation in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 1745: 20-28, 2005.

Bosman G., Willekens F., Werre J. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell. Physiol. Biochem.* 16: 01-08, 2005.

Bradshaw T.P., McMillan D.C., Crouch R.K., Jollow D.J. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 1183-1193, 1997.

Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J-T., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J-J., Montreuil J., Ameisen J.C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 8: 1143-1156, 2001.

Brautigan D.L. Great expectation: protein tyrosine phosphatase in cell regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1114: 63-77, 1992.

Brockman J.L., Anderson R.A. Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in native membranes. *J. Biol. Chem.* 266: 2508-2512, 1991.

Brown M.T., Cooper J.A. Regulation, substrates and functions of Src. *Biochim. Biophys. Acta* 1278: 121-149, 1996.

Brunati A.M., Bordin L., Clari G., James P., Quadroni M., Baritono E., Pinna L., Donella-Deana A. Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes. Identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood* 96: 1550-1557, 2000.

Brunati A.M., James P., Guerra B., Ruzzene M., Donella-Deana A., Pinna L.A. The spleenprotein-tyrosine kinase TPK-IIIB is highly similar to the catalytic domain of p72syk. *Eur. J. Biochem.* 240 (2): 400-407, 1996.

Bucciantini M., Chiarugi G., Cirri P., Taddei L., Stefani M., Raugei G., Nordlund P., Ramponi G. The low M_r phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. *FEBS Lett.* 456: 73-78, 1999.

Buss J.E., Sefton B.M. Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *J. Virol.* 53: 7-12, 1985.

- Cirri P., Chiarugi G., Taddei L., Raugei G., Camici G., Manao G., Ramponi G.– Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J. Biol. Chem.* 273: 32522-32527, 1998.
- Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 453-508, 1989.
- Coleman M.D. Dapsone toxicity: some current perspectives. *Gen. Pharmac.* 26 (7): 1461-1467, 1995.
- Coleman M.D., Breckenridge A.M., Park B.K. Bioactivation of dapsone to a cytotoxic metabolite by human hepatic microsomal enzymes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28: 389-395, 1989.
- Cream J.J. Anaemia in dermatitis herpetiformis – The role of dapsone-induced haemolysis and malabsorption. *Br. J. Dermatol.* 82: 333-338, 1970.
- De Franceschi L., Fumagalli L., Oliviero O., Corrocher R., Lowell C.A., Berton G. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K⁺/Cl⁻ cotransport. *J. Clin. Invest.* 99: 220-227, 1997.
- Denu J.M., Dixon J.E. Protein tyrosin phosphatase: mechanism of catalysis and regulation. *Curr. Opinion Chem. Biol.* 2: 633-641, 1998.
- Dissing J. and Svensmark O. Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B and C isozymes. *Biocim. Biophys. Acta* 1041 (3): 232-242, 1990.
- Feng G.S., Hui C.C., Pawson T. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259 (5101): 1607-1611, 1993.
- Grossman S.J., Simson J., Jollow D.J. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of N-hydroxy dapsone on the sulphhydryl status and membrane proteins of rat erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117: 208-217, 1992.

Groves J.D., Tanner J.A. Topology studies with biosynthetic fragments identify interacting transmembrane regions of the human red cell anion exchanger. *Biochem. J.* 344: 687-697, 1999.

Harrison M.L., Isaacson C.C., Burg D.L., Geahlen R.L., Low P.S. Phosphorylation of human erythrocyte band 3 by endogenous p72^{syk}. *J. Biol. Chem.* 269: 955-959, 1994.

Hideo K., Keito Y., Fumio S. Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal trasduction. *TIBS* 15: 47-50, 1990.

Huyer G., Alexander D.R. Immune signaling: Shp-2 docks at multiple ports. *Curr. Biol.* 9: 129-132, 1999.

Israili Z.H., Cucinell S.A., Vaught J., Davis B., Lesser J.M., Dayton P.G. Studays of the metabolism of dapsone in man and experimental animals. Formation of N-hydroxy metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 138-151, 1973.

Jia Z. Protein phosphatases: structures and implication. *Biochem. Cell Biol.* 75: 17-26, 1997.

Jollow D.J., Bradshaw T.P., McMillan D.C. Dapsone-induced hemolytic anemia. *Drug. Metab. Rev.* 27: 107-124, 1995.

Kay M.M.B. Band 3 and its alterations in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* 50: 117-138, 2004.

Liu S.C., Windisch P., Kim S., Palek J. Oligomeric states of spectrin in normal erythrocyte membranes: biochemical and electron microscopic studies. *Cell.* 37: 587-594, 1984.

Low P.S., Rathinavelu P., Harrison M.L. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein band 3. *J. Biol. Chem.* 268: 14627-14631, 1993.

Lutz H.U., Stammler P., Fasler S. Preferential formation of C3b-IgGcomplexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies. *J. Biol. Chem.* 268: 17418, 1993.

Malorni C., Straface E., Pagano G., Monti D., Zatterale A., Del Principe D., Deeva I.B., Franceschi C., Masella R., Korkina L.G. Cytoskeleton alterations of erythrocytes from patient with Fanconi's anemia. *FEBS Lett.* 468: 125-128, 2000.

Manao G., Pazzagli L., Cirri P., Caselli A., Camici G., Cappugi G., Saeed A., Ramponi G. Rat liver low M_r phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes: purification and amino acid sequences. *J. Prot. Chem.* 3: 333-345, 1992.

Mandal D., Baudin-Creuzat V., Bhattacharyya A., Pathak S., Delaunay J., Kandu M., Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (Band 3). *J. Biol. Chem.* 278: 52551-52558, 2003.

Mannu F., Arese P., Cappellini M.D., Fiorelli G., Cappadoro M., Giribaldi G., Turrini F. Role of hemicrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood* 86: 2014, 1995.

McMillan D.C., Jensen C.B., Jollow D.J. Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 868-876, 1998.

McMillan D.C., Powell C.L., Bowman Z.S., Morrow J.D., Jollow D.J. Lipid versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. *Toxicol. Sci.* 88: 274-283, 2005.

McMillan D.C., Simson J.V., Budinsky R.A., Jollow D.J. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of dapsone hydroxylamine on sulfhydryl status, membrane skeletal proteins and morphology of human and rat erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 540-547, 1995.

Morrow J.S., Speicher D.W., Knowles W.J., Hsu C.J., Marchesi V.T. Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6592-6596, 1980.

Nakao M., Nakao T., Yamazoe S. Physiology. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cell. *Nature* 187: 945-946, 1960.

Nakashima H., Nakagawa Y., Makino S. Detection of the associated state of the membrane proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis with non-denaturing detergents. Application to band 3 protein from erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 643: 509-518, 1981.

Pantaleo A., Giribaldi G., Mannu F., Arese P., Turrini F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoim. Rev.* 7: 457-462, 2008.

Poole A.W., Jones M.L. A SHPing tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cellular Signalling* 17: 1323-1332, 2005.

Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 941-949, 2002.

Resh M.D. Myristilation and Palmylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76: 411-413, 1994.

Sada K., Takano T., Yanagi S., Yamamura H. Structure and function of Syk protein tyrosine kinase. *J. Biochem.* 130: 177-186, 2001.

Schroit A.J., Madsen J., Tanaka Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 260: 5131-5138, 1985.

Schwarz-Ben Meir N., Glaser T., Kosower S. Band 3 protein degradation by calpain is enhanced in erythrocytes of old people. *Biochem. J.* 275: 47-52, 1991.

Stefani M., Caselli A., Bucciantini M., Pazzagli L., Dolfi F., Camici G., Manao G., Ramponi G. Dephosphorylation of tyrosine phosphorylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes. *FEBS* 326: 131-134, 1993.

Tamir I., Dal Porto J.M., Cambier J.C. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 307-315, 2000.

Tonks N.K., Charbonneau H. Protein tyrosine dephosphorylation and signal transduction. *TIBS* 14: 497-500, 1989.

- Tsang E., Giannetti A., Show D., Dinh M., Tse J., Gandhi S., Ho H., Wang S., Papp E., Bradshaw M. Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J. Biol. Chem.* 283 (47): 32650-32659, 2008.
- Ulanova M., Duta F., Puttagunta L., Schreiber A.D., Befus A.D. Spleen tyrosine kinase (Syk) as a novel target for allergic asthma and rhinitis. *Expert. Opin. Ther. Targets* 9: 901-921, 2005.
- Van Vactor D., O'Reilly A.M., Neel B.N. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 112-126, 1998.
- Vince J.W., Carlsson U., Reithmeier R.A.F. Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* 39: 13344-13349, 2000.
- Waheed A., Laidler P.W., Wo Y.Y.P., Van Etten R.L. Purification and physicochemical characterization of a human placenta acid phosphatase possessing phosphotyrosyl protein phosphatase activity. *Biochemistry* 27: 4265-4273, 1988.
- Walton K.M., Dixon J.E. Protein tyrosine phosphatases. *Biochem. Annu. Rev.* 62: 101-120, 1993.
- Watts J.D., Brabb T., Bures E.J., Wange R.L., Samelson L.E., Aebersold R. Identification and characterization of a substrate specific for the T-cell protein tyrosine kinase ZAP-70. *FEBS Lett.* 398: 217-222, 1996.
- Wolfe L.C., Lux S.E., Chanian V. Regulation of spectrin-actin binding by protein 4.1 and polyphosphates. *J. Cell. Biol.* 87: 203a (abstract ME 1548), 1980.
- Zhang Y.L., Yao Z.J., Sarmiento M., Wu L., Burke T.R.Jr, Zhang Z.Y. Thermodynamic study of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 44: 34205-34212, 2000.
- Zioncheck T., Harrison M., Isaacson C., Geahlen R. Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis. *J. Biol. Chem.*, 263 (35): 19195-19202, 1988.

INDICE

Abstract	3
Riassunto	5
INTRODUZIONE	7
L'eritrocita umano	9
1. Caratteristiche generali.....	9
2. Struttura.....	10
2.1. Membrana plasmatici.....	10
2.1.1. Le proteine integrali.....	10
Proteina banda 3.....	11
2.1.2. Proteine citoscheletriche.....	13
3. Invecchiamento ed eliminazione.....	15
3.1. Modello di rimozione attraverso l'aggregazione della banda 3.....	15
3.2. Modello di rimozione attraverso la proteolisi della banda 3.....	16
Processo di fosforilazione/defosforilazione della banda 3	17
1. Tirosin-fosforilazione della proteina banda 3.....	17
1.1. Le protein-chinasi eritrocitarie.....	18
Protein-tirosin-chinasi (PTK).....	18
1.1.1. Le tirosin-chinasi della famiglia Syk.....	18
1.1.2. Le tirosin-chinasi della famiglia Src.....	20
2. Defosforilazione della banda 3.....	22
2.1. Le protein fosfatasi.....	22
Protein-tirosin-fosfatasi.....	22
2.1.1. Le fosfatasi contenenti domini SH2.....	24
Tirosin-fosfatasi SHP-2.....	24
Tirosin-fosfatasi SHP-1.....	26
2.1.2. Fosfatasi a basso peso molecolare (LMW PTP).....	27
Dapsone e idrossilamindapsone	29
OBIETTIVI DELLA RICERCA	33
MATERIALI E METODI	39
1. MATERIALI.....	41

2. METODI.....	42
2.1 Preparazione degli eritrociti.....	42
2.2 Trattamento degli eritrociti.....	42
2.3 Emolisi.....	42
2.4 Preparazione del citoplasma al 60% di saturazione con solfato d'ammonio.....	43
2.5 Preparazione delle membrane.....	43
2.6 Preparazione delle frazioni di membrana.....	43
2.7 Elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE).....	44
2.8 Western Blot.....	44
Immunorivelazione.....	45
2.9 Purificazione della fosfatasi a basso peso molecolare (LMW PTP).....	45
2.10 Tirosin-fosforilazione della banda 3 di membrana e del dominio intracitoplasmatico della banda 3, cdb 3.....	46
a. Tirosin-fosforilazione della banda 3 di membrana e del cdb3 con p36 ^{Syk} e p72 ^{Syk} ...	46
b. Tirosin-fosforilazione sequenziale della banda 3 di membrana da parte delle tirosin-chinasi Syk e Lyn.....	46
2.11 Immunoprecipitazione.....	47
2.12 Attività tirosin-chinasica eritrocitaria totale.....	47
2.13 Attività tirosin-fosfatasi.....	47
a. Attività tirosin-fosfatasi eritrocitaria totale.....	47
b. L'attività tirosin-fosfatasi del SHP-1 e LMW PTP sulla banda 3.....	48
c. Attività fosfatasi della LMW PTP su <i>pNPP</i>	48
2.14 Mappatura dei frammenti proteolitici della ³² P-Tyr-banda 3 di membrana.....	48
2.15 Analisi statistiche.....	49
RISULTATI.....	51
Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 attraverso la proteolisi della tirosin-chinasi p72^{Syk}.....	53
1. Fosforilazione del dominio citoplasmatico della banda 3 (cdb 3) da parte di p36 ^{Syk} e p72 ^{Syk}	53
2. Fosforilazione delle membrane eritrocitarie catalizzata da p72 ^{Syk} e da p36 ^{Syk}	54
3. Effetto degli agenti anti-proteasici sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 catalizzata da p36 ^{Syk} e p72 ^{Syk}	55
4. Legame del p72 ^{Syk} alla membrana eritrocitaria.....	56
5. Analisi delle subfrazioni di banda 3 come substrato per le due chinasi isoforme.....	57

Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 mediante la tirosin-fosfatasi SHP-1	59
1. Effetto di diamide , NEM o pervanadato sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 negli eritrociti umani: coinvolgimento della tirosin-fosfatasi SHP-1.....	59
2. Effetto del NEM sulla tirosin-fosforilazione della banda 3 e sul reclutamento del SHP-1 alle membrane.....	60
3. Localizzazione della SHP-1 nella membrana eritrocitaria.....	61
4. Banda 3, substrato per la fosfatasi SHP-1.....	62
5. Siti fosfo-tirosinici della banda 3 defosforilati dalla fosfatasi SHP-1.....	63
Regolazione della tirosin-fosforilazione della banda 3 mediante le Tirosin-Fosfatasi a Basso Peso Molecolare (LMW PTP)	65
1. Purificazione di una tirosin-fosfatasi acida dal citoplasma dell'eritrocita umano.....	65
2. Caratterizzazione della fosfatasi acida purificata.....	67
3. LMW PTP defosforila la proteina banda 3	68
a. pH ottimale.....	68
b. L'effetto degli inibitori tirosin-fosfatasi sull'attività dell'enzima purificato.....	69
4. Siti fosfo-tirosinici della banda 3 defosforilati della fosfatasi acida a basso peso molecolare..	70
Idrossilamindapsona induce la rimozione prematura degli eritrociti attraverso la riorganizzazione della membrana	72
1. Induzione della tirosin-fosforilazione della banda 3 da parte del DDS-NHOH.....	72
2. Livello di tirosin-fosforilazione della banda 3 ed il reclutamento degli enzimi implicati in questo processo.....	73
3. Effetto del DDS-NHOH sull'attività enzimatica.....	75
4. Effetto del DDS-NHOH sull'aggregazione della banda 3.....	76
5. Riorganizzazione del citoscheletro indotta da DDS-NHOH.....	77
6. Effetto del DDS-NHOH sulla redistribuzione enzimatica.....	78
7. DDS-NHOH induce il legame degli anticorpi autologhi alle membrane eritrocitarie.....	79
CONCLUSIONI	83
BIBLIOGRAFIA	89