



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE E TERRITORIO

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE E AMBIENTALI

XXVI CICLO

STUDI STRUTTURALI SU FERROPORTINA UMANA

Settore scientifico disciplinare: BIO/11

DOCENTE GUIDA:

Ch.mo Prof. Giovanni MUSCI

COORDINATORE:

Ch.mo Prof. Claudio CAPRARI

DOTTORANDO:

Giovanna Cece

anno accademico 2012-2013

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	6
1.1 Assorbimento cellulare del ferro	9
<i>Assorbimento del ferro complessato alla transferrina</i>	9
<i>La famiglia dei trasportatori di ioni metallici NRAMP</i>	12
<i>L'assorbimento del ferro non legato alla transferrina</i>	13
<i>Ferro-reduttasi nell'assorbimento cellulare del ferro</i>	13
1.2 Efflusso del ferro dalle cellule	14
<i>La ferroportina</i>	16
1.3 Trasporto intracellulare del ferro e suo utilizzo a livello mitocondriale	19
<i>Traffico del ferro citoplasmatico</i>	19
<i>Utilizzazione del ferro nel mitocondrio</i>	19
1.4 Regolazione dell'omeostasi del ferro	20
<i>Il sistema IRE/IRP</i>	20
<i>Regolazione trascrizionale</i>	23
<i>Cambiamento della localizzazione subcellulare</i>	24
1.5 Metabolismo del ferro a livello sistemico	25
<i>Trasporto plasmatico del ferro</i>	25
<i>Regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro</i>	25
<i>Regolazione dell'epcidina</i>	28
<i>Regolazione positiva</i>	28
<i>Regolazione negativa</i>	28

1.6 Patologie da dismetabolismo del ferro	29
1.6.1 Disordini da carenza di ferro.....	29
Anemie genetiche da carenza di ferro	29
Anemie acquisite da carenza di ferro.....	30
1.6.2 Disordini da sovraccarico di ferro	30
Emocromatosi di tipo 1	31
Emocromatosi di tipo 2	31
Emocromatosi di tipo 3	32
Emocromatosi di tipo 4	33
2. SCOPO DELLA TESI.....	35
3. MATERIALI E METODI	37
3.1 Analisi bioinformatica e validazione sperimentale	37
Modellamento molecolare	37
Colture cellulari.....	38
Vettori plasmidici e costrutti.....	39
Mutagenesi sito-diretta.....	39
Trasfezioni	40
Saggio di esporto del ferro	41
Saggio di legame ferroportina/Fe su membrana di nitrocellulosa	42
Allestimento dei lisati cellulari	42
Elettroforesi su gel di poliacrilammide	42
Western blot	43
Fissaggio delle cellule per l'osservazione al microscopio in fluorescenza	43
Microscopia a fluorescenza	43

3.2 Espressione di ferroportina in <i>Pichia pastoris</i>	43
<i>Ceppi</i>	43
<i>Costrutti e vettori utilizzati</i>	43
<i>Preparazione di cellule competenti di <i>Pichia pastoris</i></i>	44
<i>Trasformazione GS115</i>	45
<i>Preparazione di DNA genomico di lievito e PCR per verifica della trasformazione</i>	45
<i>Lisi cellulare ed estrazione delle proteine di membrana da <i>Pichia pastoris</i> su piccola scala</i>	46
<i>Elettroforesi su gel di poliacrilammide</i>	46
<i>Western blot</i>	46
<i>Analisi della glicosilazione di hFpn</i>	47
<i>Curve di crescita</i>	47
<i>Analisi del metabolismo del ferro in lievito (gel con o-dianisidina)</i>	47
<i>Fissaggio per visualizzazione delle cellule di <i>Pichia pastoris</i> in fluorescenza</i>	48
<i>Purificazione proteica su larga scala: lisi cellulare e cromatografia di affinità</i>	48
<i>Dicroismo circolare</i>	49
<i>Saggio di saturazione del legame ferroportina/epcidina</i>	49
<i>Saggio di competizione dose-risposta del legame ferroportina/epcidina</i>	50
3.3 Espressione di ferroportina in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
<i>Ceppi</i>	50
<i>Costrutti e vettori utilizzati</i>	51
<i>Preparazione delle cellule competenti</i>	51
<i>Trasformazione BJ5460</i>	52
<i>Espressione su larga scala di rFpn</i>	52

<i>Solubilizzazione di rFpn dalle membrane</i>	53
<i>Purificazione attraverso cromatografia di affinità di rFpn</i>	53
<i>Cromatografia di esclusione molecolare (SEC) su rFpn</i>	54
<i>Dicroismo circolare</i>	54
<i>Prove cristallografiche</i>	55
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	56
4.1 Espressione e purificazione di ferroportina umana in <i>Pichia pastoris</i>	56
<i>Espressione di ferroportina in Pichia pastoris</i>	56
<i>Purificazione della ferroportina</i>	57
4.2 Analisi predittive mediante approccio bioinformatico	59
<i>Modello molecolare della ferroportina umana nella conformazione inward-open</i>	60
<i>Modello molecolare della ferroportina umana nella conformazione outward-open</i>	65
<i>Verifica della qualità dei modelli</i>	66
<i>Validazione sperimentale dei siti predetti di legame col ferro</i>	67
<i>Osservazioni sui modelli 3D</i>	71
4.3 Analisi della ferroportina umana espressa in <i>Pichia pastoris</i>	75
<i>Analisi della glicosilazione della hFpn prodotta in Pichia pastoris</i>	75
<i>Localizzazione sub-cellulare di ferroportina</i>	77
<i>Analisi dell'espressione di ferroportina in Pichia pastoris: curve di crescita e metabolismo del ferro</i>	78
<i>Valutazione della qualità della proteina purificata da Pichia pastoris: dicroismo circolare e saggi di legame con l'epcidina</i>	80
<i>Dicroismo circolare</i>	80
<i>Saggio di legame ferroportina/epcidina</i>	81

<i>Saggio di legame ferroportina/epcidina-20</i>	83
<i>Competizione dose-risposta</i>	84
4.4 Espressione e purificazione di ferroportina in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
<i>Espressione di omologhi di ferroportina in Saccharomyces cerevisiae</i>	87
<i>Purificazione di ferroportina di ratto da Saccharomyces cerevisiae su larga scala</i>	88
<i>Valutazione della qualità della proteina purificata da Saccharomyces cereviae:</i> <i>dicroismo circolare</i>	90
4.5 Prove cristallografiche.....	91
5. CONCLUSIONI	94
<i>Bibliografia</i>	96

1. INTRODUZIONE

Il ferro, metallo di transizione con numero atomico di 26 e peso molecolare di 56 Da, è situato nell'ottavo gruppo (VIII B), quarto periodo della tavola periodica degli elementi. Risulta essere un elemento essenziale per la maggior parte degli organismi viventi, che sfruttano la sua capacità di oscillare tra due stati di ossidazione (Fe^{3+} e Fe^{2+}) per numerosi processi fisiologici basilari. Questa stessa caratteristica però, rende il ferro libero altamente reattivo e quindi potenzialmente tossico. Gli organismi viventi risolvono questo problema attraverso l'associazione del metallo a proteine, sotto forma di gruppi prostetici (eme, cluster ferro-zolfo), oppure con coordinazione diretta dell'elemento mediante la catene laterali di specifici aminoacidi, in particolare istidina, aspartato, glutammato e tirosina. Le proteine contenenti ferro mediano a livello cellulare e sistemico diverse funzioni: trasportano o immagazzinano l'ossigeno (emoglobina e mioglobina) e il ferro (transferrina, ferritina o lattoferrina), ovvero catalizzano reazioni di varia natura, da quelle redox di tipo metabolico a quelle implicate nel signaling cellulare o ad azione antimicrobica (citocromi, ribonucleotide reductasi, ossido nitrico sintasi, NADPH ossidasi, mieloperossidasi). Risultano quindi essenziali per il metabolismo energetico e per quello intermedio, inclusa la sintesi di nucleotidi e giocano un ruolo importante nelle vie di segnalazione e nella difesa dell'ospite.

Sebbene il ferro sia uno degli elementi più abbondanti della crosta terrestre, spesso la maggior parte degli organismi viventi si trova a dover far fronte a carenza del metallo. L'apparente paradosso trova una spiegazione nella bassa solubilità del ferro ferrico, forma redox di gran lunga prevalente in ambiente ossidante. Il ferro, inoltre, viene assorbito in maniera inefficiente dall'uomo dai cibi vegetali, nei quali il metallo si trova complessato in forme insolubili (Ganz, 2013). Questo si riflette nella alta prevalenza di deficit di ferro nelle popolazioni che consumano prevalentemente diete vegetariane (Zimmermann & Hurrell, 2007). Il ferro eme derivante dalla carne, dal pollame e dal pesce è invece assorbito efficientemente (Fairweather-Tait, 2004); tuttavia la pronta disponibilità di questi cibi è antropologicamente recente e limitata dal punto di vista geografico e sociale.

Gli uomini e i mammiferi in generale si sono evoluti in un ambiente in cui la carenza di ferro era una condizione piuttosto comune, e ciò si riflette nei meccanismi di efficiente immagazzinamento e riciclo interno del metallo di cui questi organismi dispongono. All'altro estremo, a causa dell'abbondanza di ferro nella dieta tipica nelle regioni prospere, la

maggior parte degli uomini è anche in grado di limitare l'assorbimento alimentare del ferro e in questo modo di evitare la tossicità che potrebbe derivare da un suo eccessivo accumulo.

In media, un uomo adulto contiene circa 3-4 g di ferro, la maggior parte del quale si trova nell'emoglobina eritrocitaria (circa 2-3 g). Altri tessuti ricchi in ferro includono il fegato e la milza, che rappresentano i principali organi di riserva del metallo, che viene immagazzinato nei macrofagi e negli epatociti complessato ad una proteina citosolica specializzata a svolgere questa funzione, la ferritina. I muscoli contengono il ferro prevalentemente nella mioglobina, una proteina di immagazzinamento dell'ossigeno. In generale, comunque, tutte le cellule possiedono ferro in numerose proteine essenziali per la produzione di energia, per il metabolismo di sintesi e per altre importanti funzioni. La distribuzione del ferro ai tessuti avviene attraverso il plasma, che ne contiene solo una modesta quota (circa 2-4 mg) di quello totale, legato alla proteina di trasporto transferrina. In questa sede, il ferro viene continuamente riciclato; infatti, in una giornata vengono immessi in circolo un totale di circa 20-25 mg di ferro (**Figura 1**) la maggior parte del quale deriva dagli eritrociti senescenti. Queste sono di fatto le cellule a più alto contenuto di ferro e sono riciclate dai macrofagi nella milza e in altri organi. Poiché la vita media di un eritrocita umano è di circa 120 giorni, intorno allo 0,8% (15-25 mg) di tutto il ferro contenuto negli eritrociti deve essere riciclato ogni giorno. Il ferro viene estratto dal compartimento plasmatico principalmente per la sintesi di emoglobina ad opera dei precursori eritrocitari, regolati dall'eritropoietina in risposta all'ossigenazione tissutale. Nonostante il rapido turnover e i cambiamenti nell'utilizzazione del ferro, la sua concentrazione plasmatica rimane pressoché stabile, a evidenziare come la consegna del ferro dai macrofagi riciclatori al circolo sanguigno debba essere strettamente controllata a livello omeostatico (Ganz, 2013).

Le perdite giornaliere di ferro sono di soli 1-2 mg (**Figura 1**) e sono dovute principalmente al processo di desquamazione della superficie epiteliale (De Domenico et al., 2008). In circostanze normali, le perdite sono bilanciate dall'assorbimento alimentare, che ha luogo principalmente a livello del duodeno prossimale. Come risultato di queste perdite relativamente lievi, l'assorbimento di ferro con la dieta contribuisce solo a livello marginale al flusso totale di ferro nell'organismo.

Il contributo dato rispettivamente dal riciclo e dall'assorbimento alimentare al turnover giornaliero di ferro è inoltre differente in base alla specie considerata e dipende dall'emivita degli eritrociti e dalla quota di perdite giornaliere. In generale, poiché le perdite di ferro non

sono significativamente modulate dai livelli del metallo negli organismi, la regolazione del contenuto di ferro è dipendente unicamente da uno stretto controllo dell'assorbimento alimentare. I meccanismi fisiologici che controllano l'assorbimento del ferro con la dieta devono fare i conti con la differente biodisponibilità del metallo nelle varie fonti alimentari, che oscillano tra il 5 e il 12% in una dieta vegetariana e tra il 14 e il 18% in una di tipo misto. Nonostante queste variazioni e i cambiamenti nella richiesta di ferro dovuti alla crescita o a perdite occasionali del metallo, le riserve di ferro sono stabili nella maggior parte dei soggetti umani che fanno consumo di una dieta con contenuti di ferro adeguati (Ganz, 2013).

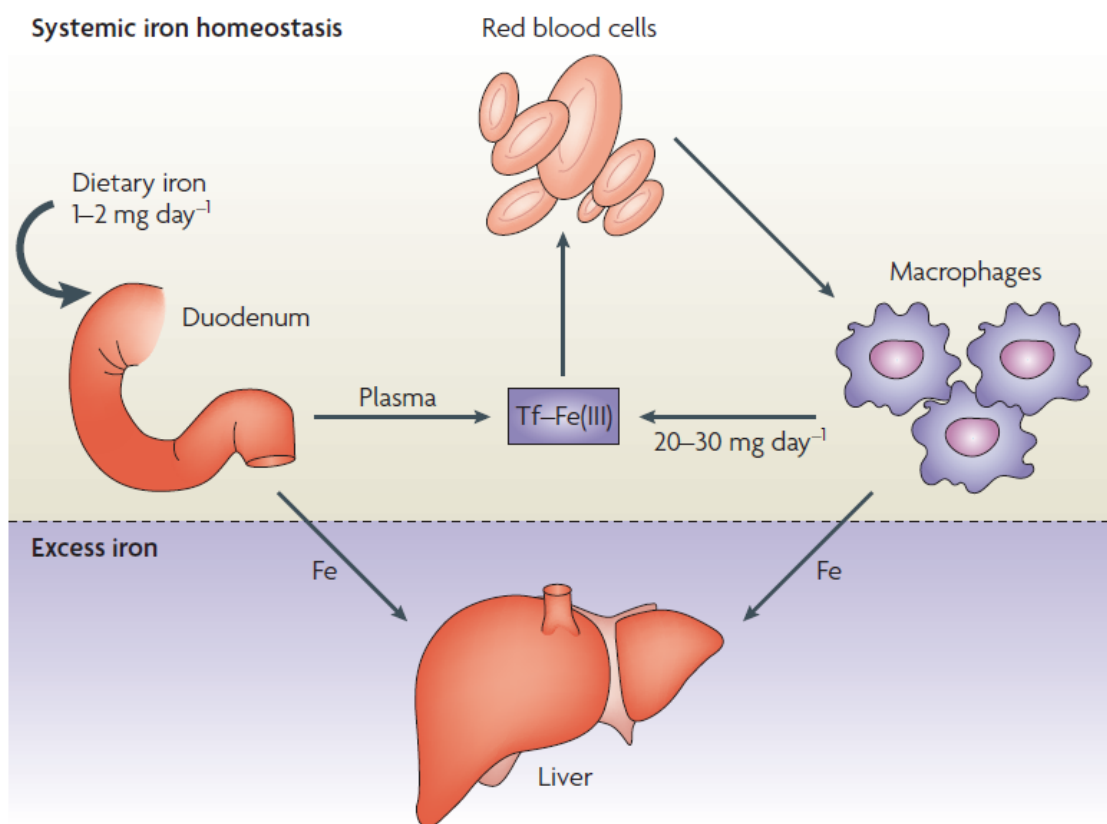


Figura 1. Il ferro assorbito con la dieta (1-2 mg/giorno) a livello duodenale viene veicolato nel plasma, dove viene legato dalla Tf. Il metallo viene in questa maniera indirizzato ai tessuti e alle cellule (principalmente ai reticolociti) dove è incorporato nell'eme. Gli eritrociti senescenti sono fagocitati dai macrofagi, che degradano l'emoglobina e riciclano il ferro immettendolo di nuovo nel plasma (20-30 mg/giorno) dove può legare la Tf. Se il ferro è assorbito o rilasciato nel plasma a livelli più alti rispetto alla capacità legante della Tf, le quote in eccesso di NTBI (vedi testo) vengono depositate nei tessuti parenchimali (come ad esempio il fegato) (De Domenico et al., 2008).

1.1 Assorbimento cellulare del ferro

In condizioni fisiologiche normali, le cellule di mammifero acquisiscono la maggior parte del ferro dalla proteina plasmatica transferrina (Tf). Ogni molecola di Tf è in grado di legare due atomi di ferro ferrico, ed è la forma diferrica di questa proteina quella utilizzata con maggiore efficienza dalle cellule (Chua et al., 2007). Tuttavia, in alcuni stati patologici, quali alcuni importanti disordini da sovraccarico di ferro, quando la capacità della Tf plasmatica di legare il ferro è saturata, quote di ferro non legato alla Tf (NTBI, "Non-Transferrin-Bound-Iron") possono contribuire all'assorbimento cellulare del metallo (Hider, 2002). Alcune tipologie cellulari, possono utilizzare anche il ferro contenuto nei gruppi eme circolanti, nell'emoglobina e nella ferritina serica, ma come per le specie NTBI, questa via di assorbimento diventa significativa solo in condizioni patologiche (Anderson & Vulpe, 2009).

Assorbimento del ferro complessato alla transferrina

La transferrina è in grado di veicolare il ferro alle cellule attraverso diversi meccanismi; quello meglio caratterizzato coinvolge l'interazione ad alta affinità con la proteina di membrana denominata recettore per la transferrina 1 (TfR1). Il TfR1 è un recettore omodimerico riscontrabile sulla superficie di molti tipi cellulari dell'organismo (Aisen, 2004). A evidenza della sua essenzialità sta il fatto che la mancanza del TfR1 per knock-out del gene corrispondente porta a mortalità embrionale in modelli murini (Levy et al., 1999). Le cellule soggette ad un rapido turnover (ad esempio le cellule epiteliali delle cripte intestinali) e quelle che hanno richieste specializzate di ferro (come le cellule eritroidi immature, che ne richiedono grandi quantitativi per la sintesi dell'emoglobina) esprimono livelli particolarmente alti del TfR1. La struttura cristallografica del recettore è stata risolta a 3,2 Å (Lawrence et al., 1999) e il complesso Tf-TfR1 è stato studiato attraverso microscopia crioelettronica: ogni monomero di TfR1 è una proteina di membrana di tipo II che consiste di una corta estremità N-terminale, di un singolo dominio transmembrana (TM) e di un grande dominio C-terminale extracellulare. Il dominio citoplasmatico contiene un motivo consenso di internalizzazione, mentre il dominio extracellulare è in grado di legare una singola molecola di Tf. Il recettore è anche soggetto a estese modifiche post-traduzionali attraverso meccanismi di O- ed N-glicosilazione, di palmitoilazione e di fosforilazione (Aisen, 2004).

Il TfR1 conduce la transferrina e di conseguenza il ferro ad essa legato all'interno della cellula attraverso un meccanismo di endocitosi mediata da recettore (**Figura 2**). A pH fisiologico la transferrina diferrica viene legata dal recettore con un'efficienza 10 volte superiore a quella registrata per la forma monoferrica e di circa 2000 volte maggiore di quella per l'apotransferrina. Il complesso TfR1-Tf diferrica è endocitato attraverso vescicole rivestite di clatrina che, una volta all'interno della cellula, sono svestite e maturano a endosomi. Sulla membrana endosomiale si trovano delle pompe con attività ATPasica che determinano un abbassamento del pH all'interno dell'organulo ad un valore intorno a 5,5, condizione nella quale il ferro è rilasciato dalla Tf. Poiché la Tf lega il ferro ferrico con alta affinità, appare chiaro che il rilascio del metallo richiede la sua riduzione. Come candidati alla riduzione endosomiale del ferro sono state identificate proteine della famiglia STEAP (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate) e la STEAP3 è quella chiamata a svolgere questa funzione nelle cellule eritroidi immature. Secondo le predizioni, si tratta di proteine di membrana caratterizzate da sei domini transmembrana e da una attività ferro-reduttasica NAD(P)H- e flavina-dipendente. Inoltre contengono un gruppo eme associato alla membrana che facilita il trasferimento di elettroni (Anderson & Vulpe, 2009).

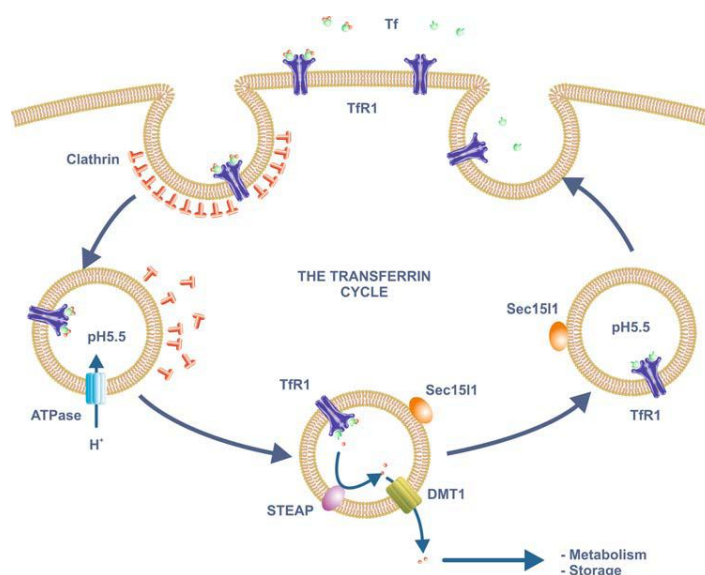


Figura 2. Il ciclo della transferrina. Il ferro plasmatico allo stato ossidato lega con alta affinità la Tf che a sua volta lega il TfR1 sulla membrana plasmatica. Il complesso Tf/TfR1 è internalizzato attraverso vescicole rivestite di clatrina in un meccanismo di endocitosi mediata da recettore. Una pompa protonica ATPasica abbassa il pH nell'endosoma a un valore prossimo a 5,5 a cui il ferro viene rilasciato. Il processo è favorito dalla riduzione del ferro operata dagli enzimi della famiglia STEAP. Il ferro ferroso risultante si muove attraverso la membrana endosomiale grazie a DMT1 ed entra nel citoplasma dove viene utilizzato per varie funzioni metaboliche o immagazzinato nella ferritina. L'ApoTf resta legata al TfR1 al basso pH endosomiale e viene rilasciata nel mezzo extracellulare a seguito del riciclo dell'endosoma sulla membrana plasmatica. Nel meccanismo di riciclo della Tf è coinvolta la proteina Sec151 (Anderson & Vulpe, 2009).

Il ferro, che viene rilasciato dalla transferrina diferrica internalizzata in forma ridotta, attraversa la membrana e viene rilasciato a livello citosolico grazie al trasportatore di metalli divalenti DMT1, un membro della famiglia NRAMP (Natural-Resistance-Associated Macrophage-Protein) di trasportatori di ioni metallici. Queste proteine attuano un trasporto di ioni metallici dipendente da protoni, così DMT1 ben si presta alla rimozione del ferro dall'ambiente a basso pH degli endosomi. A seguito del rilascio del ferro la transferrina è riciclata a livello extracellulare. Al basso pH endosomiale l'affinità del TfR1 per l'apotransferrina è molto più alta che a pH fisiologico, e ciò spiega perché le due proteine restano associate fino al riciclo dell'endosoma alla membrana plasmatica.

Un singolo ciclo di consegna del ferro a livello cellulare mediato dalla Tf (cosiddetto ciclo della transferrina) viene completato in 5-20 minuti in base alla tipologia cellulare e, dato che l'emivita della Tf plasmatica è di circa 8 giorni nell'uomo, una singola molecola di transferrina può potenzialmente mediare nella sua vita centinaia di cicli di legame e consegna del ferro alle cellule.

Nonostante il sistema ad alta affinità di assorbimento del ferro mediato dalla transferrina diferrica e dal suo recettore di tipo 1 sia un mezzo molto efficiente di indirizzamento del ferro alle cellule, non è l'unico con cui una cellula riesce ad utilizzare il ferro legato alla Tf. È stato infatti descritto anche un sistema a bassa affinità che è probabilmente quello predominante in circostanze normali, data l'alta concentrazione della transferrina e della transferrina diferrica nei fluidi extracellulari (rispettivamente 25-50 e 15-30 μM). Il contributo all'assorbimento della transferrina diferrica derivante dai due meccanismi (quello basato sul recettore della Tf di tipo 1 e quello a bassa affinità) è differente in base alla tipologia cellulare. Nelle cellule eritroidi immature, la transferrina diferrica viene captata principalmente attraverso il meccanismo ad alta affinità, mentre in cellule quali gli epatociti e gli enterociti duodenali, sono utilizzati efficientemente entrambi i meccanismi.

L'uptake a bassa affinità è stato studiato principalmente in cellule di derivazione epatica e un gran numero di studi ha chiaramente mostrato che il processo è indipendente dal recettore per la Tf di tipo 1. Negli epatociti è stata documentata un'alta espressione di un omologo del TfR1, il recettore per la transferrina di tipo 2 (TfR2) che rappresenta quindi la proteina candidata a mediare questo sistema a bassa affinità. Come il TfR1, anche il recettore di tipo 2 è una proteina omodimerica di membrana in grado di legare la Tf. Lo fa però con una affinità 25 volte inferiore rispetto a quella mostrata dal recettore di tipo 1. Anche questo meccanismo

sembra prendere inizio in un compartimento endosomiale, ma a differenza del sistema ad alta affinità, si conclude nel mezzo extracellulare (Anderson & Vulpe, 2009).

La famiglia dei trasportatori di ioni metallici NRAMP

Il TfR1 indirizza il ferro legato alla Tf all'interno delle cellule attraverso un meccanismo di endocitosi. Nell'endosoma il metallo risulta isolato dal citoplasma e dagli organuli dove è richiesto per esplicare le proprie funzioni metaboliche. Come menzionato in precedenza, il trasporto del ferro ferroso dagli endosomi nel citoplasma è mediato da DMT1. DMT1 è una proteina che consiste di 12 domini transmembrana putativi ed è in grado di trasportare efficientemente il ferro allo stato ferroso ma non nella forma ferrica; questo evidenzia il bisogno di una ferro-reduttasi prima che il ferro ferrico possa essere utilizzato. DMT1 trasporta non solo il ferro ferroso ma anche diversi altri ioni metallici divalenti, inclusi Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cd^{2+} (Gunshin et al., 1997). Nonostante questa mancanza di alta specificità, il fenotipo risultante dall'assenza del gene *SLC11A2* (codificante per DMT1) o dalla presenza di una mutazione a suo carico è quello di una anemia da deficit di ferro.

Ad oggi, non è disponibile una struttura cristallografica per DMT1 e le conoscenze sul suo funzionamento quale trasportatore del ferro sono ancora incomplete. Sono però stati condotti un gran numero di studi di mutagenesi su questa proteina e su suoi omologhi ed è stato verificato l'effetto di queste mutazioni sul trasporto del metallo (Courville et al., 2006; Nevo, 2008). Alla luce di queste analisi, i domini transmembrana 1 e 6 sembrano essere critici per il legame e l'uptake del metallo come anche per l'accoppiamento protonico. Inoltre, sono stati identificati importanti residui, richiesti per un efficiente trasporto del metallo, anche nei segmenti TM 3,4 e 9.

Poiché il ciclo della Tf rappresenta il principale sistema di captazione cellulare del ferro, non appare sorprendente che la maggior parte delle cellule in un organismo esprima DMT1. Tessuti con alte richieste di ferro, come le cellule eritroidi immature e quelle del sistema nervoso centrale (SNC) esprimono DMT1 a livelli particolarmente alti. In aggiunta a questa sua diffusione DMT1 esibisce anche un ruolo specializzato nell'assorbimento del ferro alimentare localizzandosi in maniera specifica a livello della superficie dell'orletto a spazzola degli enterociti duodenali. La placenta trasporta grossi quantitativi di ferro ed è un altro sito prominente in cui si ritrova espresso DMT1, anche se in questa sede non sembra essere

essenziale per il trasporto del ferro. Anche l'assorbimento del ferro a seguito dell'endocitosi mediata dal TfR2, l'indirizzamento a livello della superficie cellulare del ferro derivante dalla Tf e l'assorbimento del ferro NTBI sfruttano DMT1 (Anderson & Vulpe, 2009).

L'assorbimento del ferro non legato alla transferrina

La transferrina è la principale fonte di ferro per tutte le cellule dell'organismo in condizioni fisiologiche normali. Tuttavia, in vari stati patologici possono essere assorbite anche altre forme di ferro. Tra queste, alcune delle più significative sono le specie NTBI. Nella rara condizione di deficienza congenita della transferrina nell'uomo, o di delezione genica in modelli murini, si assiste ad un rapido indirizzamento del ferro ai tessuti e ad un pesante sovraccarico di ferro d'organo. Quindi, risulta più appropriato pensare alla transferrina come mezzo di regolazione dell'apporto, piuttosto che come componente indispensabile per l'assorbimento del ferro a livello cellulare.

Data l'alta affinità della Tf per il ferro ($K_d=10^{-23} M^{-1}$), il quantitativo di NTBI nel plasma in circostanze normali è irrisorio. Essendo saturata solo per il 30% circa dal ferro in condizioni normali, la transferrina mantiene un grande eccesso di capacità legante e consente di conservare bassi i livelli delle specie NTBI potenzialmente tossiche.

Nonostante le numerose ricerche condotte, rimane per lo più ignota la natura chimica delle specie NTBI. Si pensa che la maggior parte del ferro non legato alla transferrina sia chelata da piccole molecole di acidi organici, come il citrato; modesti quantitativi potrebbero anche essere legati debolmente a proteine plasmatiche come ad esempio l'albumina, e presumibilmente il ferro è presente in questi complessi sotto forma di Fe^{3+} . Tra i possibili candidati al trasporto di membrana delle forme di ferro NTBI rientra il DMT1, anche se il meccanismo in questione non è ancora stato delineato con chiarezza.

Ferro-reduttasi nell'assorbimento cellulare del ferro

La maggior parte del ferro nell'ambiente si trova in forma ossidata, tuttavia è la forma ridotta quella più solubile, in grado di essere trasportata attraverso le membrane cellulari. Appare quindi ovvio il ruolo prominente che le ferro-reduttasi svolgono nell'assorbimento cellulare del ferro. Infatti, molto prima che qualsiasi proteina deputata all'assorbimento del ferro di mammifero fosse stata descritta era stata identificata una attività ferro-reduttasica a livello della superficie cellulare. La prima ferro-reduttasi eucariotica (FRE1) è stata

identificata nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, (Dancis et al., 1990) e ad oggi si conoscono almeno quattro varianti di questa proteina coinvolte nell'acquisizione del ferro in lievito (Philpott & Protchenko, 2008).

Il ruolo delle proteine della famiglia STEAP nella riduzione del ferro e nel facilitare l'uptake del metallo da parte di DMT1 nelle cellule di mammifero è stato già menzionato, ma ce ne sono altri esempi: una attività ferro-reduttasica imputabile alla proteina DcytB (Duodenal cytochrome B) è stata descritta a livello dell'orletto a spazzola della membrana degli enterociti duodenali e fornisce il ferro allo stato ferroso a DMT1 in questa sede. Questa proteina di membrana svolge attività di riduzione del ferro e la sua espressione viene stimolata in presenza di fattori che promuovono l'assorbimento del ferro. Tuttavia, a seguito della delezione del gene codificante per DcytB, gli animali in esame non evidenziano alcun fenotipo anomalo a indicazione che questa proteina non è essenziale. Resta ancora da determinare l'eventuale presenza di altre ferro-reduttasi in questa sede. È stata identificata una ferro-reduttasi di mammifero anche nella placenta, a supporto del legame funzionale tra trasportatori del ferro e ossido reduttasi nel metabolismo di questo metallo (Anderson & Vulpe, 2009).

1.2 Efflusso del ferro dalle cellule

Il trasporto cellulare del ferro non è unidirezionale e non è legato solo al meccanismo di assorbimento. La maggior parte delle cellule nell'organismo ha infatti la capacità di rilasciare questo metallo nel mezzo extracellulare. Tra le varie tipologie cellulari ce ne sono alcune che si sono ben adattate a farlo e fra queste gli esempi meglio caratterizzati sono rappresentati dai macrofagi e dagli enterociti duodenali.

I macrofagi svolgono la funzione di degradazione degli eritrociti senescenti e durante questo processo il ferro derivante dall'emoglobina viene rilasciato dall'eme per ritornare nel circolo sanguigno, dove può essere riutilizzato, in particolare dal midollo emopoietico. Questo riciclo del ferro è particolarmente critico in quanto, come già anticipato, la quantità di ferro che entra nell'organismo attraverso la dieta costituisce una frazione minima della quantità necessaria a soddisfare le richieste dell'eritropoiesi; di fatto, circa l'80% del ferro utilizzato giornalmente dall'organismo deriva dal riciclo macrofagico (Anderson & Vulpe, 2009).

Gli enterociti sono l'altro caso rilevante di cellule in cui il trasporto di membrana del ferro ha un ruolo primario. Il ferro alimentare entra in queste cellule attraverso le molecole di

DMT1 situate sull'orletto a spazzola della membrana apicale ed è quindi immesso in circolazione tramite un sistema di esporto localizzato a livello della membrana basolaterale. In circostanze normali, sono assorbiti quantitativi di ferro relativamente piccoli, ma sufficienti a rimpiazzare le perdite passive dell'organismo. L'assorbimento intestinale assume ovviamente un ruolo cruciale quando il riciclo macrofagico non soddisfa la richiesta eritroide. In queste condizioni, il ferro può anche essere acquisito dalle riserve possedute dalla maggior parte delle cellule dell'organismo, che sono quindi in grado di effettuare l'esporto del metallo.

Per assolvere alla funzione di esporto del ferro, la maggior parte delle cellule dell'organismo, e in particolare queste due tipologie, esprimono sulla superficie cellulare (nel caso degli enterociti sulla porzione basolaterale) la ferroportina (Fpn) (**Figura 3**). La Fpn è espressa ad alti livelli anche nella placenta, un altro organo che mostra movimenti unidirezionali di grossi quantitativi di ferro, e sembra essere essenziale per il trasferimento del metallo al feto.

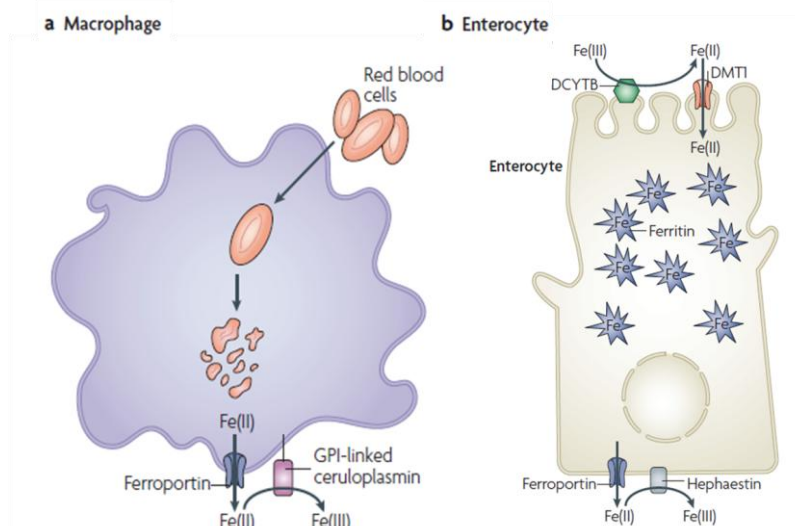


Figura 3. Esporto del ferro mediato da ferroportina. **a)** Nei macrofagi il Fe(II) rilasciato dagli eritrociti senescenti è esportato dalla ferroportina verso l'esterno della cellula, dove viene immediatamente convertito a Fe(III) dalla ferrossidasi ancorata alla membrana GPI-Cp. **b)** Negli enterociti, il Fe(II) è esportato dalla ferroportina e convertito dalla ferrossidasi associata alla membrana, efestina (De Domenico et al., 2008).

Mutazioni nel gene della Fpn nell'uomo o delezioni geniche in topi o in zebrafish dimostrano l'importanza della Fpn nell'omeostasi del ferro. Negli uomini in cui si riscontra una riduzione della funzionalità della Fpn, si assiste ad un rapido accumulo di ferro nelle cellule macrofagiche, quali ad esempio le cellule di Kupffer del fegato, e, nel tempo, ad un incremento anche a livello parenchimale. L'assorbimento intestinale del ferro diminuisce e i

livelli di ferro plasmatico scendono. Questo porta a una situazione in cui il ferro si accumula nei tessuti, ma, paradossalmente, si riscontra anemia sistemica dovuta a una riduzione nell'esporto del ferro nel plasma e quindi a un ridotto rifornimento di ferro ai progenitori eritroidi. Nella maggior parte dei soggetti in cui si riscontrano mutazioni a carico della Fpn, permane sufficiente attività proteica che garantisce l'assorbimento del ferro. Tuttavia, delezioni geniche nell'epitelio intestinale in modelli murini sono incompatibili con lo sviluppo post-natale, confermando l'importanza della proteina nell'assorbimento intestinale del ferro.

La ferroportina

La ferroportina (conosciuta anche come SLC40A1, IREG1 o MTP1) è l'unica proteina di membrana plasmatica finora descritta deputata all'esporto del ferro nei mammiferi (Abboud & Haile, 2000, Donovan et al., 2000, McKie et al., 2000). Consiste probabilmente di 12 eliche transmembrana e presenta le estremità C- ed N-terminali rivolte verso l'interno della cellula (Liu et al., 2005) (**Figura 4**).

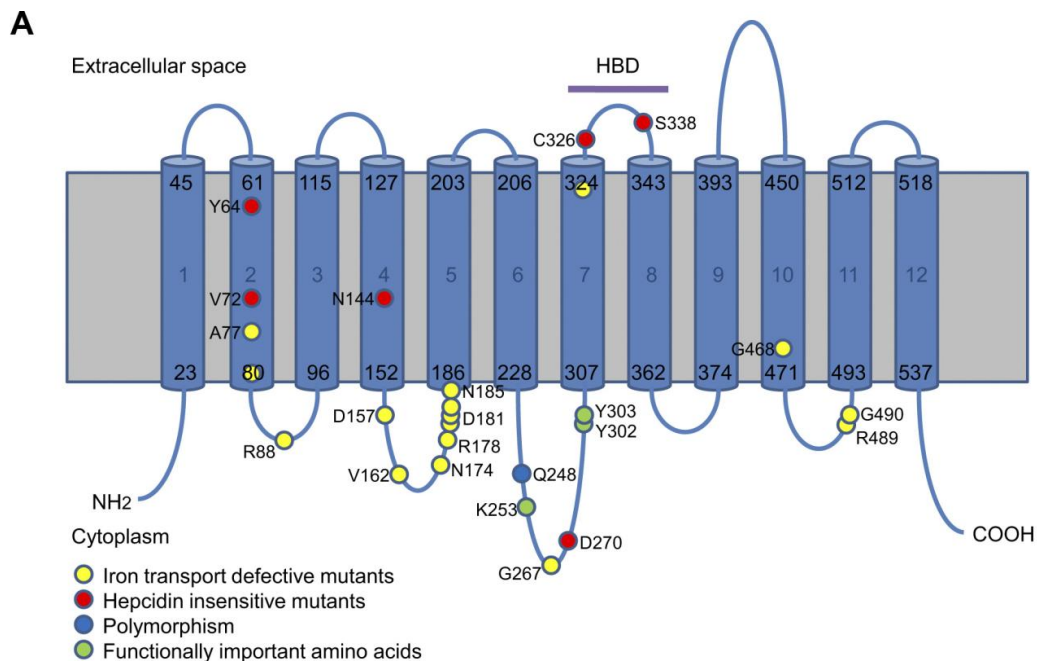


Figura 4. Modello teorico per la ferroportina umana proposto da Wallace e collaboratori (2010). Il modello bidimensionale illustrato, basato su quello proposto da Liu e collaboratori nel 2005, mostra 12 domini transmembrana. Le posizioni degli amminoacidi alterati nella “malattia di ferroportina” (vedi testo) sono indicati come cerchi gialli per le mutazioni a perdita di funzione e come cerchi rossi per quelle a guadagno di funzione. Amminoacidi funzionalmente importanti sono rappresentati da cerchi verdi e il polimorfismo Q248H è indicato come cerchio blu. HBD: dominio di legame all'epcidina

Ci sono informazioni limitate sul meccanismo di trasporto mediato dalla Fpn, ma al pari di DMT1, essa usa il ferro ferroso come substrato. Inoltre, è aperto un dibattito sulla struttura multimerica della proteina (Anderson & Vulpe, 2009). Sebbene considerazioni genetiche ed evidenze biochimiche suggeriscano che la forma dimerica sia la più probabile (De Domenico et al., 2007a), dati recenti hanno dimostrato che la Fpn, purificata tramite solubilizzazione con detergenti, si comporta come monomero (Rice et al., 2009).

Proprio come un efficiente assorbimento del ferro richiede l'azione concertata di una ferro-reduttasi e di un trasportatore del ferro ferroso, anche l'efflusso sembra richiedere sia la presenza di un trasportatore che di un enzima ad attività ossidoriduttasica. Nel meccanismo di esporto, però, l'enzima catalizza l'ossidazione del ferro anziché la sua riduzione. La Fpn trasporta infatti il ferro attraverso la membrana nella forma ferrosa e la Tf circolante lo lega come ione ferrico, così appare indispensabile l'ossidazione del ferro durante questo passaggio. La principale ferrossidasi plasmatica conosciuta è la proteina contenente rame ceruloplasmina (Cp) (Holmberg & Laurell, 1947); il legame metabolico tra rame e ferro è noto da tempo, ed è nozione consolidata che la Cp sia indispensabile per il corretto rilascio del ferro dai tessuti. Diversi anni fa è stato dimostrato che animali nutriti con una dieta povera di rame mostrano una ridotta attività ossidasica e un accumulo di ferro a livello tissutale, fornendo forti evidenze dell'importanza della Cp per l'efflusso cellulare di ferro. Questo dato è stato confermato attraverso l'analisi di soggetti umani con mutazioni a carico del gene codificante per Cp e in modelli animali in cui lo stesso gene è stato sottoposto a delezione. Questi individui mostrano ridotti livelli plasmatici di ferro ma aumentate riserve tissutali. Nell'intestino tenue la funzione ferrossidasica è invece svolta dall'efestina, proteina che consiste di un dominio extracellulare ossidasico (la cui sequenza amminoacidica risulta identica per il 50% a quella della Cp) unito a un singolo dominio transmembrana e con una piccola coda citosolica. L'efestina è stata riscontrata anche nel SNC e l'eliminazione di entrambi i geni delle due ferrossidasi porta a effetti più marcati di accumulo del metallo nel cervello rispetto alla sola delezione della Cp. Il SNC esprime anche una forma di membrana di Cp caratterizzata da un'ancora molecolare di glicosil fosfatidil inositolo (Cp-GPI) (Jeong & David, 2003). Infine, anche la placenta esprime una proteina omologa alla Cp ancorata alla membrana che si pensa faciliti il trasferimento del ferro dalla madre al feto (McArdle et al., 2008).

Uno studio recente ha fatto luce sul possibile meccanismo di rilascio del ferro cellulare favorito dalla Cp o suoi omologhi: De Domenico e collaboratori (2007b) hanno dimostrato, in un modello cellulare gliale *in vitro*, che l'ossidazione del ferro mediata dalla Cp-GPI è necessaria per il rilascio del metallo dalla Fpn e che, in sua assenza, il ferro ferroso resta legato al trasportatore, che viene ubiquitinato, internalizzato e degradato (**Figura 5**). Quindi, l'ossidazione del ferro risulta importante per stabilizzare la Fpn sulla membrana plasmatica. Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che anche *in vivo* l'assenza dell'attività ferrossidasica della Cp porta alla scomparsa della Fpn dalla membrana degli astrociti (De Domenico et al., 2007b).

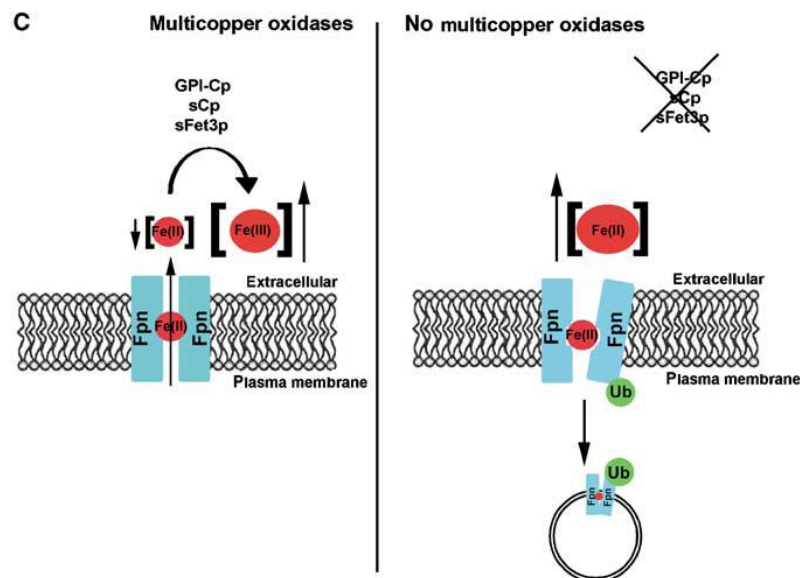


Figura 5. Modello proposto per il ruolo della Cp nella localizzazione sulla superficie cellulare della Fpn. La Fpn trasporta il Fe(II) dal citosol attraverso la membrana plasmatica. Una ossidasi multicopere assicura l'abbassamento dei livelli extracellulari del Fe(II) attraverso l'ossidazione del ferro in uscita a Fe(III). In assenza della Cp il ferro potrebbe rimanere nel canale proteico e influenzare la conformazione della ferroportina che porterebbe a una sua ubiquitinazione e alla conseguente internalizzazione e degradazione della proteina (De Domenico et al. 2007b).

In circostanze normali, il quantitativo di Cp plasmatica non è un fattore limitante l'esporto del ferro. Pazienti con difetti a carico del trasportatore di rame ATP7B (malattia di Wilson) mostrano bassi livelli di attività ferrossidasica plasmatica in quanto ATP7B è indispensabile per il caricamento del rame nella Cp. Solo quando i livelli di attività ossidasica di Cp scendono al di sotto del 5% di quelli normali si assiste ad un accumulo di ferro nei tessuti. Non è ad oggi ancora stato chiarito se l'efestina funzioni allo stesso modo a livello intestinale.

1.3 Trasporto intracellulare del ferro e suo utilizzo a livello mitocondriale

Traffico del ferro citoplasmatico

Il ferro, che arriva nel citosol sia attraverso la via endosomiale che tramite l'attraversamento diretto della membrana plasmatica, deve essere smistato ai siti intracellulari in cui avviene l'incorporazione nelle proteine che ne hanno bisogno. Il quantitativo di ferro in eccesso rispetto alle necessità metaboliche viene incorporato nella ferritina, proteina di immagazzinamento che agisce da vero e proprio tampone cellulare del ferro, che viene rilasciato dalla ferritina ogni qual volta le richieste metaboliche salgono.

Il meccanismo con cui il ferro viene smistato dai siti di assorbimento a quelli di utilizzazione e immagazzinamento è poco chiaro. In ogni caso, dato che il ferro è un metallo attivo dal punto di vista redox, ha senso il suo sequestro al fine di prevenire la catalisi di reazioni di formazione di specie radicaliche dell'ossigeno, anche se la forma intracellulare precisa del metallo non è nota. Il ferro può essere chelato da acidi organici a basso peso molecolare come il citrato o anche da proteine intracellulari. Una terza possibilità è che il ferro venga legato a specifiche proteine "chaperone", anche se ad oggi non ne sono state identificate.

Utilizzazione del ferro nel mitocondrio

Un gran numero di proteine cellulari utilizzano il ferro come cofattore e contengono il metallo in diverse tipologie di centri di ferro. Tra questi, i più diffusi sono il gruppo eme e i vari cluster ferro-zolfo, entrambi sintetizzati prevalentemente nei mitocondri. Per questa ragione tali organuli svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi del ferro e rappresentano il principale sito cui viene indirizzato il metallo in uscita dall'endosoma (Napier et al., 2005). Come già detto, il ferro può essere sequestrato da ligandi a basso peso molecolare o legato da proteine citoplasmatiche più o meno specifiche e in questo modo essere indirizzato agli importatori mitocondriali del ferro. Per le cellule eritroidi immature è stata evidenziata anche un'altra possibilità per il trasferimento del ferro che prevede un contatto diretto tra gli endosomi e i mitocondri.

Ad ogni modo, il ferro deve attraversare le membrane mitocondriali per arrivare alla matrice dove può essere utilizzato. Il candidato all'importo mitocondriale del ferro è la mitoferrina (Mfrn). Si tratta di un membro della famiglia di trasportatori di soluti mitocondriali (SLC25) ed è localizzata sulla membrana mitocondriale interna. Quando il gene

codificante per Mfrn è delecto in modelli murini, gli animali mostrano una riduzione della captazione del ferro e di conseguenza una ridotta sintesi di eme. In ogni caso, questi animali restano in vita a indicazione della presenza di qualche meccanismo ridondante richiamato a svolgere una stessa funzione a livello mitocondriale. La proteina Mfrn è espressa prevalentemente nelle cellule eritroidi, mentre il suo omologo, la mitoferrina 2 (Mfrn2, con il 65% di identità di sequenza amminoacidica) si riscontra in molti tessuti non eritroidi in cui esplica un ruolo simile (Paradkar et al., 2009).

Non è chiaro se forme a basso peso molecolare di ferro possano uscire dal mitocondrio, mentre è accertato che ciò avviene per i gruppi eme e per i cluster ferro-zolfo. L'eme viene esportato dal mitocondrio attraverso il trasportatore ABCB10 della famiglia dei trasportatori ABC (ATP-Binding-Cassette) e a livello citoplasmatico viene incorporato in varie proteine mentre, la proteina ABCB7 situata sulla membrana mitocondriale interna è emersa quale possibile esportatore dei cluster ferro-zolfo.

1.4 Regolazione dell'omeostasi del ferro

I livelli cellulari di ferro devono essere mantenuti entro limiti ben definiti: l'organismo ha bisogno di quantitativi sufficienti del metallo per il fabbisogno metabolico, ma un suo eccesso può risultare tossico. Così, sia l'assorbimento che l'efflusso del ferro devono essere meccanismi strettamente regolati. Quando le richieste cellulari di ferro salgono, il macchinario di importo è espresso ad alti livelli, mentre quello di esporto è limitato. La concentrazione del TfR1 e di DMT1 è incrementata sulla superficie cellulare in condizioni di deficit di ferro mentre l'espressione di ferroportina viene ridotta. Anche l'espressione della ferritina, proteina deputata all'immagazzinamento del ferro, scende in queste circostanze e il ferro è indirizzato prevalentemente alle funzioni metaboliche. Quando le cellule sono cariche di ferro, si osserva l'attivazione del pattern opposto, caratterizzato da ridotta espressione di DMT1 e TfR1 e incrementata produzione di ferritina. In realtà, il meccanismo è alquanto più complesso (Anderson & Vulpe, 2009).

Il sistema IRE/IRP

Il sistema più noto di regolazione delle proteine coinvolte nel metabolismo del ferro è quello post-trascrizionale mediato dalle proteine regolatrici del ferro (IRP, "Iron-Regulatory-Protein"). Queste svolgono la loro funzione attraverso il legame agli RNA messaggeri delle

proteine da regolare. Quando i livelli cellulari di ferro sono bassi, le proteine regolatrici del ferro 1 (IRP1) e le proteine regolatrici del ferro 2 (IRP2) legano strutture ripiegate ad ansa, conosciute come elementi di risposta al ferro (IRE, "Iron-Responsive-Element"), situate sull'RNA messaggero di un gran numero di proteine coinvolte nel metabolismo del ferro.

Quando l'IRE è nella regione 5' non tradotta (5'-UTR) dell'mRNA il legame delle IRP blocca la traduzione, se invece è presente nelle regione al 3'-UTR il legame conferisce stabilità al messaggero e così facilita una prolungata traduzione. La regolazione dei livelli del TfR1 e della ferritina è un classico esempio del sistema IRE/IRP. L'mRNA del TfR1 ha una serie di IRE a livello del suo 3'-UTR, mentre quello della ferritina ne contiene diversi al 5'-UTR. Quando le richieste di ferro sono alte, il legame delle IRP stabilizza l'mRNA del TfR1 ma blocca la traduzione del messaggero della ferritina. In questo modo l'ingresso del ferro nella cellula è incrementato mentre le riserve vengono ridotte. Quando i livelli di ferro vengono ristabiliti, si assiste all'attivazione della risposta opposta (Rouault, 2006) (**Figura 6**).

Il TfR1 e la ferritina non sono le uniche proteine che possiedono IRE nel loro mRNA. Il messaggero per DMT1 ha due varianti di splicing al 3' e una di queste, al pari del TfR1, ha un IRE. La variante di splicing contenente l'IRE è particolarmente abbondante nel duodeno dove ci potrebbe essere la necessità di un rapido incremento della proteina per facilitare l'acquisizione dell'assorbimento del ferro. In altri tessuti come ad esempio il fegato invece l'espressione delle due varianti è comparabile.

Anche la ferroportina ha un IRE a livello della regione 5'-UTR e la sua traduzione è bloccata quando i livelli cellulari di ferro sono bassi. Questo tipo di regolazione è attivo in tessuti come il fegato dove i livelli di Fpn sono correlati direttamente alla concentrazione intracellulare del ferro. Tuttavia, nell'intestino, i livelli della proteina variano in maniera inversamente proporzionale alla concentrazione plasmatica del metallo, suggerendo che la sua regolazione, in questo tessuto, è più complessa, indipendente dal sistema IRE/IRP e probabilmente avviene a livello trascrizionale (Abboud & Haile, 2000). Nonostante questa osservazione, la delezione di entrambi i geni per IRP1 e 2 in modelli murini porta ad un incremento nei livelli dell'espressione di ferroportina. Così sembra probabile che nell'intestino sia il sistema di regolazione dipendente dalle IRP che quello da esso indipendente (probabilmente trascrizionale) modulino l'espressione di Fpn, con il primo meccanismo predominante in condizioni di carenza del metallo quando i livelli di Fpn risultano particolarmente elevati.

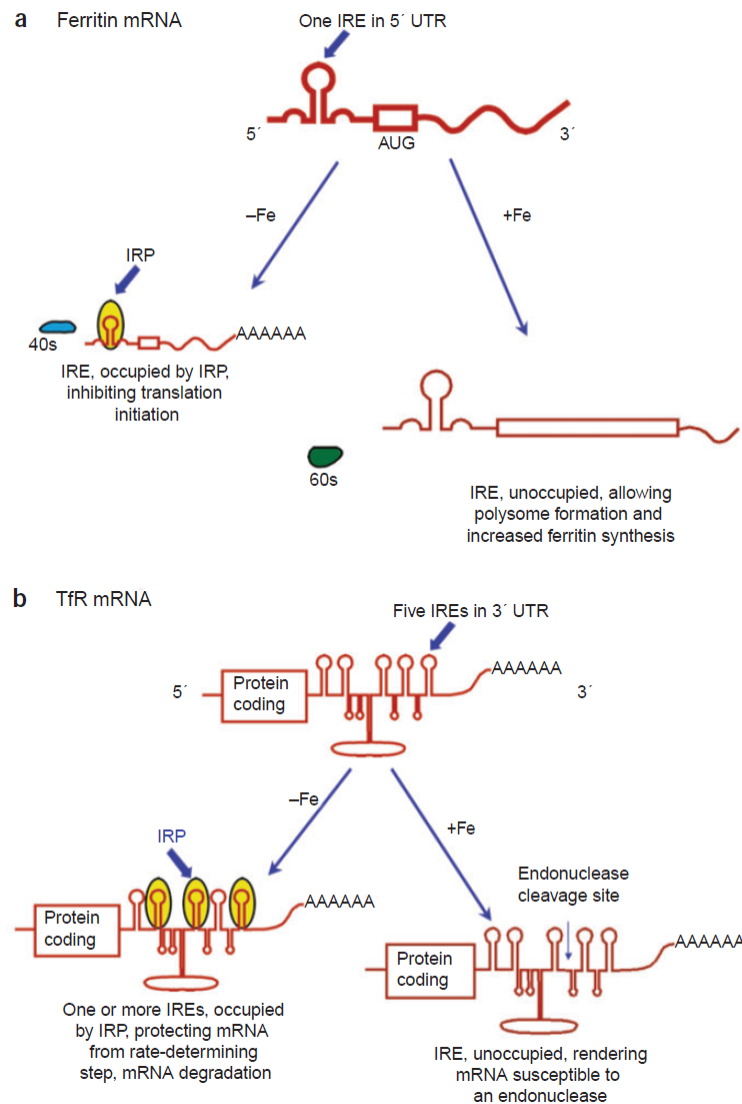


Figura 6. La traduzione della ferritina e la degradazione dell'mRNA per il TfR sono regolati dal legame delle IRP. a) In cellule carenti in ferro, il legame delle IRP agli IRE al 5'-UTR dell'mRNA della ferritina interferisce con la sua traduzione. b) Il legame delle IRP a livello degli IRE al 3'-UTR del TfR protegge il trascritto dal taglio endonucleasico e dalla conseguente degradazione. La freccia evidenzia il sito a livello del quale una endonucleasi ad oggi sconosciuta media il taglio sul trascritto per il TfR in cellule rifornite di ferro quando questo non è protetto dal legame delle IRP (Rouault, 2006).

Le IRP1 e 2 rispondono al ferro attraverso meccanismi tra di loro differenti. In condizioni di carico di ferro, IRP1 contiene un cluster ferro-zolfo e questo conferisce alla proteina una attività aconitasica (in questa conformazione la proteina è conosciuta come aconitasi citosolica). Tuttavia, quando il quantitativo di ferro non è sufficiente, il cluster ferro-zolfo si disassembla e IRP1 è in grado di legare gli IRE. Dall'altro lato, IRP2 che non contiene alcun cluster ferro-zolfo è regolata da un meccanismo di sintesi e degradazione. Quando il ferro è

abbondante, la proteina è ubiquitinata e degradata per via proteasomica, mentre in sua assenza, risulta stabile e in grado di legare gli mRNA target.

Entrambe le IRP sono espresse in maniera abbastanza diffusa in tutti i tessuti dell'organismo, con una modalità in parte più ristretta per IRP2 (Rouault, 2006).

Regolazione trascrizionale

Non tutte le proteine coinvolte nel trasporto del ferro sono regolate dal sistema IRE/IRP, e anche quelle che lo sono mostrano un certo grado di regolazione di tipo trascrizionale in risposta ai cambiamenti nello stato cellulare di ferro. Ad esempio, l'espressione della variante di splicing del messaggero per DMT1 non contenente l'IRE è incrementata in condizioni di deficit di ferro, e come già evidenziato, il gene codificante per la Fpn subisce probabilmente una regolazione trascrizionale, almeno nell'intestino tenue. In maniera simile, l'espressione della ferro-reduttasi DcytB sull'orletto a spazzola degli enterociti duodenali è incrementata in condizioni di deficit di ferro, nonostante il suo mRNA non contenga elementi IRE e quindi anche in questo caso, risulta plausibile una regolazione trascrizionale. Una regolazione trascrizionale ferro-dipendente è stata descritta anche per la ferritina e per il gene codificante il TfR1, ma questa sortisce solo lievi effetti. Gli elementi genici richiesti per la risposta al ferro in questo meccanismo ancora non sono stati identificati.

I geni codificanti per proteine coinvolte nell'omeostasi del ferro possono essere regolati da una serie di fattori aggiuntivi, oltre al ferro, che probabilmente esibiscono i loro effetti a livello trascrizionale. Due di questi, che rientrano tra i più importanti stimoli regolatori, sono l'ipossia e le citochine pro-infiammatorie. In condizioni di ipossia, l'espressione di un gran numero di geni coinvolti nell'omeostasi del ferro è incrementata, e questo riflette le richieste fisiologiche di mobilitare il metallo verso il midollo osseo per la sintesi di emoglobina. I fattori inducibili dall'ipossia sembrano essere particolarmente importanti nella modulazione del TfR1. In maniera analoga, una serie di citochine infiammatorie hanno mostrato di influenzare a livello trascrizionale diversi geni coinvolti nell'omeostasi del ferro. Questo meccanismo probabilmente si è evoluto da una risposta adattativa volta a limitare la disponibilità del ferro ai patogeni invasivi.

È importante riconoscere che ci sono importanti variazioni tessuto-dipendenti nell'espressione di DMT1 e Fpn. Nella maggior parte dei casi, l'espressione di DMT1 è incrementata a seguito della diminuzione del ferro e incrementata quando i livelli si alzano.

Tuttavia, in alcuni tessuti come il fegato e i reni, non sono stati riscontrati cambiamenti nei livelli di DMT1 a seguito di un aumento nei quantitativi di ferro. Il meccanismo alla base di queste risposte non è chiaro. I livelli di RNA messaggero sono incrementati nel fegato a seguito di sovraccarico di ferro, coerentemente con quella che è la regolazione dipendente dalle IRP, ma nell'intestino tenue sono ridotti nelle stesse condizioni e diverse evidenze suggeriscono che in questa sede operino sia una regolazione trascrizionale che una non trascrizionale (Anderson & Vulpe, 2009).

Cambiamento della localizzazione subcellulare

Un importante meccanismo messo in atto per variare rapidamente il movimento del ferro attraverso la membrana è quello che prevede la modificazione della localizzazione subcellulare delle proteine coinvolte nel trasporto. Questo, rispetto a quello che agisce sull'espressione genica, è un metodo molto più rapido e che di solito è usato come prima linea di difesa in risposta alle variazioni delle richieste di ferro. Spesso questi cambiamenti sono affiancati da una regolazione a lungo termine di tipo traduzionale o trascrizionale.

Alcuni esempi di seguito illustrati evidenziano come il cambiamento della localizzazione di una data proteina possa determinare una variazione nel trasporto del ferro:

(1) DMT1 è espresso sulla membrana dell'orletto a spazzola degli enterociti duodenali e resta a questo livello fin quando ci sono richieste di ferro dalle restanti parti dell'organismo. Tuttavia, quando il trasferimento del ferro attraverso la membrana basolaterale diminuisce e di conseguenza c'è un incremento del quantitativo di ferro negli enterociti, DMT1 viene rapidamente internalizzato. Questo previene l'eccessivo accumulo di ferro negli enterociti quando non ce ne è richiesta (Yeh et al., 2000).

(2) La Fpn può essere rapidamente rimossa dalla membrana plasmatica a seguito del legame con il suo peptide regolatore hepcidina e questo previene l'esporto del ferro. Il complesso viene internalizzato e indirizzato al proteasoma per la degradazione (Nemeth et al., 2004).

(3) Il quantitativo di TfR1 sulla superficie cellulare può variare in base allo stato cellulare di ferro. Quando la domanda di ferro sale, viene espresso più TfR1 e viceversa.

(4) Il TfR2 viene stabilizzato in presenza del suo ligando (Tf diferrica) e reindirizzato a livello endosomiale per il riciclo (Johnson et al., 2007).

1.5 Metabolismo del ferro a livello sistemico

Trasporto plasmatico del ferro

In condizioni fisiologiche normali, essenzialmente tutto il ferro plasmatico è legato alla transferrina. Solo in condizioni patologiche, quando il ferro entra in circolazione in maniera eccessiva, appaiono quantità significative di NTBI. La Tf è una delle proteine plasmatiche più abbondanti, e in un adulto normale, è presente ad una concentrazione di 25-50 μM (2-4 mg/ml). La maggior parte della Tf plasmatica è sintetizzata a livello del fegato, anche se in parte può essere prodotta localmente anche dal SNC e dai testicoli. In condizioni normali, solo il 30% della Tf circolante è saturata con il ferro. Così, la proteina si presta bene a tamponare un eventuale rapido incremento del ferro plasmatico e quindi previene l'accumulo di specie NTBI potenzialmente tossiche.

La struttura della Tf è stata ampiamente studiata: consiste di due lobi globulari (N e C-terminali), ognuno dei quali è in grado di legare un singolo atomo di ferro con una affinità molto elevata e questo spiega come possa essere mantenuta una concentrazione plasmatica così bassa di NTBI. Come già evidenziato, la funzione della Tf non è tanto quella di indirizzare il ferro ai tessuti (in quanto anche le forme NTBI possono essere facilmente assorbite dalla maggior parte delle cellule) quanto quella di farlo in maniera controllata e regolata. Dal momento che la Tf ha un ruolo così essenziale, non è sorprendente che venga sintetizzata costitutivamente ad alti livelli, che variano solo in risposta a una gamma limitata di stimoli di differente natura: i livelli di Tf aumentano lievemente in condizioni di deficit di ferro e la sua sintesi può essere stimolata in qualche maniera anche da ipossia e da estrogeni. La maggior parte della regolazione cui è soggetta la Tf sembra avvenire a livello trascrizionale, sebbene esista anche qualche tipologia di regolazione di tipo traduzionale (Anderson & Vulpe, 2009).

Regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro

Nessuna considerazione sul trasporto del ferro può considerarsi completa senza menzionare gli ultimi sviluppi sulla comprensione dei meccanismi di regolazione coordinata dell'omeostasi del ferro nell'organismo. Nel 2004, Nemeth e collaboratori hanno evidenziato il ruolo critico assunto dal peptide di derivazione epatica hepcidina nella modulazione dell'ingresso del ferro nel plasma dai macrofagi, dagli enterociti intestinali e da altre cellule dell'organismo.

L'ormone di regolazione del ferro epcidina è un piccolo peptide di 25 amminoacidi e peso molecolare di 2,7 kDa (**Figura 7**). Il segmento di sei amminoacidi N-terminale dell'epcidina è altamente conservato e risulta essenziale per la funzione di regolazione del ferro e per l'interazione con il suo recettore ferroportina. Il resto della molecola è organizzato a formare una struttura ricurva a forcina β tenuta insieme da quattro ponti disolfuro. Il peptide maturo di 25 amminoacidi è generato da un prepropeptide di 84 residui contenente una sequenza segnale N-terminale di 24 amminoacidi che viene rimossa per generare l'intermedio cellulare proepcidina. Non ci sono evidenze che lascino pensare che questo intermedio abbia altre funzioni oltre a quella di precursore dell'epcidina. La generazione della forma matura di 25 amminoacidi richiede l'azione di taglio da parte di una furina convertasi che taglia il pro-ormone a livello del C-terminale peptidico, a valle di una caratteristica sequenza polibasica. In aggiunta, forme di epcidina più corte troncate all'N-terminale (di 20 e 22 amminoacidi) si riscontrano nelle urine umane o anche nel plasma (la forma di 20 amminoacidi), generalmente in concentrazioni molto più basse di quelle riscontrate per la forma intera di 25 amminoacidi. L'epcidina umana è codificata da tre esoni di un singolo gene situato sul cromosoma 19. Una simile struttura a tre esoni conservata, si trova anche nella sequenza codificante per l'epcidina di altri vertebrati. Nel topo ci sono due geni codificanti questo ormone, ma solo l'epcidina-1 risulta quella coinvolta nell'omeostasi del ferro. Anche in altre specie di vertebrati, come ad esempio alcuni pesci, ci sono due o più copie di geni codificanti per l'epcidina, alcuni dei quali non sono prodotti dal fegato in maniera specifica e sembrano essere trascritti solo durante processi infettivi. Questi risultati portano a pensare che l'epcidina possa essersi evoluta dai primi vertebrati, forse quale peptide antimicrobico che in un secondo momento è stato coinvolto nella regolazione del ferro (Ganz, 2013).

L'epcidina agisce a livello post-traduzionale controllando la concentrazione del suo recettore, ferroportina, sulla membrana plasmatica. Siccome la Fpn è il trasportatore che indirizza il ferro derivante dalla dieta, dalle fonti di immagazzinamento e da quelle di riciclo nel plasma, l'interazione epcidina-ferroportina controlla effettivamente il flusso totale del ferro nel plasma e assicura il rifornimento del metallo a tutti i tessuti che ne fanno uso. L'epcidina lega direttamente la Fpn, promuovendo la sua endocitosi e la successiva proteolisi nei lisosomi. (Nemeth et al., 2004).

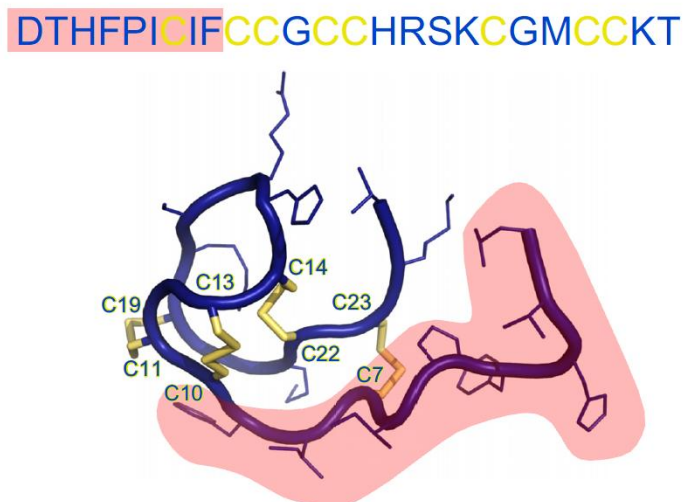


Figura 7. Sequenza amminoacidica e struttura dell'epcidina. Il segmento NH₂-terminale responsabile dell'interazione con ferroportina (Preza et al., 2011) è indicato in rosa. Le cisteine caratteristiche del peptide e i relativi ponti disolfuro che sono presenti nella forma matura dell'ormone sono rappresentati in giallo (Ganz 2013).

L'identificazione dell'interfaccia di legame tra i due partner funzionali è stata ottenuta studiando gli effetti di mutazioni naturali o indotte sperimentalmente su entrambe le molecole (Preza et al., 2011). Per quanto riguarda l'epcidina, i cinque amminoacidi N-terminali risultano necessari e i nove N-terminali invece, sufficienti per la sua attività biologica. Per la ferroportina invece, l'identificazione del potenziale sito recettoriale è stata ampiamente aiutata dalla scoperta di una famiglia, i cui membri sono caratterizzati da resistenza all'epcidina come risultato di una sostituzione isosterica della cisteina in posizione 326 con una serina (Sham et al., 2009). Questa cisteina, dall'analisi dei modelli di Fpn ad oggi disponibili, è situata in un loop proteico extracellulare ed è chiamata a svolgere un ruolo critico nel legame con l'epcidina.

Il legame dell'epcidina alla ferroportina è seguito dall'ubiquitinazione di una serie di lisine situate in un segmento citoplasmatico della Fpn e sembra essere richiesta per la successiva endocitosi della proteina (Qiao et al., 2012; Ross et al., 2012). Non è ancora stato chiarito se il meccanismo di endocitosi avvenga attraverso vescicole rivestite di clatrina (De Domenico et al., 2007c), se intervenga un meccanismo differente di endocitosi (Auriac et al., 2010), o entrambi. In ogni caso potrebbero esserci differenze sulla base delle tipologie cellulari.

Regolazione dell'epcidina

Regolazione positiva

La trascrizione dell'epcidina negli epatociti dipende dalla cascata di segnalazione BMP (proteina morfogenetica dell'osso)/SMAD. BMP6 rappresenta il ligando del recettore BMPR di risposta al ferro. Nel fegato BMP6 risulta espressa principalmente da cellule non parenchimali, come quelle endoteliali dei sinusoidi e le cellule di Kupffer. Il legame del ligando al recettore per la BMP sulla superficie epatica innesca la fosforilazione delle proteine SMAD, che traslocano nel nucleo e attivano una serie di geni target tra cui quello codificante per l'epcidina. L'emogiuvina (HJV) che risulta alterata nell'emocromatosi giovanile di tipo 2A, rappresenta il corecettore essenziale di BMP in questa via di segnalazione. Nell'uomo, una sua inattivazione causa un grave sovraccarico di ferro a insorgenza precoce, non distinguibile da altri tipi di emocromatosi causate dall'inattivazione proprio del gene per l'epcidina. Le emocromatosi di tipo 1, 2 e 3 presentano alterazioni nella via di segnalazione BMP/SMAD che si esplicano con una insufficienza di epcidina. Come evidenziato, la funzione dell'HJV nell'attivazione dell'epcidina è stata chiaramente definita, mentre quella delle proteine HFE e TfR2, coinvolte rispettivamente nell'emocromatosi di tipo 1 e di tipo 3, resta ancora dubbia.

Nell'infiammazione, l'epcidina è attivata dall'IL-6, dall'IL-1 β e da altre citochine come anche dal lipopolisaccaride (LPS) attraverso la via di segnalazione JAK2/STAT3. Per una risposta completa dell'epcidina all'infiammazione risulta comunque essenziale anche l'integrità della via di segnalazione BMP/SMAD e l'interazione tra le due vie è soggetta a studi intensi (Camaschella, 2013).

Regolazione negativa

L'eritropoiesi utilizza la maggior parte del ferro derivante dall'assorbimento e dal riciclo (circa 25 mg al giorno), perciò non è sorprendente che l'espressione dell'epcidina venga soppressa in ogni condizione caratterizzata da un innalzamento della domanda eritroide di ferro e dei livelli di eritropoietina circolante, quali ad esempio deficit di ferro, ipossia o aumentata eritropoiesi. Un inibitore chiave dell'epcidina è stato scoperto attraverso il clonaggio posizionale del gene responsabile del fenotipo Mask in modelli murini. Questi animali risultano caratterizzati da anemia microcitica, alti livelli di epcidina e non sono capaci di assorbire ferro se fornito per via orale (Du et al., 2008). La matriptasi-2 codificata dal gene

TMPRSS6 è una proteasi transmembrana di tipo II a serina, espressa dal fegato, che risulta inattivata nei topi Mask a causa di un troncamento della proteina e una conseguente perdita del dominio catalitico. *TMPRSS6* interagisce con il corecettore del BMP, HJV e lo taglia, spegnendo la segnalazione BMP e determinando di conseguenza una riduzione della trascrizione del gene per l'epcidina. In condizioni di deficit di ferro, la funzione di *TMPRSS6* è quindi essenziale per la soppressione dell'epcidina e per consentire l'assorbimento del ferro (Camaschella, 2013).

1.6 Patologie da dismetabolismo del ferro

1.6.1 Disordini da carenza di ferro

Il deficit di ferro è la causa che più frequentemente determina insorgenza di anemia; si stima che quasi due miliardi di persone nel mondo, sia nei Paesi sottosviluppati che nell'emisfero occidentale, soffrano di tale affezione.

Essendo il ferro un costituente importante dell'eme, la sua carenza blocca la formazione di emoglobina e quindi l'eritropoiesi. A causa della ridotta sintesi di eme, i globuli rossi dei pazienti affetti da disordini da carenza di ferro risultano ipocromici e sono più piccoli del normale. L'ipocromia e la microcitemia rappresentano infatti le caratteristiche più evidenti dell'anemia da carenza di ferro; in condizioni di deficit più grave, il disturbo può interessare diversi organi, in quanto il ferro è necessario alla funzione di numerose altre proteine diverse dall'emoglobina (Sheftela et al., 2012).

Le anemie dovute a carenza di ferro possono essere suddivise in genetiche e acquisite.

Anemie genetiche da carenza di ferro

Ad oggi, la carenza di ferro di origine genetica è essenzialmente rappresentata dall'anemia ferro-refrattaria (Iron-Refractory-Iron-Deficiency-Anemia, IRIDA). Si tratta di una malattia autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene *TMPRSS6*, che codifica per l'enzima matriptasi-2 (Cau et al., 2010). Mutazioni a carico di questo enzima portano ad una mancata regolazione negativa dell'epcidina e conseguente aumento cronico dei suoi livelli plasmatici. L'anemia da carenza di ferro che ne deriva è quindi dovuta a una diminuzione dell'assorbimento del ferro duodenale e al suo sequestro a livello macrofagico (Finberg et al., 2008). L'IRIDA è caratterizzata da una grave anemia microcitica con bassa saturazione della transferrina e livelli plasmatici di ferritina normali o elevati.

Anemie acquisite da carenza di ferro

Il principale disturbo acquisito che guida all'insorgere di una anemia da deficit di ferro è indicato come anemia da infiammazione. In generale, stimoli infiammatori, quali quelli derivanti da una infezione batterica, portano a ipoferremia acuta presumibilmente nel tentativo dell'organismo di limitare la crescita batterica riducendo il ferro disponibile. Tuttavia, se lo stimolo infiammatorio persiste, la condizione di ipoferremia può portare a una limitazione dell'eritropoiesi. L'anemia in questo caso è caratterizzata da ritenzione del ferro nella mucosa intestinale e nei macrofagi. L'incapacità nel trasportare il ferro conduce ad un decremento delle riserve di transferrina-Fe(III) e ad una limitata eritropoiesi. L'incremento della ritenzione cellulare di ferro è il risultato della riduzione dei livelli di Fpn sulla membrana cellulare, a sua volta dovuta a una incrementata secrezione di epcidina.

Come descritto in precedenza, IL6 e altre citochine, che aumentano in risposta alle infezioni, inducono la trascrizione dell'epcidina. L'IL6 agisce sulla trascrizione dell'epcidina attraverso l'attivazione della via di segnalazione STAT3. Una delezione specifica a livello del fegato dei recettori per l'IL6 riduce severamente la trascrizione dell'epcidina cui si assiste in condizioni di infiammazione (De Domenico et al., 2008).

1.6.2 Disordini da sovraccarico di ferro

Le patologie da sovraccarico di ferro si manifestano quando la quantità di ferro immessa a livello plasmatico supera la capacità di legame della transferrina. Ciò dipende dalla perdita della capacità di regolazione negativa dell'assorbimento del ferro in risposta agli incrementi delle sue riserve.

L'accumulo del ferro assorbito in eccesso nei tessuti parenchimali avviene con un sistema di trasporto del ferro indipendente dalla transferrina. A questo livello il metallo può risultare tossico e portare a danno tissutale e fibrosi.

La patologia da sovraccarico di ferro dovuta a alterazione genetica nell'acquisizione del metallo viene definita come patologia da sovraccarico di ferro primaria o emocromatosi ereditaria (HH) (**Tabella 1**).

Ad oggi, l'HH è stata attribuita al possibile difetto in 4 geni; l'alterazione di tre di questi porta ad una patologia di tipo autosomico recessivo mentre una quarta forma di HH risulta di tipo dominante. Tutti i disordini di tipo recessivo sono da ricercarsi in una inadeguata

produzione di epcidina in seguito ad un incremento delle riserve di ferro nell'organismo (De Domenico et al., 2008).

Emocromatosi di tipo 1

I pazienti con HH di tipo 1, la forma più comune di patologia da sovraccarico di ferro, mostrano un incrementato assorbimento di ferro e un suo deposito nel fegato, nel cuore, nel pancreas e nella pelle. Nel tempo, l'eccesso di ferro nei tessuti porta a cirrosi epatica, fibrosi e diabete. L'HH di tipo 1 è dovuta a mutazioni nel gene *HFE* (la sigla deriva dall'inglese "high Fe", ferro elevato) (Feder et al., 1996), codificante per una proteina atipica di classe 1 del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che forma un complesso con la β 2-microglobulina, componente delle molecole di classe 1 dell'MHC. È ormai noto che la proteina HFE formi anche un complesso con il Tfr1, ma non è chiaro come questo complesso regoli la produzione di epcidina. La mutazione più comune riscontrata nel gene HFE è quella in cui la cisteina in posizione 282 nella sequenza amminoacidica viene sostituita con una tirosina (C282Y). La cisteina mutata previene nella proteina HFE la formazione di un ponte disolfuro con la β 2-microglobulina, e risulta nella produzione di una proteina non stabile. Questa è una mutazione comune nei caucasici, dovuta all'effetto fondatore.

Un altro polimorfismo comune nel gene HFE è quello che vede la sostituzione dell'istidina in posizione 63 con un acido aspartico (H63D) ed è associato a un sovraccarico di ferro in particolar modo quando si trova in associazione in eterozigosi con la sostituzione C282Y (De Domenico et al., 2008).

Emocromatosi di tipo 2

Questa è anche denominata anche emocromatosi giovanile, poiché i pazienti mostrano un accelerato sovraccarico di ferro che può condurre alla morte prima dei 30 anni.

A differenza dei pazienti affetti da HH di tipo 1, quelli con la forma di tipo 2 spesso presentano gravi disfunzioni cardiache ed endocrine piuttosto che patologie del fegato. Mutazioni in due differenti geni possono portare all'HH di tipo 2: quelle a carico dell'HJV (emogiuvina, HH di tipo 2A) oppure quelle a carico del gene HAMP codificante per l'epcidina (HH di tipo 2B). L'HJV è sintetizzata come una proteina legata alla membrana da un'ancora di glicosil fosfatidil inositolo (GPI) ed è un corecettore della BMP.

La segnalazione attraverso il BMP guida alla trascrizione dell'epcidina. L'HJV è sintetizzata dagli epatociti, che rappresentano anche la sede di produzione dell'epcidina, ma è anche abbondante nel muscolo e può essere tagliata dalla superficie delle cellule del muscolo per essere rilasciata in forma solubile. La HJV solubile può legare BMP e fungere da antagonista competitivo della HJV legata alla membrana, risultando in una diminuzione nell'espressione di epcidina. La trascrizione dell'epcidina viene drammaticamente ridotta in assenza dell'HJV legata alla membrana.

Una serie di studi hanno dimostrato che la presenza di transferrina non saturata con ferro previene la formazione di HJV solubile. Questo risultato implica che la produzione di HJV in forma solubile può costituire un legame tra la saturazione della transferrina e l'acquisizione del ferro. Alti livelli di saturazione della transferrina col ferro, dovuti alla prevenzione del taglio dell'HJV portano a una produzione dell'epcidina e a una riduzione del trasporto del ferro mediato dalla ferroportina (De Domenico et al., 2008).

Emocromatosi di tipo 3

L'HH di tipo 3 è dovuta a mutazioni nel gene che codifica per il recettore di tipo 2 della transferrina. L'accumulo di ferro nei pazienti con l'emocromatosi di tipo 3 si riscontra nella seconda o terza decade della vita, ma la progressione della patologia da sovraccarico di ferro è lenta, rispetto a quella a cui si assiste nell'emocromatosi di tipo 2 (Roetto et al., 2002). Il recettore per la transferrina di tipo 2 è omologo a quello di tipo 1, ma ha una distribuzione tissutale più ristretta rispetto a quest'ultimo. Anche esso può legare anche la transferrina-Fe(III), ma lo fa con affinità molto più bassa di quella del recettore di tipo 1 e in ogni caso l'indirizzamento del ferro alle cellule non è la sua principale funzione, che risulta invece connessa alla produzione di epcidina. Infatti, mutazioni nel Tfr2 nell'uomo o delezioni in geni target nel topo sono associate a diminuzione della sua espressione e a una patologia da sovraccarico di ferro. Non è chiaro come il recettore per la transferrina 2 influenzi la produzione di epcidina, ma è interessante notare che la stabilità del Tfr2 è dipendente dalla transferrina-Fe(III). In assenza di transferrina-Fe(III) il tasso di turnover del recettore per la Tf di tipo 2 è incrementato drammaticamente e ciò si riflette anche sui livelli di espressione dell'epcidina (De Domenico et al., 2008).

Emocromatosi di tipo 4

È anche denominata "malattia da ferroportina" e non è il risultato di una produzione anomala di epcidina ma è dovuta a mutazioni nel gene codificante per la ferroportina. I fenotipi clinici sono due e possono essere caratterizzati da accumulo di ferro nei macrofagi, con bassi livelli di saturazione della transferrina (che variano dal 20 al 30%) e eritropoiesi limitata dalla carenza di ferro (forma tipica), oppure da accumulo di ferro negli epatociti, con alti livelli di saturazione della transferrina sierica (con valori superiori al 55%; forma atipica) (Pietrangelo, 2004). I due fenotipi trovano spiegazione nelle caratteristiche della proteina mutata: se la ferroportina non viene traslocata correttamente a livello della membrana plasmatica o risulta incompetente nel trasporto si manifesta un sovraccarico di ferro nei macrofagi; se la mutazione invece rende la ferroportina resistente all'internalizzazione indotta dall'epcidina, l'accumulo di ferro avviene a livello epatico (Fernandes et al., 2009).

La trasmissione dominante di entrambe le forme potrebbe essere il risultato di un effetto di dominanza negativa esercitato dalla forma mutata sul dimerico di ferroportina. Ci sono però alcuni studi che indicano la ferroportina come monomero e la patologia in questo caso potrebbe essere spiegata da un meccanismo di aploinsufficienza. Supporti genetici all'effetto dominante negativo derivano dall'osservazione che tutte le mutazioni umane causative di patologia, e una identificata in topo, sono di tipo missenso e non ne sono state riscontrate di non senso. Coerentemente con questa ipotesi, topi con una delezione in uno dei due alleli codificanti per ferroportina non esibiscono fenotipi patologici. Tuttavia, topi con una mutazione missenso (H32R) in uno dei due alleli codificanti per ferroportina (denominati mutanti flatiron) mostrano accumulo del ferro nei macrofagi, bassi livelli di saturazione della transferrina sierica e anemia simile a quella umana dovuta a HH di tipo 4. Infine la sovra-espressione di mutanti di ferroportina di topo, che inducono accumulo di ferro nei macrofagi, in zebrafish wild type, porta a una menomazione nell'esporto del ferro; ciò implica che la ferroportina mutante influenzi la funzionalità della wt (De Domenico et al., 2008).

I pazienti con la forma tipica della malattia da ferroportina possono mostrare una eritropoiesi diminuita dovuta alla carenza di ferro, come risultato del danneggiamento del riciclo di ferro operato dai macrofagi. Questi pazienti non mostrano effetti ovvi di difetto dell'assorbimento di ferro a livello intestinale e questo risultato implica che c'è plasticità nell'assorbimento intestinale del ferro che può essere incrementato a seguito dell'aumentata

richiesta di ferro. In contrasto, il difetto del riciclo del ferro nei macrofagi indica che in questa sede l'espressione di Fpn è già al livello massimo.

La seconda forma di HH di tipo 4 risulta da incapacità dell'epcidina di indurre degradazione della Fpn. Di conseguenza, sia i macrofagi che le cellule intestinali continuano a esportare ferro anche a fronte di un'alta espressione di epcidina. Questa resistenza può risultare da una incapacità della Fpn nel legare l'epcidina o da un difetto dell'internalizzazione di Fpn da essa indotta (De Domenico et al., 2005).

GENE COINVOLTO	EREDITARIETÀ	MALATTIA	FENOTIPO	Referenze
<i>HFE</i>	autosomica recessiva	HH di tipo 1	tipo classico, sovraccarico di ferro a livello parenchimale, cirrosi	Feder et al., 1996
<i>HJV</i>	autosomica recessiva	HH di tipo 2A	tipo giovanile, sovraccarico di ferro a livello parenchimale, cardiomiopatia	Papanikolaou et al., 2004
<i>HAMP</i>	autosomica recessiva	HH di tipo 2B	tipo giovanile, sovraccarico di ferro a livello parenchimale, cardiomiopatia	Roetto et al., 2003
<i>TfR2</i>	autosomica recessiva	HH di tipo 3	insorgenza precoce, sovraccarico di ferro a livello parenchimale, cirrosi	Camaschella et al., 2000
<i>SLC40A1 (FPN)</i>	autosomica dominante	HH di tipo 4 (malattia da ferroportina)	sovraccarico di ferro a livello degli epatociti o dei macrofagi	Njajou et al., 2001; Montosi, 2001

Tabella 1. Caratteristiche riassuntive delle diverse tipologie di emocromatosi (De Domenico et al., 2008).

2. SCOPO DELLA TESI

La ferroportina (SLC40A1) è una proteina politopica di membrana di 62,5 kDa che media l'esporto del ferro ferroso da cellule specializzate dell'organismo alla circolazione sanguigna. Ad oggi, è l'unica proteina deputata a svolgere questa funzione ad essere stata identificata nei mammiferi.

A livello sistemico, la ferroportina è soggetta ad un meccanismo di regolazione negativa post-traduzionale operato dall'epcidina, peptide secreto dal fegato in risposta ad innalzamento dei livelli di ferro nell'organismo, che legandosi ad essa innesca un meccanismo di internalizzazione e degradazione lisosomiale del trasportatore (Nemeth et al., 2004). Appare evidente quindi, come la ferroportina sia un importante regolatore dei quantitativi di ferro intracellulari e sistemici dell'organismo.

Nell'uomo, la maggior parte delle mutazioni a carico della ferroportina ne influenzano la localizzazione sulla membrana plasmatica o la capacità di esporto del ferro. Quando si verifica questa situazione di perdita di funzione si assiste all'insorgenza del fenotipo classico della patologia, definita come "malattia da ferroportina" (o emocromatosi di tipo IV) in cui si riscontrano alti livelli di ferritina sierica, deficit di ferro plasmatico e ritenzione del metallo preferenzialmente a livello delle cellule del sistema reticoloendoteliale (Pietrangelo, 2004). In contrasto, a questa manifestazione fenotipica classica, ci sono alcune mutazioni a carico del gene *SLC40A1* che non influenzano l'esporto del metallo attraverso il canale proteico, ma portano alla produzione di una proteina che manifesta una parziale, o in alcuni casi completa, resistenza all'epcidina. I pazienti con mutazioni di questa seconda tipologia presentano un fenotipo patologico con tratti simili a quelli dell'emocromatosi di tipo classico. Nello specifico, a causa del maggior flusso di ferro attraverso i macrofagi riciclatori e dell'aumentato assorbimento del metallo a livello duodenale, si rileva un incremento nei livelli di saturazione della transferrina sierica e un accumulo di ferro per lo più a livello parenchimale (Wallace et al., 2004).

Ad oggi, la struttura cristallografica della ferroportina non è stata ancora risolta e mancano di conseguenza informazioni riguardo al meccanismo di azione da essa mediato per l'esporto del ferro.

È evidente come qualsiasi studio volto all'identificazione della struttura proteica o alla caratterizzazione del meccanismo di funzionamento di ferroportina, possa risultare utile anche alla comprensione dei fenotipi patologici associati alle alterazioni del trasportatore. Qualsiasi informazione aggiuntiva apportata in materia può quindi essere applicata alla ricerca di target terapeutici per il miglioramento o lo sviluppo di nuove tipologie di trattamento.

Il lavoro di dottorato è stato incentrato sullo studio strutturale e funzionale della ferroportina. Per l'analisi di questa complessa proteina di membrana sono stati scelti due differenti approcci: da un lato, è stato messo a punto un sistema eterologo di espressione per ferroportina, indirizzato alla produzione di quantitativi proteici, maggiori di quelli ottenuti finora (Rice et al., 2009), che fornissero le basi per procedere alla sua caratterizzazione biochimica e strutturale. Dall'altro lato, è stato sviluppato mediante tecniche di bioinformatica un modello strutturale della proteina, sulla base del quale è stato ipotizzato un meccanismo di trasporto del ferro, verificato attraverso la produzione e lo studio della funzionalità di mutanti ad hoc di ferroportina.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi bioinformatica e validazione sperimentale

Modellamento molecolare

È stato realizzato un modello strutturale di ferroportina umana utilizzando il programma per il modellamento molecolare I-TASSER. Questo metodo, attraverso diversi approcci utilizzati dal server LOMETS, prevede una prima fase di ricerca in banca dati di templati proteici con ripiegamento strutturale previsto simile a quello della proteina d'interesse. Successivamente, frammenti di struttura escissi dai templati vengono assemblati tramite il simulatore “replica-exchange Monte Carlo” ed i modelli rifiniti in una procedura interattiva che ottimizza l'energia libera di legame e la topologia globale del modello (Roy et al., 2010).

I migliori templati identificati dal programma per l'omologia con la ferroportina sono risultati il trasportatore del glicerolo 3-fosfato GlpT (Huang et al., 2003, codice PDB: 1PW4) e la lattosio permeasi LacY (Guan et al., 2007, codice PDB: G46W); entrambe le proteine appartengono ad *Escherichia coli* e fanno parte della superfamiglia di trasportatori MFS (Major Facilitator Superfamily).

I membri appartenenti a questa superfamiglia proteica funzionano con un meccanismo di accesso alternato, in cui il substrato, legandosi all'interno di una cavità che la proteina espone su uno dei due versanti cellulari (nel caso di Fpn su quello intracellulare, struttura “inward-open”), determina un cambiamento conformazionale del trasportatore, che ne permette il rilascio dal lato opposto (nel caso di Fpn verso lo spazio extracellulare, struttura “outward-open”). Questo processo di solito avviene attraverso almeno uno stato intermedio in cui il sito di legame risulta occluso su entrambi i lati della membrana e non c'è accesso diretto tra i due.

Ad oggi, le strutture cristallografiche dei due templati identificati da I-TASSER sono disponibili unicamente nella conformazione aperta verso l'interno della cellula e quindi il primo modello di Fpn è stato realizzato allo stesso modo.

È stato proposto anche un secondo modello di ferroportina nell'ipotetica conformazione aperta verso l'esterno della cellula. Dato che nessuno dei templati della MFS identificati dal programma I-TASSER è stato cristallizzato in entrambe le conformazioni non è stato possibile usarli per questo modellamento strutturale.

Si è proceduto così, ad una ulteriore ricerca in banca dati proteica per membri della MFS cristallizzati nella conformazione aperta verso l'esterno della cellula che ha portato alla scelta

obbligata del simportatore di protoni/L-fucosio, FucP di *E.coli* (Dang et al., 2010, codice PDB 3O7Q) come stampo per il disegno di questo modello della Fpn. Questa proteina risultava infatti essere l'unico tra i trasportatori della MFS ad essere stato cristallizzato nella conformazione outward-open al momento dello studio.

In questo caso, la struttura 3D di ferroportina è stata realizzata utilizzando sia l'approccio I-TASSER, fornendo al programma la struttura di FucP come template, che attraverso il modellamento per omologia. Sebbene le regioni di similarità tra FucP e la Fpn siano sparpagliate lungo la sequenza e sia impossibile ottenere un allineamento fra le due proteine con metodi tradizionali, si è superato il problema utilizzando il programma AlignMe (Khafizov et al., 2010) che permette l'allineamento di sequenze in maniera flessibile, utilizzando varie misure di similarità per il confronto di due proteine di membrana. Ottenuto l'allineamento è stato costruito anche il modello nella conformazione aperta verso l'esterno della cellula di ferroportina utilizzando il programma Nest (Petrey et al., 2003).

La qualità delle due strutture tridimensionali è stata valutata attraverso il software PROCHECK (Laskowski et al., 1993) ed il calcolo del TM-score.

Attraverso l'analisi dei modelli di Fpn sono stati identificati una serie di potenziali residui chiave nel processo di esporto del ferro attraverso la membrana. Questi, nella proteina in conformazione inward-open, sono organizzati in due siti putativi di legame con il metallo, uno situato a livello centrale nella membrana plasmatica e uno a livello extracellulare. Per verificare la validità dei modelli, sulla base di queste osservazioni, sono stati progettati una serie di mutanti di Fpn la cui funzionalità è stata testata *in vitro*, principalmente attraverso la valutazione della capacità di legame e di esporto del ferro.

Culture cellulari

La linea cellulare utilizzata negli esperimenti è stata quella di cellule embrionali renali umane HEK-293T. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) contenente 4,5 g/L di glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), complementato con siero fetale bovino (Gibco BRL, Life Technologies, Italia) al 10%, glutammina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) 2 mM e gentamicina (Gibco BRL, Life Technologies, Italia) 40 µg/ml. Le colture cellulari sono state coltivate a 37°C in atmosfera saturata al 5% con CO₂ in fiasche per colture da 75 cm² (Sarstedt S.r.l., Verona, Italia), lasciate crescere fino ad ottenere una confluenza dell'85-90% e seminate per gli esperimenti utilizzando tripsina-EDTA

(Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in piastre Petri da 35 mm di diametro (Sarstedt S.r.l., Verona, Italia).

Vettori plasmidici e costrutti

La sequenza codificante per ferroportina umana è stata ottenuta mediante RT-PCR sull'mRNA della linea cellulare di glioma umano U373MG con il sistema cMaster RT-PCR (Eppendorf s.r.l., Milano, Italia) e clonata, per l'espressione in cellule di mammifero, sotto il controllo del promotore forte CMV nel vettore pCMVTag4b (Agilent Technologies, La Jolla, CA) (**Figura 8**) tramite digestione *EcoRI/SalI*. Il clonaggio in questo vettore consente la produzione di una proteina di fusione con l'epitopo FLAG al C-terminale. In aggiunta, è stata generata tramite PCR e clonata nello stesso vettore, una versione di ferroportina umana fusa alla proteina fluorescente GFP (Fpn-GFP).

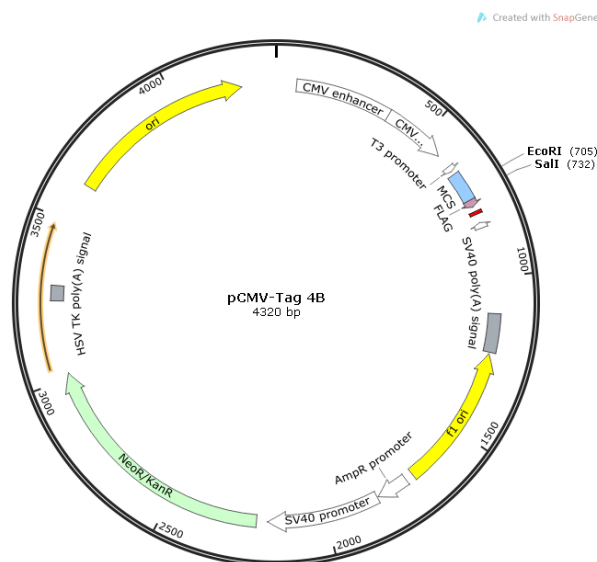


Figura 8. Mappa del vettore pCMV-Tag4B utilizzato per le trasfezioni transienti delle HEK293T. Sono indicati i siti di restrizione (*EcoRI* e *SalI*) utilizzati per il clonaggio della ferroportina.

Mutagenesi sito-diretta

Mutazioni sul gene della ferroportina, clonato nel vettore pCMVTag4, sono state generate ricorrendo al kit di mutagenesi QuikChange Site Directed Mutagenesis XL II (Agilent Technologies, La Jolla, CA) (**Figura 9**).

Il sistema di mutagenesi basato su questo kit commerciale prevede tre fasi:

- viene eseguita una PCR sul plasmide wild type con due primer complementari contenenti la mutazione d'interesse;
- segue la digestione della miscela di PCR con *DpnI*, un'endonucleasi di restrizione che taglia il DNA metilato ed emi-metilato, quindi quello parentale non contenente la mutazione;
- trasformazione di cellule competenti di *Escherichia coli* col plasmide mutato.

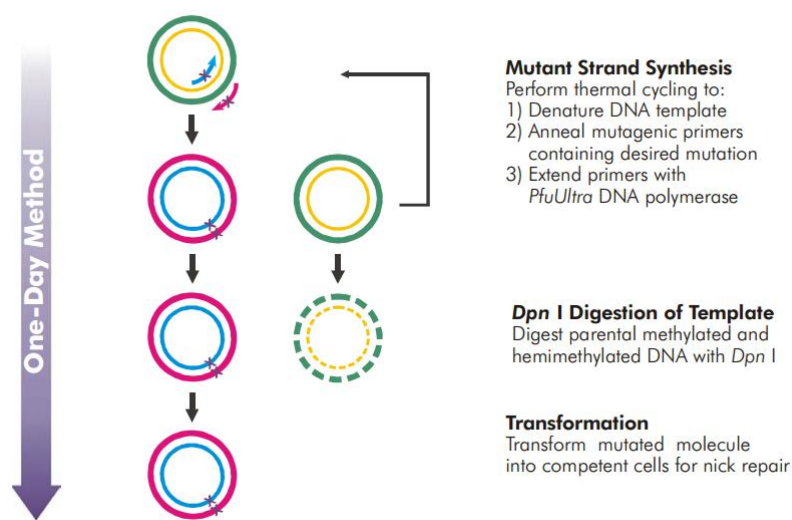


Figura9. Schema generale di mutagenesi su cui si basa il sistema QuikChange Site Directed Mutagenesis XL II (Agilent Technologies, La Jolla, CA). Il plasmide da mutagenizzare viene amplificato tramite PCR con due oligo complementari recanti la mutazione di interesse. Il DNA metilato parentale è digerito con *DpnI* e quello mutagenizzato è utilizzato per trasformare cellule competenti.

Tutti i vettori ricombinanti sono stati amplificati in cellule competenti di *E. coli* e la sequenza nucleotidica dei costrutti verificata, per la presenza delle sostituzioni indotte e l'assenza di eventuali mutazioni non desiderate, mediante sequenziamento automatizzato presso il centro Genechron/ENEA (Italia) o l'Euofins MWG Operon (Germania).

Trasfezioni

Le trasfezioni transienti delle HEK293T con i vari costrutti sono state eseguite attraverso metodica basata sull'impiego di liposomi. La procedura ha previsto l'utilizzo del LipofectamineTM Reagent (Invitrogen, Milano, Italia) e del Plus Reagent (Invitrogen, Milano, Italia), in accordo alle istruzioni fornite dalla ditta.

Il protocollo di trasfezione ottimizzato per la linea cellulare scelta per gli esperimenti e per le condizioni di crescita utilizzate, ha previsto i seguenti passaggi:

- incubazione preliminare di 15 minuti a temperatura ambiente (R.T.) di un 1 µg di DNA plasmidico con 8 µl di Plus Reagent in 100 µl finali di DMEM;
- aggiunta a questa prima mix di 100 µl di DMEM, miscelati in precedenza con 4 µl di LipofectamineTM Reagent, e ulteriore incubazione di 15 minuti a R.T.;
- aggiunta della mix risultante, contenente i liposomi, alle cellule precedentemente lavate con terreno privo di antibiotico, e predisposte in piastra (da 35 mm di diametro) con 800 µl di DMEM (per portare il volume finale, dopo questa aggiunta, a 1 ml);
- incubazione di 4 h a 37°C in atmosfera con CO₂ al 5%.

Il terreno utilizzato in tutti i passaggi di trasfezione è addizionato unicamente di glutammina. Solo dopo questa ultima incubazione di 4h viene sostituito con DMEM completo, eventualmente addizionato di ⁵⁵Fe, in base alle procedure sperimentali da effettuare successivamente.

Saggio di esporto del ferro

Per la misura dell'efflusso del ferro dalle cellule, è stato utilizzato l'isotopo radioattivo 55 del metallo (⁵⁵Fe: 75,182mCi/mg; NEN Life Science, PerkinElmer, Monza, Italia). Il ⁵⁵Fe-NTA è stato preparato come descritto in precedenza (Bonaccorsi di Patti et al., 2004): il ⁵⁵FeCl₃ viene diluito con ferro freddo fino ad un'attività specifica di 18,182 mCi/mg. Il complesso Fe-NTA utilizzato per gli esperimenti è stato preparato fresco unendo ⁵⁵FeCl₃ 1 mM con acido nitrilotriacetico (NTA), secondo un rapporto molare 1:4 e aggiungendo ascorbato 2 mM per mantenere il ferro nello stato di ossidazione Fe²⁺.

Per il dosaggio dell'esporto del ferro, il metallo viene aggiunto ad una concentrazione finale di 10 µM alle cellule quattro ore dopo la trasfezione e lasciato in incubazione per 24 ore. Al termine dell'incubazione, le cellule vengono lisate (come da protocollo di lisi descritto successivamente) e 50 µl del lisato ottenuto vengono diluiti in 5 ml di cocktail di liquido di scintillazione (Ultima Gold, PerkinElmer, Monza, Italia). La radioattività di questa miscela viene determinata tramite un LSC6000 Beckman β-counter, normalizzata sul contenuto proteico totale (misurato con dosaggio di Bradford) e rapportata ai valori ottenuti per le cellule trasfettate con il plasmide privo d'inserto.

Saggio di legame ferroportina/Fe su membrana di nitrocellulosa

La ferroportina ricombinante umana (wt e mutanti) espressa e purificata da *Pichia pastoris* (vedi in seguito) viene incubata ad una concentrazione di 5 μ M con $^{55}\text{FeCl}$ 8 μ M in presenza di ascorbato 1 mM in MOPS 25 mM/NaCl 150 mM a pH 7 a temperatura ambiente per 3 minuti. La soluzione viene spottata su membrana di nitrocellulosa e la membrana lavata con 1 ml di MOPS 25 mM/NaCl 150 mM attraverso filtrazione sottovuoto. Il filtro viene posto in 10 ml di liquido di scintillazione e la radioattività di questa miscela misurata tramite un LSC6000 Beckman β -counter. Al valore di cpm (cicli per minuto) registrato per il campione in esame viene sottratto il valore ottenuto dalla lettura sul bianco (MOPS 25 mM/NaCl 150 mM). I risultati vengono espressi come percentuale di cpm del mutante su quelli misurati per la proteina wt.

Allestimento dei lisati cellulari

Le cellule dopo opportuni trattamenti sperimentali, vengono lisate attraverso la seguente procedura: dopo un lavaggio con 1ml di PBS pre-riscaldato a 37°C, per piastra Petri da 35 mm di diametro, vengono aggiunti sul monostrato cellulare 200 μ l di tripsina e si incuba per qualche minuto a 37°C. Al termine, le cellule vengono recuperate con 700 μ l di DMEM completo in provetta da 1,5 ml. La sospensione cellulare viene centrifugata a 1100 rcf per 8 min a R.T. e il pellet risospeso in 800 μ l di PBS caldo. Dopo ulteriore centrifugata, condotta seguendo le stesse condizioni della precedente, il pellet viene risospeso in 100 μ l di T-NET (Tris HCl 10 mM/NaCl 150 mM/EDTA 10 mM/Triton X-100 1%) addizionato di cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma aldrich, Milano, Italia) e la sospensione incubata 1 h in ghiaccio. Al termine dell'incubazione le cellule, ormai lisate, vengono centrifugate a 14000 rcf a 4°C per 2 min e il surnatante recuperato in un nuovo tubo.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Volumi di lisato contenenti quantitativi equivalenti di proteina vengono caricati su gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 7,5%. I campioni, prima di essere caricati, vengono addizionati di sample buffer SDS 6X (SDS 5%/Tris HCl 50 mM/glicerolo 10%/blu di bromofenolo 0,006% a pH 6,8) contenente DTT (Ditiotreitolo) 100 mM. La corsa elettroforetica viene effettuata su un apparecchio Mini Protean II (BioRad) secondo il metodo di Laemmli (Laemmli, 1970), a 200 V e 27 mA.

Western blot

Dopo corsa elettroforetica le proteine vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa per eventuale analisi di western blot. Lo sviluppo per l'identificazione della Fpn-GFP viene condotto con anticorpo monoclonale anti-FLAG M2 (Sigma, Milano, Italia) diluito 1:2000 in PBS-Tween 0,05% e ECL Plus (GE Healthcare, Milano, Italia).

Fissaggio delle cellule per l'osservazione al microscopio in fluorescenza

Le cellule cresciute su piastre Petri da 35 mm di diametro, a 24 h dalla trasfezione vengono processate come di seguito per l'osservazione in fluorescenza: dopo un lavaggio con 1 ml di PBS caldo viene aggiunto 1 ml di paraformaldeide al 3% in PBS ed il monostrato cellulare lasciato in incubazione per 15 min a temperatura ambiente. Al termine, le cellule vengono lavate per 3 volte con 1 ml di PBS. Viene posizionata una goccia di ProLong® Gold antifade reagents (Life technologies, Monza, Italia) su un vetrino coprioggetto e lo stesso viene capovolto e fatto aderire al fondo della piastra. Il vetrino così predisposto viene fissato sui lati.

Microscopia a fluorescenza

Per l'analisi della localizzazione cellulare della Fpn-GFP wild type e dei mutanti, le cellule dopo essere state fissate in paraformaldeide, sono state visualizzate utilizzando un microscopio confocale invertito DMI 6000 TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH) con un obiettivo 63X a immersione. Le immagini sono state acquisite attraverso il software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) e processate tramite Image J.

3.2 Espressione di ferroportina in *Pichia pastoris*

Ceppi

Il ceppo di *Pichia pastoris* utilizzato per l'espressione della ferroportina umana è stato GS115 con genotipo *his4*. Il lievito wild type possiede una auxotrofia per l'istidina che viene sfruttata come marcatore di selezione dopo trasformazione.

Costrutti e vettori utilizzati

Per l'espressione costitutiva nel ceppo GS115 di *Pichia pastoris*, la sequenza nucleotidica codificante per la ferroportina umana, wt o forme mutate, è stata spostata dal vettore pCMV-Tag4B utilizzato per le trasfezioni delle cellule tumorali umane, tramite digestione

EcoRI/KpnI, nel plasmide pIB2 (**Figura 10**), sia come versione Fpn-FLAG che come Fpn-GFP.

Questo vettore è di tipo integrativo e consente l'espressione costitutiva del gene in esame ponendolo sotto il controllo del promotore GAP. Il vettore contiene anche la sequenza codificante per la istidinolo deidrogenasi di *P. pastoris* che complementa l'auxotrofia per l'istidina.

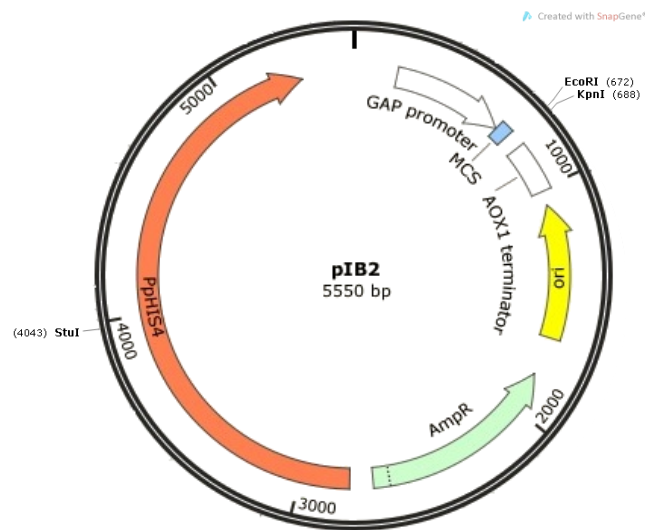


Figura 10. Mappa del vettore pIB2 utilizzato per le trasformazioni di *Pichia pastoris*, ceppo GS115. Sono indicati i siti di restrizione (*EcoRI* e *KpnI*) utilizzati per il clonaggio della ferroportina e il sito unico di taglio per *StuI* sfruttato per la linearizzazione del plasmide prima della trasformazione.

Preparazione di cellule competenti di Pichia pastoris

Prima di procedere alla trasformazione delle cellule di lievito con le differenti versioni di ferroportina è necessario disporre di cellule competenti. La preparazione delle cellule competenti è stata effettuata seguendo il protocollo di Wu e Letchworth (2004) che prevede i seguenti passaggi: una singola colonia di lievito viene pre-inoculata a partire da una piastra in 10 ml di YPD (estratto di lievito 1%/peptone 2%/glucosio 2%) e lasciata a crescere per una notte (o.n.) a 30°C. Il pre-inoculo così ottenuto viene diluito in 50 ml di YPD e messo a crescere a 30°C fino ad ottenere una OD_{600nm} di 1,3-1,5. Raggiunto tale valore, le cellule vengono centrifugate a 3500 rcf per 5 min e il pellet cellulare risospeso in 20 ml di una soluzione di litio acetato (LiAc) 100 mM/DTT 10 mM/sorbitolo 0,6 M /Tris-HCl 10 mM a pH 7,5 ed incubato a temperatura ambiente per 30 min. Al termine della mezz'ora, le sospensione cellulare viene centrifugata a 3500 rcf ed il pellet risospeso in 5 ml di una soluzione fredda di

sorbitolo 1 M. Questo passaggio viene ripetuto per 3 volte. Dopo l'ultima centrifugata, le cellule vengono risospese in 100 µl di una soluzione di sorbitolo 1 M, eventualmente aliquotate, e stoccate a -80°C fino all'utilizzo.

Trasformazione GS115

Il ceppo GS115 di *Pichia pastoris* è stato trasformato attraverso elettroporazione. Ad una aliquota di 40 µl di cellule competenti vengono aggiunti 1-2 µg di DNA plasmidico (pIB2/inserto) linearizzato in corrispondenza del sito di taglio per *StuI*. La miscela così composta viene trasferita in cuvetta e posta in ghiaccio per 5 min. Al termine dell'incubazione, la cuvetta viene disposta nell'apposito alloggiamento di un elettroporatore (Biorad) e viene applicata una corrente di 1500 V. Le cellule, recuperate immediatamente con 1 ml di sorbitolo 1 M freddo, vengono disposte in un tubo da 1,5 ml e centrifugate brevemente. Il pellet cellulare viene risospeso in 200 µl di sorbitolo 1 M e la sospensione ottenuta piastrata su MD (glucosio 2%/YNB 0,67%/agar 1,5%). Le piastre, una volta asciutte, vengono incubate a 30°C fino alla comparsa delle colonie (2-4 giorni).

Preparazione di DNA genomico di lievito e PCR per verifica della trasformazione

Le colonie cresciute su piastra dopo elettroporazione vengono sottoposte a un primo screening per verificare, prima di passare all'espressione proteica, l'avvenuta trasformazione. Per lo scopo viene effettuata una estrazione di DNA genomico seguita da PCR con primer disegnati per l'appaiamento sul gene target.

L'estrazione del DNA genomico viene fatta prelevando direttamente un piccolo quantitativo di cellule di lievito da una colonia singola su piastra. Le cellule vengono risospese in 100 µl di soluzione di lisi (LiAc 0,2 M/SDS 1%) e incubate a 70°C per 15 min. Al termine dell'incubazione vengono aggiunti 300 µl di etanolo assoluto e la miscela centrifugata a 16100 rcf per 1 min. Il pellet ottenuto viene risospeso in 100 µl di TE (Tris HCl 10 mM/EDTA 1 mM a pH 8) e centrifugato nuovamente a 16100 rcf per 1 min. Il supernatante, contenente il DNA, viene recuperato e utilizzato come template per la PCR. Una reazione positiva è indice di una avvenuta trasformazione.

Lisi cellulare ed estrazione delle proteine di membrana da Pichia pastoris su piccola scala

Una singola colonia di lievito viene inoculata in 10 ml di YPD ed incubata a 30°C per 16-18 h. Le cellule dopo incubazione, vengono centrifugate a 3500 rcf per 5 min, risospese in acqua e passate in un tubo da 1,5 ml. Si sottopone la sospensione a nuova centrifugata a 16100 rcf per 1 min e il pellet viene risospeso in un isovolume di tampone di lisi (MOPS 25 mM/NaCl 150 mM pH 7,4/pepstatina 10 µM/leupeptina 30 µM) addizionato di PMSF 1 mM. Alla sospensione viene aggiunto 1 volume di glass beads (Sigma aldrich, Milano, Italia) e vengono eseguiti 5 cicli di vorticate da un minuto alternati ad incubazione in ghiaccio di un minuto e mezzo. Al termine, la sospensione viene centrifugata a 16100 rcf per 1 min, il supernatante raccolto in nuovo tubo e sottoposto a nuova centrifugata a 16100 rcf per 40 min. Il pellet di membrane cellulari che si ottiene viene risospeso in 1 isovolume di tampone di lisi addizionato di detergente, triton X-100 (Sigma aldrich, Milano, Italia) oppure n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM; Affymetrix, Santa Clara, California) all'1% e lasciato a temperatura ambiente per 60 min al fine di consentire l'estrazione delle proteine di membrana. Segue una centrifugata a 16100 rcf di 20 min e la raccolta del supernatante contenente le proteine di membrana solubilizzate.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

I campioni proteici ricavati durante i vari passaggi sperimentali (membrane grezze, proteine solubilizzate o purificate) sono stati analizzati, per vari scopi, attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 7,5%. Come per l'analisi su gel dei lisati delle HEK293T, i campioni prima di essere caricati, vengono addizionati di sample buffer SDS 6X contenente DTT 100 mM. Dopo la corsa elettroforetica (200 V e 27 mA) le proteine vengono evidenziate attraverso colorazione con Blue di Coomassie R-250 per ottenere informazioni sulla purezza del campione, con *orto*-dianisidina (*o*DA) per valutare lo stato metabolico cellulare oppure trasferite su membrana di nitrocellulosa per eventuale western blot.

Western blot

L'espressione di ferroportina è stata valutata attraverso la tecnica del western blot. Dopo elettroforesi su gel di poliacrilammide e trasferimento su membrana di nitrocellulosa, la proteina viene evidenziata con anticorpo monoclonale anti-FLAG M2 (Sigma, Milano, Italia)

diluito 1:2000 in PBS-Tween 0,05% e substrato chemiluminescente, ECL Plus (GE Healthcare, Milano, Italia) o cromogenico, Blue POD Substrate (Roche, Monza, Italia)

Analisi della glicosilazione di hFpn

Per l'analisi dello stato di glicosilazione, le proteine in esame, dopo purificazione, vengono trattate con gli enzimi deglicosilanti endo-H o PNGasi F (New England BioLabs, Milano, Italia) a 37°C per 60 min in condizioni non denaturanti e i campioni analizzati attraverso western blot per verificare l'avvenuta reazione.

Curve di crescita

Per valutare i possibili effetti dell'espressione della ferroportina in lievito è stata seguita la crescita dei vari trasformanti nel tempo. A partire da una coltura o.n. di ogni ceppo vengono fatti degli inoculi in 10 ml di YPD addizionato del chelante del ferro bato-fenantrolina-disulfonato (BPS) (80 µM) o di Fe²⁺ (100 µM). La crescita cellulare viene monitorata attraverso la misurazione dell'assorbanza a 600 nm a intervalli di due ore, dal giorno successivo all'inoculo. Sono state riportate in grafico le assorbanze misurate in funzione del tempo.

Analisi del metabolismo del ferro in lievito (gel con o-dianisidina)

Per valutare lo stato metabolico cellulare di *Pichia pastoris* a seguito dell'espressione di ferroportina (wt o forme mutate) sono stati analizzati specificamente i livelli intracellulari di ferro, utilizzando Fet3 come reporter. L'espressione di questa ferrossidasi è influenzata dal ferro (del quale regola l'assorbimento), essendo indotta in carenza del metallo e repressa se nella cellula ne è presente in eccesso. La presenza della proteina è direttamente relazionabile alla sua attività ossidasica, visualizzabile su gel di poliacrilammide tramite reazione cromatica di ossidazione della o-dianisidina.

Per questa determinazione, dopo corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide dei campioni in esame, il gel viene posto in una soluzione di Glicerolo 10%/Triton X-100 0,05% per 20 min, per consentire l'abbassamento del pH, quindi immerso in una soluzione contenente o-dianisidina (20 mg di o-dianisidina in 40 ml di sodio acetato 50 mM a pH 5) fino allo sviluppo della reazione di ossidazione.

Fissaggio per visualizzazione delle cellule di Pichia pastoris in fluorescenza

Per l'analisi delle cellule di *Pichia pastoris* in fluorescenza, vengono prelevati 300 µl da una coltura in fase logaritmica precoce ($OD_{600nm} \sim 0,5$); a questi si aggiunge un uguale volume di soluzione di fissaggio 2 X (KPO_4 100 mM a pH 6,5/ $MgCl_2$ 2 mM/formaldeide 8%/gluteraldeide 0,5%) e si incuba per un'ora in ghiaccio. Al termine dell'incubazione si centrifugano le cellule per 2 min a 4000 rcf e si risospende il pellet in circa 50 µl di PBS. Si aggiunge 1 µl di Hoechst 33342 (10 mg/ml in PBS), pre-diluito 1:100 in PBS, e si incuba per 30 min a 30°C al riparo dalla luce.

Le cellule dopo il fissaggio in formaldeide e colorazione del nucleo sono state osservate al microscopio ad epifluorescenza Zeiss Axioskop 2 plus con un obiettivo 100 X a immersione.

Purificazione proteica su larga scala: lisi cellulare e cromatografia di affinità

Per la purificazione proteica si è passati all'espressione di ferroportina su larga scala. Il ceppo GS115/hFpn-FLAG (wt e mutanti) è stato fatto crescere in quantitativi di almeno 500 ml di YPD a 30°C overnight fino al raggiungimento di una OD_{600nm} compresa tra 4 e 8.

Tutti i passaggi a seguire, eccetto quando specificato diversamente, vengono condotti in ghiaccio o a 4°C nel caso delle centrifugate.

Raggiunta tale densità ottica, le cellule vengono centrifugate a 3500 rcf per 5 min, lavate in acqua e centrifugate seguendo le stesse condizioni. Il pellet ottenuto dopo questa centrifugata, può essere conservato a -80°C o processato subito come indicato di seguito.

Il pellet cellulare (che da una coltura o.n. di 500 ml risulta di circa 5 ml) viene risposeso in rapporto 1:1 in tampone di lisi (5 ml di MOPS 25 mM/NaCl 150 mM a pH 7,4/pepstatina 10 µM/leupeptina 30 µM) addizionato di PMSF 1 mM. A questa sospensione viene aggiunto un isovolume (circa 10 ml) di glass beads e vengono eseguiti 5 cicli di vorticate da un minuto alternati ad incubazione in ghiaccio di un minuto e mezzo. Al termine si centrifuga a 3500 rcf per 5 min e il supernatante viene raccolto in un nuovo tubo. Se necessario, viene aggiunto altro tampone di lisi alle glass beads e vengono ripetuti altri due cicli di vorticate. Il surnatante che si recupera viene aggiunto al precedente.

Il surnatante raccolto viene sottoposto a una prima centrifugata (3500 rcf per 5 min) per allontanare le cellule non lisate e poi ad una seconda a 40000 rpm in ultracentrifuga (Beckman Coulter Optima L-XP series, rotore Beckman 45Ti) per 40 min. Il pellet di membrane cellulari ottenuto viene risospeso in circa 30 ml di MOPS 25 mM/NaCl 300

mM/PMSF 1 mM e centrifugato a 40000 rpm per 40 min. Dopo questo lavaggio il pellet viene risospeso in 5 ml di tampone di lisi addizionato di detergente (triton X-100 oppure DDM) all'1% e la sospensione viene incubata a temperatura ambiente per 60 min (alternativamente si può incubare in agitazione a 4°C). Si centrifuga a 40000 rpm per 40 min e il supernatante contenente le proteine di membrana solubilizzate viene raccolto.

Per la purificazione, le proteine di membrana così ottenute e solubilizzate in detergente vengono trattate nel modo seguente: passate due volte su 500 µl di resina coniugata con anticorpo anti-FLAG monoclonale M2 (Sigma aldrich, Milano, Italia) pre-equilibrata con 15 volumi di MOPS 25 mM/NaCl 150 mM a pH 7,4. Dopo il passaggio dell'estratto proteico, la resina viene lavata con 10 volumi di MOPS 25 mM/NaCl 150 mM/DDM 0,03% a pH 7,4. Infine, la proteina viene eluita con 6 ml di glicina 0,1 M a pH 3,5/DDM 0,1% e raccolta in sei frazioni da 1 ml.

Dicroismo circolare

Sulle proteine purificate, attraverso cromatografia di affinità, sono state effettuate analisi di dicroismo circolare. Le misurazioni degli spettri vengono fatte a lunghezze d'onda comprese tra 180 e 350 nm. Appare evidente l'importanza della scelta del solvente in cui preparare la proteina, poiché questo potrebbe assorbire nelle regioni spettrali d'interesse. Il campione di Fpn raccolto dopo cromatografia anti-FLAG viene quindi dializzato per scambiare il tampone. La glicina a basso pH in cui viene eluita la proteina infatti non è ideale per l'analisi di dicroismo circolare e viene sostituita con tampone potassio fosfato 10 mM a pH 6,5 contenente solfato di sodio 50 mM. Anche la concentrazione del DDM viene abbassata, fino ad un valore di 0,025%. Le proteine preparate in questo tampone vengono infine portate a concentrazioni oscillanti tra 0,02 e 0,1 mg/ml prima di effettuare le letture al dicrografo.

Per la ferroportina wild type sono stati anche registrati gli spettri in funzione del pH. Partendo da uno stock di proteina a pH 5,2 il pH è stato aumentato gradualmente con aggiunta di NaOH e gli spettri registrati ai vari incrementi.

Saggio di saturazione del legame ferroportina/epcidina

I saggi di legame, effettuati in collaborazione con la Vifor Pharma Ltd (Schlieren, Svizzera), hanno previsto l'utilizzo di epcidina-25 umana, marcata in posizione 21 con 6-carbossitetrametil-rodamina (M21K-TMR-epcidina-25, Dürrenberger et al., 2013). I

dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza (mP) della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della stessa con ferroportina (wt o mutanti) a differenti concentrazioni. Per la ferroportina wild type è stata misurata anche la saturazione del legame con la forma tronca di epcidina di 20 amminoacidi (epcidina-20, marcata con lo stesso fluoroforo). Questa variante risulta priva di attività biologica.

Riportando in grafico la concentrazione della ferroportina in funzione del segnale di polarizzazione di fluorescenza è stato possibile stimare la costante di dissociazione, K_d , che rappresenta la concentrazione di Fpn a cui si osserva il 50% del legame massimo. Riportando i grafici in scala semilogaritmica è stata invece ottenuta la EC_{50} (concentrazione efficace 50, cioè la concentrazione di Fpn che da il 50% dell'effetto massimo). Entrambi i valori forniscono una indicazione dell'affinità di legame tra le due molecole.

Saggio di competizione dose-risposta del legame ferroportina/epcidina

Anche questi dosaggi sono stati condotti in collaborazione con la Vifor Pharma e hanno previsto la misurazione del segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della ferroportina (wt o mutanti) con epcidina-25 non marcata a differenti concentrazioni. La concentrazione di ferroportina utilizzata per queste valutazioni, è stata pari alla EC_{60} calcolata sulla base delle curve di saturazione di legame.

È stata poi valutata anche la competizione dose-risposta con epcidina-20 sulla ferroportina wild type nel legame all'epcidina-25 marcata.

Riportando in grafico la concentrazione dell'epcidina-25 non marcata in funzione del segnale di polarizzazione di fluorescenza è stato possibile stimare l' IC_{50} (concentrazione inibente 50, che rappresenta la concentrazione di competitore che riduce del 50% il legame tra le due proteine in esame). Attraverso questo parametro risulta possibile una valutazione della specificità del legame tra Fpn ed epcidina.

3.3 Espressione di ferroportina in *Saccharomyces cerevisiae*

Cepi

Il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzato per l'espressione della ferroportina è stato BJ5460. Il genotipo del ceppo è: MAT a, ura3-52, trp1, lys2-801, leu2-delta1, his3-delta 200, pep4: HIS3, prb1-delta1,6R con il promotore 1GAL.

Costrutti e vettori utilizzati

Il clonaggio nel ceppo BJ5460 ha previsto l'utilizzo del plasmide 2 μ pDDEGFP-2 (**Figura 11**) che consente la produzione di una proteina di fusione alla GFP e che conferisce un tag molecolare di otto istidine. Il vettore possiede inoltre il promotore inducibile *GAL1* e consente la selezione attraverso la complementazione dell'auxotrofia per l'uracile (Newstead et al., 2007). I cDNA di ferroportina umana, di ratto e di topo, sono stati amplificati da plasmidi già disponibili presso i nostri laboratori con primer disegnati per l'aggiunta su ambo le estremità del gene di una sequenza complementare di 35 bp (paia di basi) al sito di restrizione per *SmaI* situato nel plasmide usato per il clonaggio.

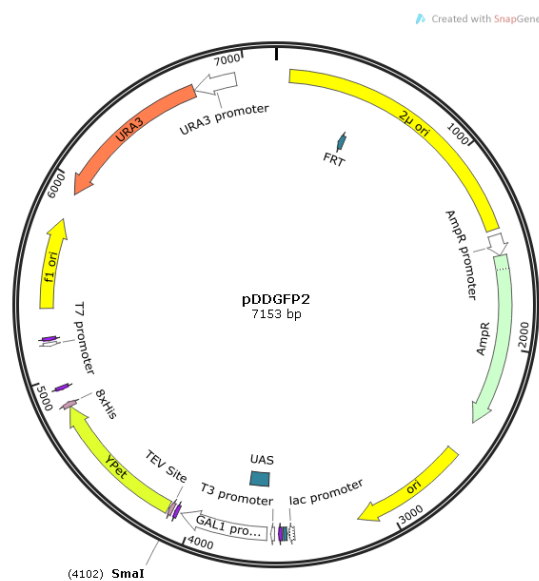


Figura 11. Mappa del vettore pDDEGFP2 utilizzato per le trasformazioni di *Saccharomyces cerevisiae*, ceppo BJ5460. È indicato il sito di restrizione riconosciuto da *SmaI* utilizzato per la linearizzazione del plasmide prima della trasformazione.

Preparazione delle cellule competenti

Con l'ausilio di un'ansa sterile viene inoculata una colonia del ceppo di lievito in 5 ml di YPD e le cellule vengono incubate a 30°C o.n. in agitazione. La coltura o.n. viene diluita in 50 ml di YPD a una OD_{600nm} di 0,1 e le cellule fatte crescere a 30°C a 280 rpm fino a una OD_{600nm} di 0,5–0,6. Raggiunta tale densità, si centrifuga la coltura a 3000 rcf per 5 min a 4°C, il supernatante viene allontanato e il pellet cellulare risospeso in 25 ml di acqua distillata sterile. Le cellule vengono centrifugate nuovamente a 3000 rcf per 5 min a 4°C e il pellet cellulare risospeso in 1 ml di litio acetato 100 mM. La sospensione cellulare viene trasferita in

un tubo da 1,5 ml e sottoposta a centrifugazione a 8000 rcf per 15 sec. Infine, il pellet ottenuto viene risospeso in 400 µl di LiAc 100 mM.

Trasformazione BJ5460

La trasformazione con gli omologhi di ferroportina nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, ceppo BJ5460, è stata condotta per ricombinazione omologa: in un tubo da 1,5 ml vengono disposti 240 µl di PEG3350 al 50% (w/v) per ogni trasformazione e questo viene messo in ghiaccio. Vengono aggiunti in sequenza:

- 50 µl di cellule competenti,
- 25 µl di ssDNA carrier (2 mg/ml),
- 50 µl di mix di DNA (3 µl di vettore linearizzato con *Sma*I 25 ng/µl, 5 µl di prodotto di PCR 150 ng/µl e 42 µl di acqua distillata sterile).

Ad ogni aggiunta segue una vorticata di 5 sec. Le cellule vengono poi incubate per 30 min a 30°C e sottoposte a shock termico per 25 min a 42°C. Al termine di questa incubazione, si centrifuga a 8000 rcf per 15 sec a R.T., si allontana il supernatante e il pellet cellulare viene risospeso in 100 µl di acqua distillata sterile. Infine, le cellule vengono piastrate su substrato privo di uracile e incubate a 30°C per 2-4 giorni fino alla comparsa delle colonie.

Dopo la trasformazione, l'espressione delle proteine di membrana dei tre omologhi è stata verificata attraverso la misurazione diretta della fluorescenza cellulare di brodo-culture preparate a partire da colonie di trasformanti e attraverso gel in fluorescenza su membrane cellulari (Drew et al., 2008). In aggiunta, la qualità delle tre proteine è stata determinata utilizzando cromatografia di esclusione molecolare in fluorescenza (FSEC) su sistema Akta FPLC (GE Healthcare, Milano, Italia), dopo solubilizzazione delle proteine di membrana in DDM. La colonna utilizzata allo scopo è stata la Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare, Milano, Italia).

La proteina che ha dato i livelli di espressione più alti e risultata di miglior qualità è stata la variante di ratto. Sono stati registrati bassi o non significativi livelli di fluorescenza per quella umana. Di conseguenza, l'espressione su larga scala è stata condotta su questo omologo.

Espressione su larga scala di rFpn

A partire da un pre-inoculo o.n. di *Saccharomyces cerevisiae* trasformato con rFpn vengono fatti degli inoculi in 10 beute contenenti 1 litro di brodo di coltura privo di uracile

ciascuna, facendo ripartire la crescita da una O.D._{600nm} di 0,12. Raggiunta una densità ottica a 600 nm di ~0,6 viene aggiunto galattosio al 2% e le cellule incubate per 22 h per consentire l'espressione della proteina. Al termine, le cellule vengono centrifugate a 6000 rcf per 20 min a 4°C e il pellet cellulare risospeso in 25 ml di PBS per ogni litro di coltura originale. La sospensione cellulare viene congelata in azoto liquido e conservata a -80°C o processata subito come indicato di seguito. Dopo questo passaggio tutte le operazioni vengono condotte in ghiaccio.

La sospensione cellulare (da 10 litri di coltura) (eventualmente da scongelare) viene portata a 500 ml finali in PBS. Le cellule vengono lisate utilizzando un distruttore di cellule in 4 passaggi a 40 kpsi a 4–15°C. Le cellule non lisate e i detriti cellulari vengono rimossi tramite centrifugazione a 10000 rcf a 4°C per 30 min. Il surnatante ottenuto viene centrifugato a 41000 rpm in una ultracentrifuga (Beckman Coulter Optima L-XP series con un rotore Beckman 45Ti) a 4°C per 90 min al fine di pellettare le membrane che vengono risospese dopo la centrifugata in un volume finale di 6 ml di PBS per ogni litro di coltura originale. La sospensione così ottenuta viene congelata in azoto liquido e conservata a -80°C fino alla solubilizzazione.

Solubilizzazione di rFpn dalle membrane

La sospensione membranosa derivante da 10 litri di coltura, viene scongelata per la solubilizzazione e portata a 180 ml con PBS/NaCl 150 mM. A questi viene aggiunto DDM ad una concentrazione finale dell'1% (w/v) e la soluzione viene incubata in agitazione a 4°C per 1 h. In seguito, la sospensione membranosa viene pellettata a 41000 rpm, per 60 min a 4°C e il supernatante contenente la proteina solubilizzata viene recuperato per la purificazione.

Purificazione attraverso cromatografia di affinità di rFpn

La Fpn solubilizzata in detergente viene purificata attraverso un doppio passaggio di cromatografia di affinità al nichel (Immobilized Metal-Affinity Chromatography, IMAC e IMAC inversa).

Per la prima purificazione, la resina Ni-NTA (GE Healthcare, Milano, Italia) viene pre-equilibrata con tampone di solubilizzazione (PBS/NaCl 150 mM/imidazolo 20 mM) contenente DDM allo 0,03% (w/v). Le membrane solubilizzate, derivate da 10 litri di coltura originale, vengono incubate con 10 ml di resina per 2 h a 4°C su agitatore magnetico.

A seguito di questa incubazione, la resina viene fatta defluire in colonna di vetro di opportune dimensioni (Econo-Column; BioRad, Milano, Italia) e sottoposta a lavaggio con tampone di equilibratura contenente imidazolo 30 mM per eliminare leganti non specifici. La Fpn viene eluita con 10 volumi di colonna di tampone contenente imidazolo a una concentrazione di 250 mM.

Per la rimozione del tag GFP-8His dalla proteina di fusione, dopo il primo passaggio di purificazione, la rFpn viene incubata in rapporto 1:1 con la proteasi TEV (Tobacco Etch Virus). La soluzione viene trasferita in tubi da dialisi e dializzata o.n. a 4°C in 3 litri di Tris HCl 20 mM/NaCl 150 mM/DDM 0,03%.

Dopo la rimozione del tag (GFP-8His), il campione dializzato viene filtrato su membrane con pori di diametro di 0,45 µm e la soluzione contenente la Fpn portata a una concentrazione 10 mM di imidazolo e ulteriormente purificata utilizzando una colonna di affinità da 5 ml, His trap affinity column (Sigma aldrich, Milano, Italia) equilibrata in tampone di eluizione contenente imidazolo 10 mM, tramite ausilio di una pompa peristaltica.

Il campione non ritenuto, contenente la proteina viene raccolto e concentrato a 0,5 ml con il concentratore 50 K MWCO (Millipore, Milano, Italia).

Cromatografia di esclusione molecolare (SEC) su rFpn

I 500 µl di proteina, ricavati dopo cromatografia di affinità, vengono iniettati sul sistema Akta FPLC su colonna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, Milano, Italia) pre-equilibrata nello stesso tampone usato per la dialisi a un flusso di 0,4 ml/min e vengono raccolte frazioni di mezzo millilitro. Dopo l'analisi della traccia UV le frazioni in cui risulta visibile il picco monodisperso della Fpn vengono riunite e concentrate a circa 5-10 mg/ml con un concentratore 50 K MWCO.

Tutti i campioni raccolti: l'eluato della prima purificazione su resina al nichel (Fpn-GFP), il non ritenuto del secondo passaggio della cromatografia di affinità (prima della SEC) e le frazioni riunite in cui risulta visibile il picco proteico (dopo la SEC), vengono analizzati tramite SDS-PAGE.

Dicroismo circolare

Il campione di rFpn purificato tramite i diversi passaggi cromatografici è stato utilizzato per una analisi di dicroismo circolare. L'analisi è stata condotta in fosfato di potassio 10 mM

a pH 6,5/Na₂SO₄ 50 mM/DDM 0,03%. 1 µl di rFpn concentrata a 8,53 mg/ml è stato diluito in 150 µl di tampone e lo spettro registrato.

In aggiunta, è stata valutata la stabilità termica della proteina, monitorando il segnale di dicroismo circolare a 209 e a 220 nm a differenti temperature, comprese tra 20°C e 85°C registrando il segnale a ogni incremento di 2°C.

Prove cristallografiche

Per le prove di cristallografia sono state allestite, tramite l'ausilio del robot Mosquito Crystal (TTP Labtech Ltd, Melbourn, Inghilterra) piastre da microtitolazione MemGold e MemGold2 (Molecular Dimensions Ltd, Newmarket, Inghilterra) con differenti concentrazioni delle varianti di ferroportina umana e di ratto purificate su larga scala rispettivamente da *Pichia pastoris* e da *Saccharomyces cerevisiae*. Le piastre sono state preparate in duplicato per l'incubazione alle temperature di 4°C e 20°C.

In aggiunta, la rFpn è stata ricostituita in fase lipidica cubica in rapporto 40:60 con la monoleina e attraverso il sistema Gryphon LCP (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, California) utilizzata per l'allestimento di due piastre da microtitolazione, una di tipo LCPI screen (Molecular Dimensions Ltd, Newmarket, Inghilterra) e l'altra MemGold2 che sono state incubate a 20°C.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Espressione e purificazione di ferroportina umana in *Pichia pastoris*

Espressione di ferroportina in Pichia pastoris

L'organismo scelto inizialmente per l'espressione della ferroportina umana è stato il lievito metilotrofico *Pichia pastoris* (ceppo GS115). La scelta è ricaduta su questo lievito perché presenta un sistema di esporto e maturazione delle proteine neosintetizzate molto simile a quello degli eucarioti superiori.

Il cDNA codificante per ferroportina umana è stato ricavato dal vettore pCMV, utilizzato per la trasfezione delle HEK293T (vedi in seguito), e spostato, tramite digestione *EcoRI/KpnI*, nel plasmide pIB2. Si tratta di un vettore integrativo che consente l'espressione costitutiva del gene in esame sotto il controllo del promotore GAP.

Dopo trasformazione, il livello di espressione della Fpn è stato valutato tramite western blot su una serie di cloni risultati positivi alla PCR sul DNA genomico. È subito risultato evidente come la proteina venisse espressa bene in lievito; dopo elettroforesi su gel di poliacrilammide di membrane solubilizzate in SDS e trasferimento su filtro di nitrocellulosa, sono infatti individuabili due bande immunoreattive che migrano con pesi molecolari di circa 62 kDa, peso molecolare predetto per la proteina nativa, e 70 kDa, una possibile forma di iperglicosilazione della stessa (**Figura 12**). Infatti se si analizza la sequenza amminoacidica di ferroportina, vengono individuati 3 potenziali siti di N-glicosilazione (le asparagine che possono subire questa modifica post-traduzionale sono quelle in posizione 174, 434 e 567). In precedenti studi su cellule di mammifero (Canonne-Hergaux et al., 2006) è stato inoltre già dimostrato che la proteina si trova in forma N-glicosilata.

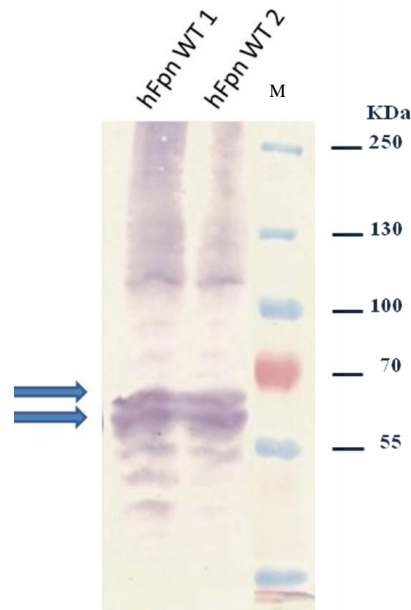


Figura 12. Western blot su estratti di membrane di due cloni rappresentativi del ceppo GS115/hFpn-FLAG wt in cui si evidenzia la doppia banda di migrazione della ferroportina espressa in lievito. M: Marker di peso molecolare.

Purificazione della ferroportina

Dopo aver verificato la corretta espressione della ferroportina umana in *Pichia pastoris*, si è passati alla sua purificazione su larga scala. Per facilitare questa procedura, la Fpn è stata espressa come prodotto di fusione con il peptide FLAG al suo C-terminale. È stato quindi possibile condurre la purificazione proteica mediante cromatografia di affinità utilizzando un anticorpo monoclonale anti-FLAG immobilizzato su matrice di agarosio.

Prima di procedere con la cromatografia, è stata analizzata l'efficienza di solubilizzazione della ferroportina in differenti detergenti per scegliere il più idoneo all'estrazione della proteina dalle membrane. Difatti, tentativi diretti di legame alla resina di sospensioni di membrane non hanno prodotto risultati positivi; ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che in ambiente membranoso l'epitopo FLAG possa essere mascherato e quindi non disponibile per il legame all'anticorpo. Le membrane del ceppo GS115/hFpn-FLAG wt, risospese in tampone di lisi, sono state quindi incubate in presenza di detergenti con differenti caratteristiche chimico-fisiche (Triton X-100, Chaps, NP-40, octilglucoside e *n*-dodecil β -D-maltoside), scelti tra quelli più utilizzati in letteratura. Dopo estrazione, sono state registrate solo lievi variazioni nella efficienza di solubilizzazione della Fpn dei differenti detergenti;

particolarmente efficace si è mostrato il Triton X-100, mentre il DDM (*n*-dodecil β -D-maltoside) ha mostrato la più bassa quantità di Fpn estratta a parità di tempo di solubilizzazione. Questo è dovuto principalmente alla forza di estrazione del detergente stesso. Il DDM, rispetto al Triton X-100, è infatti un detergente molto blando, che necessita di un maggior tempo d'azione ma che potrebbe, per questo motivo, essere più efficiente nel mantenere la proteina nella conformazione nativa. A seguito di questi risultati preliminari la purificazione della Fpn è stata condotta con questi due detergenti che hanno mostrato il maggiore e il minore grado di capacità di estrazione rispetto alla ferroportina. Gli estratti di membrana sono stati caricati su colonna con anti-FLAG e la proteina è stata eluita a basso pH con glicina 0,1 M a pH 3,5. L'utilizzo del basso pH sembra essere ininfluenza sulla stabilità della proteina così come i due diversi detergenti. In entrambi i casi, infatti, la proteina viene purificata con quasi totale assenza di contaminanti (**Figura 13**) e con una resa di circa 0,6 mg di proteina per litro di coltura che risulta sorprendentemente alta se si considera la complessità topologica della ferroportina nella membrana.

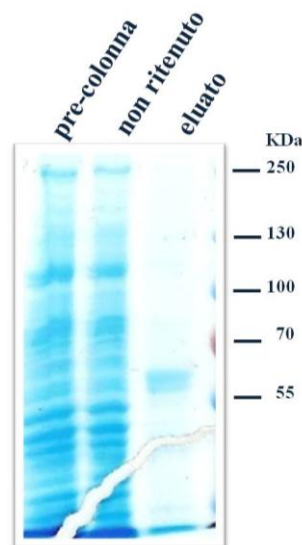


Figura 13. Gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 7,5% su campioni ottenuti durante alcuni passaggi della cromatografia su resina anti-FLAG condotta sugli estratti di membrana in DDM del ceppo GS115/hFpn-FLAG wt. I campioni caricati sul gel sono i seguenti: pre-colonna: estratti di membrana in DDM prima della purificazione; non ritenuto: campione non ritenuto dopo passaggio su resina anti-FLAG; eluato: frazioni raccolte e concentrate dopo eluizione in glicina. Il gel è stato sottoposto a colorazione con Blue di Coomassie. Sul bordo destro del gel sono visibili le bande del marker di peso molecolare.

La proteina espressa in *Pichia pastoris*, dopo purificazione su resina anti-FLAG, è stata sottoposta a un ulteriore passaggio cromatografico di esclusione molecolare (su colonna Superdex S200, GE Healthcare) con sistema HPLC. Il cromatogramma UV registrato ha

mostrato la presenza di due picchi (**Figura 14**), uno eluito a 7,5 ml relativo a forme di aggregazione proteica e l'altro, quello principale, intorno a 12,5 ml corrispondente alla proteina in forma monomerica. L'eluizione a 13 ml è in accordo con i dati di Rice e collaboratori (2009) che purificano la Fpn da cellule di insetto con uno stesso sistema cromatografico e registrano un picco monomerico per la proteina a 13,5 ml. Le frazioni in cui eluisce la Fpn in forma monomerica, dopo verifica su gel di poliacrilammide, sono state riunite e concentrate a 3,7 mg/ml e a 10 mg/ml per le prove di cristallografia.

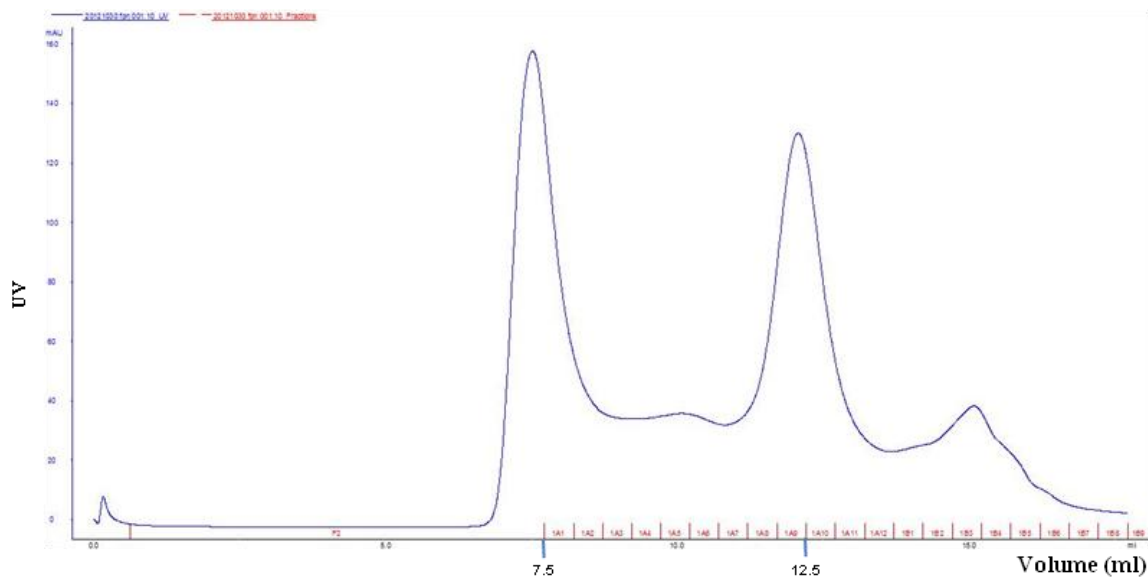


Figura 14. Spettro registrato dall'analisi di cromatografia di esclusione molecolare, condotta con sistema Akta FPLC (colonna Superdex 200 10/300, GE Healthcare), su hFpn wt. Sull'asse delle ordinate è indicato l'assorbimento a 280 nm registrato durante la cromatografia. Sulle ascisse sono indicati i ml e il numero delle frazioni raccolte. Tampone di corsa: Tris HCl 20 mM/NaCl 150 mM/DDM 0,03%.

4.2 Analisi predittive mediante approccio bioinformatico

L'analisi strutturale della ferroportina eseguita attraverso gli strumenti della bioinformatica ha consentito l'inquadramento di questa proteina nella superfamiglia dei trasportatori secondari MFS (Major Facilitator Superfamily) confermando quanto già recentemente ipotizzato da altri gruppi (Wallace et al., 2010; Le Gac et al., 2013).

I trasportatori appartenenti a questa famiglia proteica attuano per il movimento del substrato un meccanismo di accesso alternato (**Figura 15**). Il principio su cui si basa, proposto per la prima volta nel 1966 (Jardetzky, 1966), è che il legame del substrato all'interno di una cavità che la proteina espone su uno dei due versanti cellulari, determina un cambiamento

conformazionale del trasportatore, che ne permette il rilascio dal lato opposto. Questo processo, avviene di norma attraverso almeno uno stato intermedio, in cui il sito di legame risulta occluso su entrambi i lati della membrana plasmatica e non c'è comunicazione diretta tra i due compartimenti (Weyand et al., 2010). I trasportatori della MFS condividono una struttura tridimensionale comune, che consiste di due grandi domini che circondano un poro in cui avviene la traslocazione del substrato. Sono caratterizzati da un numero di eliche transmembrana (TM) pari, nella maggior parte dei casi sono 12, connesse da loop idrofilici e presentano le estremità ammino- e carbossi-terminale localizzate nel citoplasma. I due domini, ciascuno contenente 6 eliche in sequenza, formano una struttura pseudo-simmetrica che ruota attorno ad un asse centrale perpendicolare alla membrana plasmatica. Questo movimento è quello responsabile dell'apertura/chiusura del trasportatore rispetto ai due versanti cellulari (Law et al., 2008).

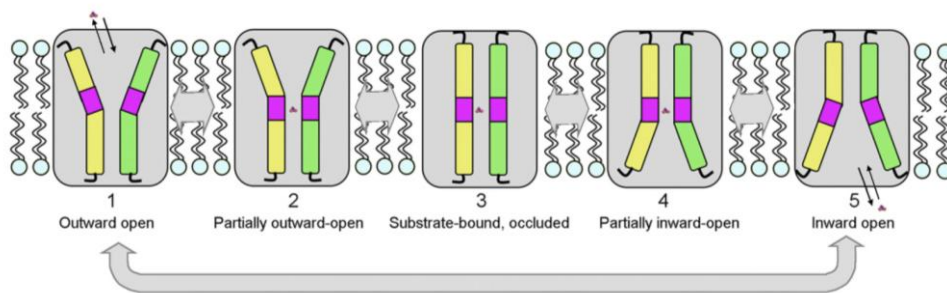


Figura 15. Modello proposto per i cambiamenti conformazionali cui vanno incontro i membri della superfamiglia MFS durante il trasporto del substrato. Immagine riadattata da Yan et al., 2013.

A partire da questa osservazione, sono stati elaborati una serie di modelli strutturali della ferroportina umana: il primo, ottenuto tramite confronto con le strutture cristallografiche disponibili dei primi due trasportatori, GlpT e LacY, identificati utilizzando il programma I-TASSER, nella conformazione inward-open, aperta verso l'interno della membrana plasmatica (**Figura 16**), ed il secondo nella conformazione outward-open, aperta verso l'esterno (**Figura 20**), grazie al confronto della sua sequenza con quella di FucP.

Modello molecolare della ferroportina umana nella conformazione inward-open

Attraverso l'approccio di modellamento bioinformatico, basato sui metodi di threading e *ab-initio*, sfruttato dal programma I-TASSER, abbiamo ottenuto un primo modello strutturale

per la ferroportina nella conformazione aperta verso l'interno della cellula. Il modello mostra una proteina organizzata in 12 α -eliche transmembrana in una caratteristica forma a campana e che rivolge le estremità N- e C-terminali verso il versante citoplasmatico della cellula (**Figura 16**). Segmenti aggiuntivi organizzati in strutture ad α -elica sono osservati anche nell'interfaccia tra la membrana e il lato intracellulare tra i domini TM6 e 7 e a livello della porzione C-terminale della proteina. Un lungo loop contenente due piccoli tratti ad elica è visibile anche tra i domini TM9 e 10. Questo loop risulta ripiegato sul core proteico nella regione transmembrana e potrebbe risultare un artefatto della procedura di rifinitura di I-TASSER, che impiega un campo di forze generato per proteine globulari solubili e che quindi tende a generare ripiegamenti che vanno a mascherare regioni idrofobiche.

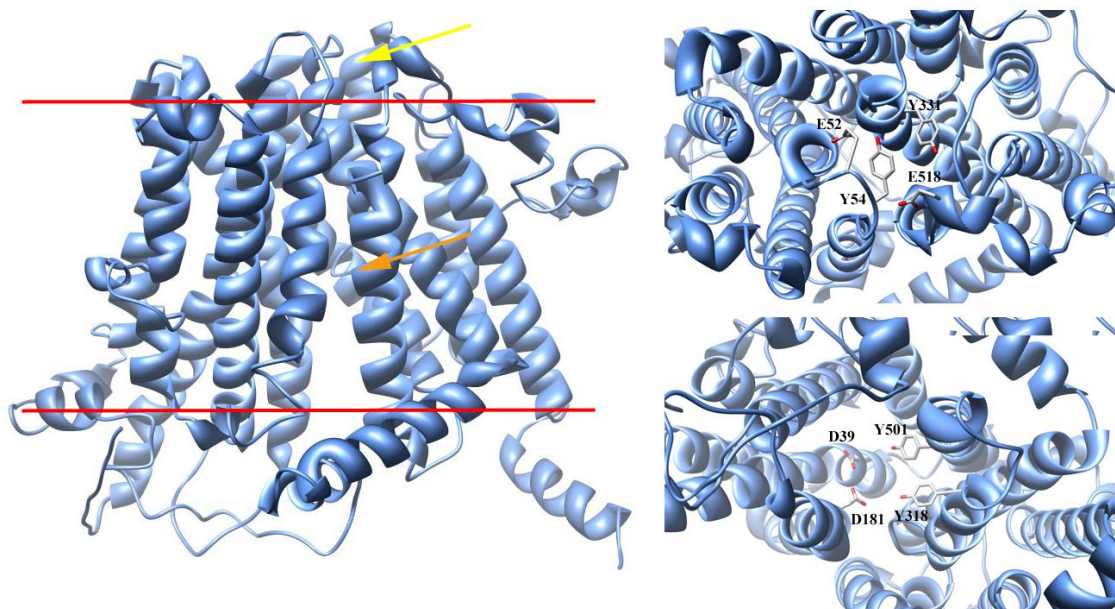


Figura 16. Rappresentazione schematica del modello strutturale ipotizzato per la Fpn nella conformazione aperta verso l'interno della cellula. Pannello di sinistra: vista attraverso il piano della membrana plasmatica. Le linee rosse indicano il doppio strato lipidico della membrana e le frecce, gialla e arancione, la localizzazione dei siti di legame putativi con il ferro, extracellulare e transmembrana, rispettivamente. Pannello di destra: vista attraverso un piano perpendicolare alla membrana che mostra i residui formanti il sito di legame extracellulare (in alto) e quello transmembrana (in basso).

Se si considerano le metalloproteine contenenti ferro, ad esclusione di quelle con gruppi prostetici ben definiti (gruppo eme e cluster Fe-S), il metallo si trova solitamente legato in siti contenenti un numero variabile di residui di Asp/Glu, His o Tyr. Esempi sono rappresentati dai siti di legame del ferro individuabili nella lattoferrina e nella transferrina. In queste proteine il sito canonico di legame col ferro coinvolge due tirosine, un aspartato, una istidina e

uno ione carbonato bidentato (CO_3^{2-}) (Baker et al., 2003). Altri esempi di enzimi contenenti Fe(II) non-eme, come ossidasi e ossigenasi, utilizzano una triade 2-His-1-carbossilato per l'attivazione dell'ossigeno e hanno le altre valenze del ferro occupate da molecole di acqua o da gruppi idrossilici (Kovaleva et al., 2008).

È stato quindi analizzato il modello di ferroportina generato nella conformazione inward-open alla ricerca di residui di Asp/Glu, His o Tyr organizzati in cluster. Si è potuto notare che la proteina mostra un ampio canale aperto sul lato intracellulare che si richiude circa a metà della membrana plasmatica attraverso i residui di aspartato 39 e 181 e di tirosina 318 e 501 (**Figura 16**), amminoacidi tra quelli che risultano potenzialmente in grado di legare il ferro. Spostandosi ancora verso il lato extracellulare, si osserva nel modello un altro raggruppamento interessante di amminoacidi: si tratta dei residui di glutammato 52 e 518 e delle due tirosine 54 e 331 (**Figura 16**). Partendo da queste osservazioni è stato ipotizzato che i due blocchi amminoacidici Asp/Glu e Tyr identificati in questa struttura rappresentino due siti di legame per il ferro, importanti nella traslocazione del metallo.

Un'altra caratteristica interessante riscontrabile in questo modello di ferroportina è la presenza di due ulteriori residui carichi negativamente, all'interno del canale proteico, situati tra i due gruppi di potenziali ligandi del ferro: si tratta dell'aspartato in posizione 325 e dell'arginina 466 (**Figura 17**). Nonostante questi residui non si trovino localizzati direttamente nei potenziali siti di legame del metallo, la loro posizione sembra indicativa di un ruolo nel trasporto del ferro, che potrebbe essere quello di stabilire interazioni elettrostatiche forti con lo ione metallico durante la traslocazione.

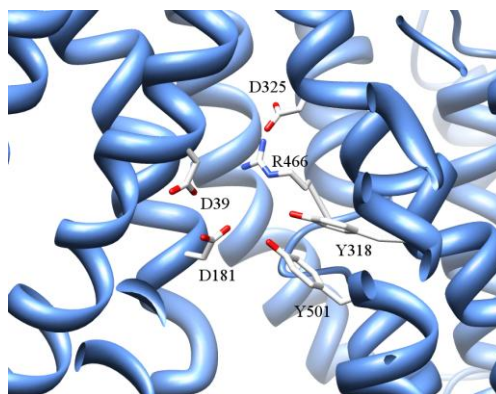


Figura 17. Vista schematica del sito putativo interno di legame col ferro di Fpn attraverso un asse parallelo al piano della membrana plasmatica. Il sito è formato dai residui Asp39, Asp181, Tyr318 e Tyr501. Si può notare la localizzazione verso il lato extracellulare dei residui Asp325 e Arg466 rispetto al sito di legame. Per chiarezza, parte della struttura è stata rimossa.

La mappatura dei residui di ferroportina tra specie evolutivamente correlate, condotta sulla base del nostro modello strutturale, rivela che tutti i residui sopra menzionati sono rigorosamente conservati nel lignaggio dei vertebrati (Figura 18 e Figura 19), a conferma del loro importante ruolo strutturale e/o funzionale.

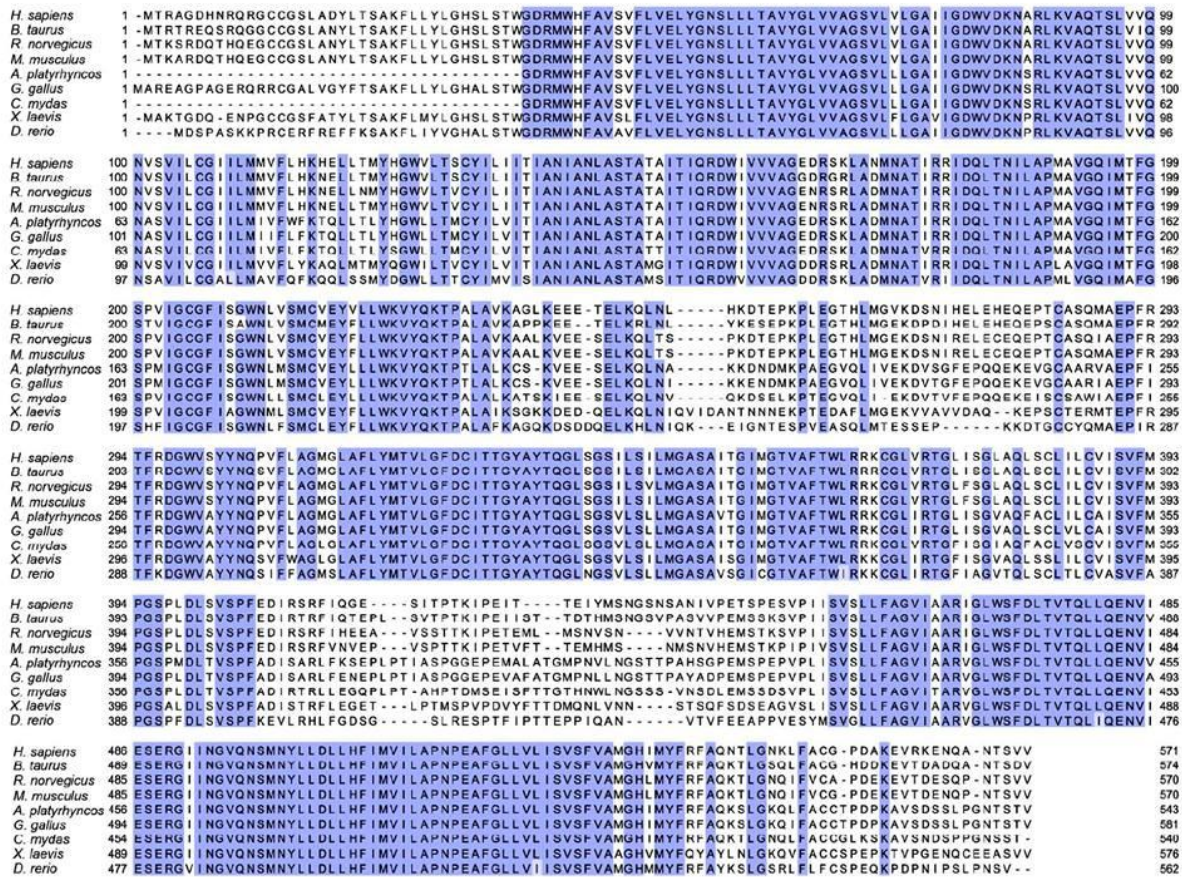


Figura 18. Allineamento delle sequenze amminoacidiche di ferroportina dei seguenti organismi: Homo sapiens (gi|7657100), Bos taurus (gi|118151032), Rattus norvegicus (gi|158635998), Mus musculus (gi|7109247), Anas platyrhynchos (gi|483522646), Gallus gallus (gi|61098366), Chelonia mydas (gi|465955074), Xenopus laevis (gi|50415353) e Danio rerio (gi|7109245). Tra parentesi è indicato il numero di accesso alla sequenza amminoacidica su NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

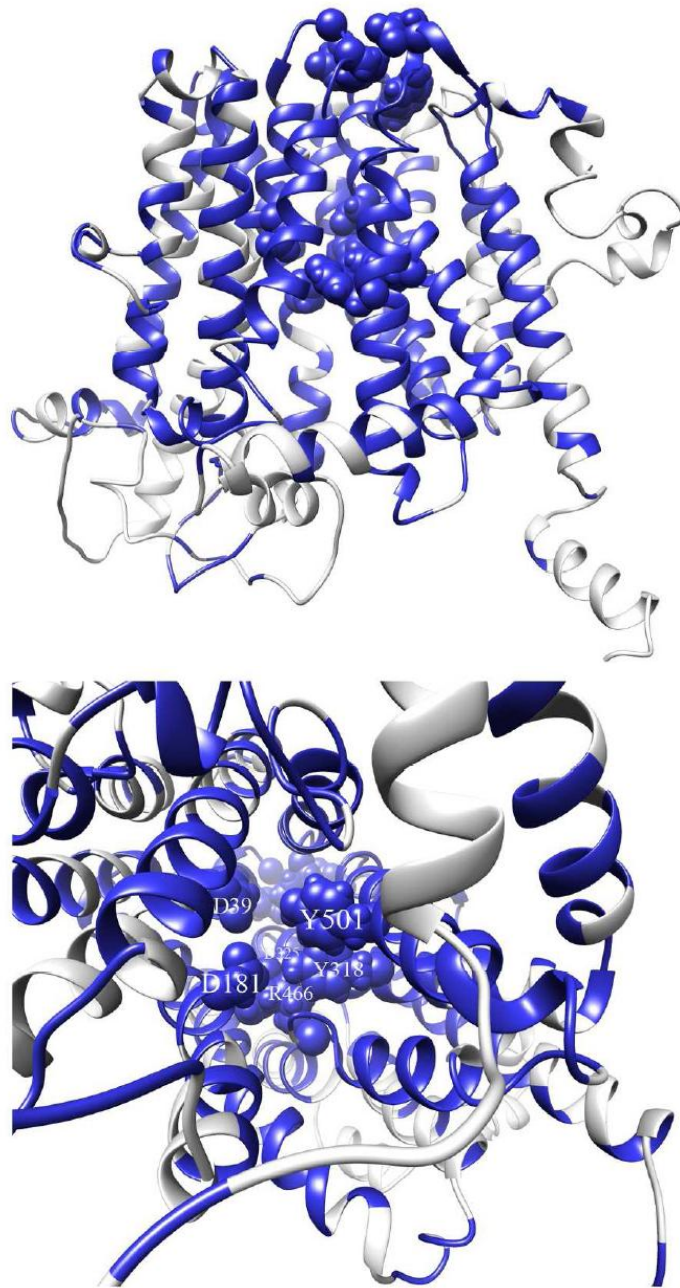


Figura 19. Mappatura dei residui amminoacidici conservati sul modello inward-open di Fpn ottenuta attraverso JalView (Waterhouse et al., 2009) e ridisegnati con Chimera (Pettersen et al., 2004). Sono evidenziati in blu i residui altamente conservati in tutte le sequenze di ferroportina analizzate. Pannello superiore: vista dello scheletro osseo di Fpn attraverso un asse parallelo al piano della membrana. Pannello inferiore: vista dello scheletro osseo della proteina dal lato intracellulare attraverso un piano perpendicolare al piano della membrana. I residui putativamente coinvolti nel trasporto del ferro (vedi testo) sono mostrati come sfere riempite.

Modello molecolare della ferroportina umana nella conformazione outward-open

Al fine di identificare in maniera più dettagliata il possibile meccanismo di trasporto del ferro mediato dalla ferroportina, è stato realizzato anche un modello strutturale della proteina nella conformazione aperta verso l'esterno della cellula. Questo è stato realizzato utilizzando come stampo il simportatore di protoni/L-fucosio di *E. coli*, unico membro della famiglia MFS di cui è al momento disponibile la struttura cristallografica in conformazione outward-open. Il modello ottenuto, illustrato in **Figura 20**, indica che avvengono significativi cambiamenti conformazionali nella struttura proteica durante la transizione dalla conformazione aperta verso l'interno a quella aperta verso l'esterno della cellula. In particolare, i residui che costituiscono entrambi i siti di legame putativi col ferro si allontanano di diversi Ångstrom l'uno dall'altro (**Figura 20**), facendo strada all'ipotesi che nessuno dei due possa essere occupato dal metallo quando la ferroportina si trova nella conformazione aperta verso l'esterno.

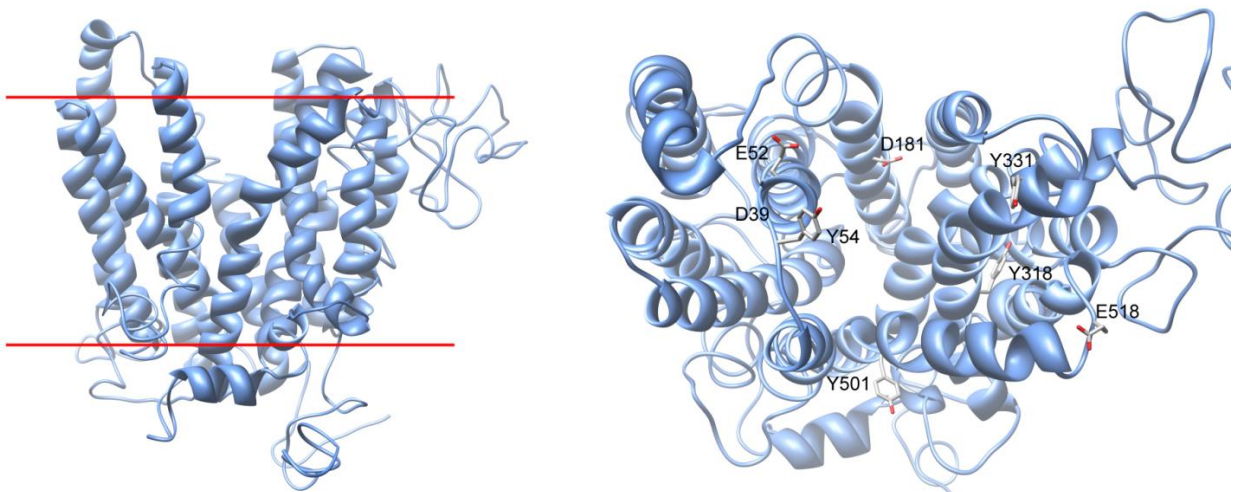


Figura 20. Rappresentazione schematica del modello strutturale di Fpn nella conformazione aperta verso l'esterno della cellula. Pannello di sinistra: vista attraverso il piano della membrana plasmatica. Le linee rosse indicano il doppio strato lipidico della membrana. Pannello di destra: vista attraverso un piano perpendicolare alla membrana. Sono indicati i residui formanti i siti di legame putativi con il ferro.

Per i membri della superfamiglia MFS risulta difficile valutare la coerenza tra l'allineamento delle strutture nelle conformazioni aperta verso l'interno e verso l'esterno della cellula della stessa proteina, poiché ad oggi, non sono ancora state ottenute le strutture cristallografiche in entrambi gli stati per alcun membro della MFS. Inoltre, la lunghezza delle regioni TM dei membri noti appartenenti alla famiglia è variabile. In ogni caso, sono state confrontate la lunghezza e la posizione delle regioni TM della ferroportina nelle due

conformazioni (**Figura 21**) e come si può vedere dalla figura, nonostante i modelli utilizzati per modellare le due conformazioni sono diversi, le regioni ripiegate ad α -elica sono pressoché sovrapponibili. Come prevedibile, si rilevano alcune lievi differenze; ma ciò non è sorprendente dal momento che piccole variazioni nella lunghezza e nella posizione dei segmenti TM sono comuni anche nel confronto di diversi stati conformazionali determinati sperimentalmente su una stessa proteina di membrana.

	1	11	21	31	41
Fpn inward	M T R A G D H N R Q	R G C C G S L A D Y	L T S A K F L L Y L	G H S L S T W G D R	M W H F A V S V F L
Fpn outward	M T R A G D H N R Q	R G C C G S L A D Y	L T S A K F L L Y L	G H S L S T W G D R	M W H F A V S V F L
	51	61	71	81	91
Fpn inward	V E L Y G N S	L L L T A V Y G L V V A G	S V L V L G A I I G	D W V D K N A	R L K V A Q T S L V V Q N
Fpn outward	V E L Y G N S	L L L T A V Y G L V V A G	S V L V L G A I I G	D W V D K N A	R L K V A Q T S L V V Q N
	101	111	121	131	141
Fpn inward	V S V I L C G I I L	M M V F L H K H	E L L T M Y H G W V L T	S C Y I L I I T T I A	N I A N L A S T A T
Fpn outward	V S V I L C G I I L	M M V F L H K H	E L L T M Y H G W V L T	S C Y I L I I T T I A	N I A N L A S T A T
	151	161	171	181	191
Fpn inward	A I T I Q R D W I V	V V A G E D R S K L	A N M N A T I R R I	D Q L T N I L A P M	A V G Q I M T F G S
Fpn outward	A I T I Q R D W I V	V V A G E D R S K L	A N M N A T I R R I	D Q L T N I L A P M	A V G Q I M T F G S
	201	211	221	231	241
Fpn inward	P V I G C G F I S G	W N L V S M C V E Y	V L L W K V Y Q K T	P A L A V K A G L K	E E E T E L K Q L N
Fpn outward	P V I G C G F I S G	W N L V S M C V E Y	V L L W K V Y Q K T	P A L A V K A G L K	E E E T E L K Q L N
	251	261	271	281	291
Fpn inward	L H K D T E P K P L	E G T H L M G V K D	S N I H E L E H E Q	E P T C A S Q M A E	P F R T F R D G W V
Fpn outward	L H K D T E P K P L	E G T H L M G V K D	S N I H E L E H E Q	E P T C A S Q M A E	P F R T F R D G W V
	301	311	321	331	341
Fpn inward	S Y Y N Q P V F L A	G M G L A F L Y M T	V L G F D C I T T G	Y A Y T Q G L S G S	I L S I L M G A S A
Fpn outward	S Y Y N Q P V F L A	G M G L A F L Y M T	V L G F D C I T T G	Y A Y T Q G L S G S	I L S I L M G A S A
	351	361	371	381	391
Fpn inward	I T G I M G T V A F	T W L R R K C G L V	R T G L I S G L A Q	L S C L I L C V I S	V F M P G S P L D L
Fpn outward	I T G I M G T V A F	T W L R R K C G L V	R T G L I S G L A Q	L S C L I L C V I S	V F M P G S P L D L
	401	411	421	431	441
Fpn inward	S V S P F E D I R S	R F I Q G E S I T P	T K I P E I T T E I	Y M S N G S N S A N	I V P E T S P E S V
Fpn outward	S V S P F E D I R S	R F I Q G E S I T P	T K I P E I T T E I	Y M S N G S N S A N	I V P E T S P E S V
	451	461	471	481	491
Fpn inward	P I I S V S L L F A	G V I A A R I G L W	S F D L T V T Q L L	Q E N V I E S E R G	I I N G V Q N S M N
Fpn outward	P I I S V S L L F A	G V I A A R I G L W	S F D L T V T Q L L	Q E N V I E S E R G	I I N G V Q N S M N
	501	511	521	531	541
Fpn inward	Y L L D L L H F I M	V I L A P N P E A F	G L L V L I S V S F	V A M G H I M Y F R	F A Q N T L G N K L
Fpn outward	Y L L D L L H F I M	V I L A P N P E A F	G L L V L I S V S F	V A M G H I M Y F R	F A Q N T L G N K L
	551	561	571		
Fpn inward	F A C G P D A K E V	R K E N Q A N T S V	V		
Fpn outward	F A C G P D A K E V	R K E N Q A N T S V	V		

Figura 21. Confronto della lunghezza e della posizione delle regioni transmembrana nei due stati conformazionali (inward e outward-open) proposti per ferroportina

Verifica della qualità dei modelli

L'analisi, basata sull'utilizzo del programma PROCHECK (Laskowski et al., 1993), per la verifica della qualità delle strutture di Fpn generate nelle due possibili conformazioni ha rivelato che per entrambi i modelli il 97,8% dei residui si trova in posizione consentita e plausibile secondo il Ramachandran plot. I due modelli di Fpn sono stati anche validati attraverso la misurazione della RMSD (Root-Mean-Square-Deviation) rispetto alle strutture di

GlpT e FucP. Il confronto fra la struttura della Fpn in conformazione inward-open e la struttura cristallografica di GlpT ha dato un valore di 1,64 Å per l'allineamento di 428 residui, mentre lo stesso confronto tra il modello di Fpn in conformazione outward-open e la struttura di FucP ha fatto registrare un valore di RMSD di 5,5 Å sull'allineamento di 391 residui.

È stato utilizzato anche un metodo alternativo per valutare la similarità strutturale, attraverso il calcolo del TM-score, un parametro meno sensibile alla deviazione strutturale locale e che risulta pertanto più affidabile rispetto l'RMSD per valutare la similarità strutturale globale tra strutture proteiche. Valori del TM-score nell'intervallo 0,0-0,3 sono diagnostici di una somiglianza strutturale casuale, mentre valori che cadono nell'intervallo 0,5 -1,0 sono tipici di proteine che mostrano uno stesso ripiegamento. Il TM-score calcolato per entrambi i modelli di Fpn è risultato superiore allo 0,5 (0,73 e 0,51, rispettivamente, per il modello inward e outward-open) a confermare l'attendibilità delle strutture generate.

Validazione sperimentale dei siti predetti di legame col ferro

La rilevanza dei residui putativi di legame col ferro, identificati nel modello strutturale della ferroportina nella conformazione inward-open, è stata testata attraverso le misure di esporto del ferro in cellule in coltura HEK293T trasfettate con ferroportina wild type e forme mutate. È ampiamente riportato in letteratura l'utilizzo di questa linea cellulare per studi di esporto del ferro dopo trasfezione, in quanto non esprime livelli misurabili di ferroportina endogena.

Gli amminoacidi coinvolti putativamente nel legame/traslocazione del ferro attraverso il canale proteico sono stati modificati in accordo a mutazioni naturali (p.Asp181Val e p.Tyr501Cys), oppure sostituiti con alanina (p.Asp39Ala, p.Glu52Ala, p.Asp325Ala e p.Glu518Ala) o metionina (p.Arg466Met) al fine di rimuovere la carica; infine, alcuni dei residui di tirosina situati nei siti di legame col ferro sono stati sottoposti a sostituzione isosterica con fenilalanina (p.Tyr54Phe, p.Tyr318Phe e p.Tyr331Phe). Il mutante naturale di ferroportina p.Asn174Ile è stato scelto come controllo, in quanto si presenta localizzato su membrana e risulta incapace di esportare il ferro (De Domenico et al., 2006).

Le analisi di epifluorescenza sulla Fpn-GFP (**Figura 22**) e i western blot condotti sui lisati cellulari delle HEK293T (**Figura 23**) a seguito della trasfezione, hanno evidenziato che la distribuzione cellulare e i livelli di espressione della proteina wild type e delle forme

ricombinanti sono simili, con la maggior parte della proteina localizzata correttamente sulla membrana plasmatica.

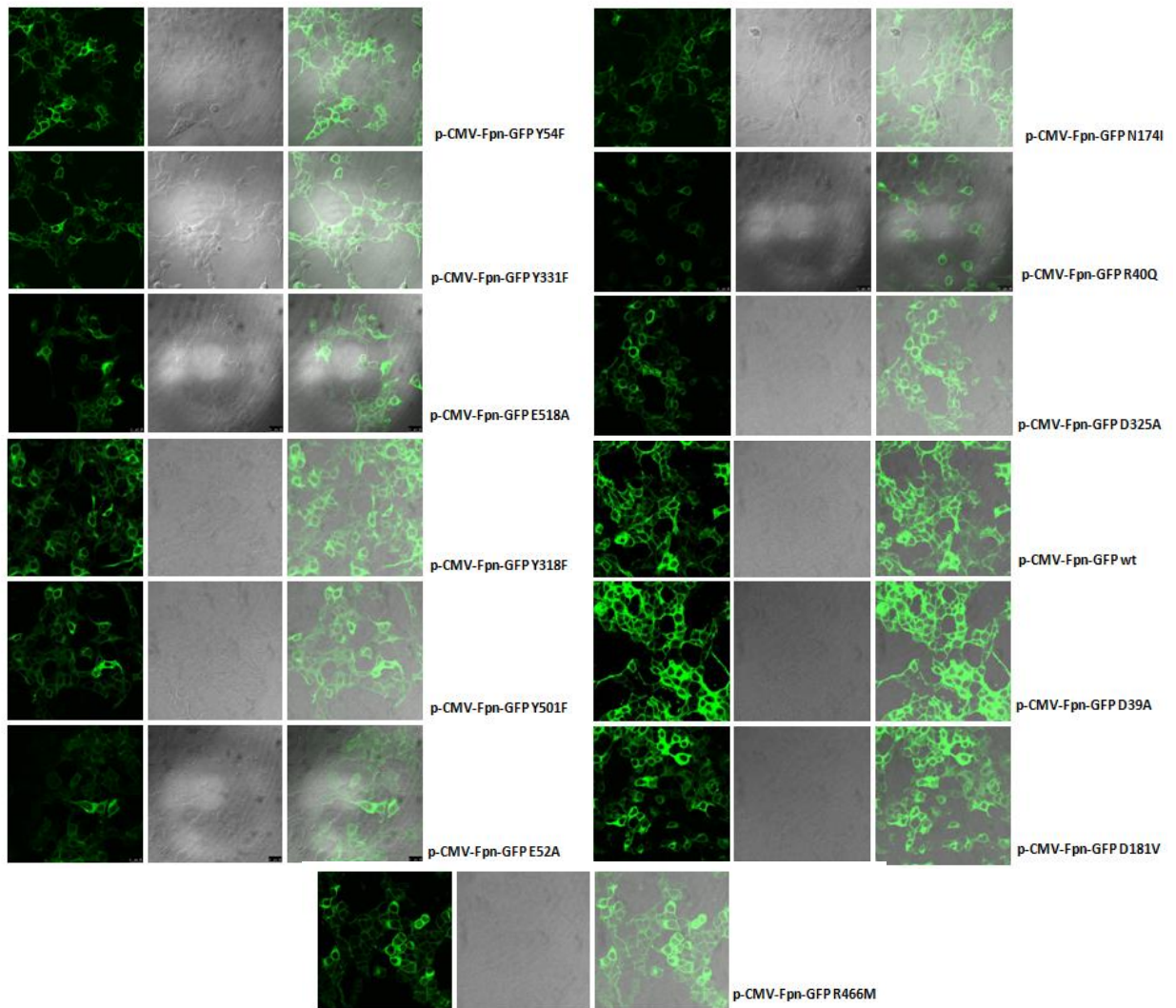


Figura 22. Cellule HEK293T trasfettate con ferroportina umana (wt o mutanti) analizzate con microscopia confocale (Leica DMI6000) con obiettivo 63X a immersione.

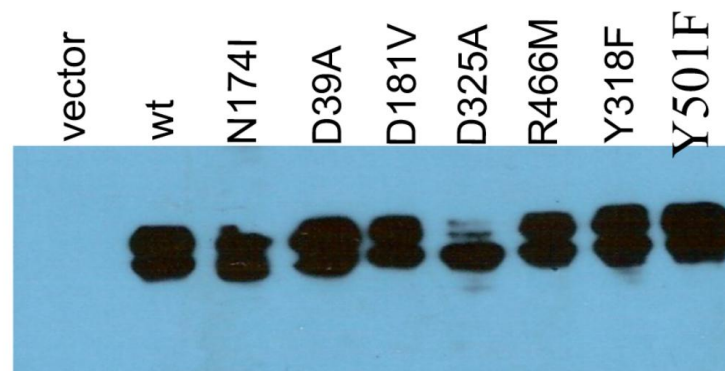


Figura 23. Livelli di espressione di ferroportina analizzati in western blot. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari di HEK293T dopo trasfezione transiente con Fpn (wt e mutanti indicati).

Per quanto riguarda la misura di esporto del ferro dalle cellule, questa può essere valutata misurando la quantità di ferro rilasciata nell'ambiente extracellulare o mediante determinazione del ferro residuo nelle cellule. Il primo metodo è preferibile per saggi di tipo cinetico, mentre la maggior parte degli studi per la valutazione della funzionalità di varianti proteiche della ferroportina, si basano sulla determinazione del contenuto di ferro intracellulare. Nello specifico, le cellule sono state caricate con ^{55}Fe per 24 ore e al termine di questa incubazione è stato misurato il contenuto residuo di ferro radioattivo intracellulare, utilizzando condizioni sperimentali analoghe a quelle impiegate in studi precedenti (Schimanski et al, 2005; Girelli et al, 2008; Wallace et al, 2010).

Come si può evidenziare dal grafico riportato in **Figura 24**, le mutazioni a carico dei due residui di aspartato (p.Asp39 e p.Asp181) che formano il sito putativo interno di legame del ferro aboliscono completamente la funzionalità nel trasporto del substrato della ferroportina. Invece, modificando i residui che formano il sito putativo esterno di legame del ferro si registrano solo lievi cambiamenti, non significativi, della capacità di esporto della ferroportina (**Figura 24**). Queste osservazioni suggeriscono che tra i due, il sito centrale intramembrana è quello coinvolto nella traslocazione del metallo.

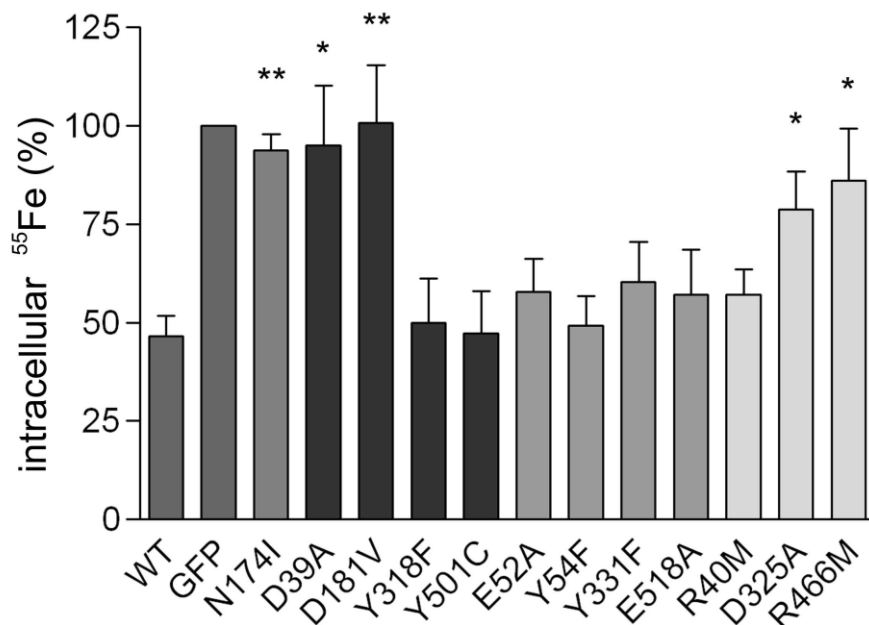


Figura 24. Misure dei contenuti di ferro intracellulari. Cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con Fpn wt e con le varianti indicate in grafico. Le cellule sono state incubate con ferro radioattivo per 24 h. Il quantitativo di ferro è stato normalizzato rispetto alle proteine totali, rapportato ai valori ottenuti per il plasmide vuoto (GFP) ed espresso come percentuale. I dati mostrati rappresentano la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti. I valori di $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$, calcolati utilizzando il t -test di Student, sono stati ottenuti per comparazione con le misurazioni su ferroportina wild type.

Dato che una compromissione nel trasporto del ferro può derivare sia da una perdita della capacità di legame del metallo che da una costrizione conformazionale imposta dal residuo mutato è stato condotto un saggio di legame del ferro alla ferroportina per chiarire questo aspetto sulle proteine risultate non funzionali negli esperimenti di esporto. Questo saggio è stato realizzato su ferroportina umana ricombinante (wt e mutanti non funzionali) espressa e purificata con il sistema basato sull'utilizzo di *Pichia pastoris* messo a punto nei nostri laboratori.

Come evidenziabile dal grafico in **Figura 25**, i mutanti di Fpn D39A e D181V mostrano una diminuzione significativa della capacità di legame del ferro, se confrontati alla proteina wt. La proteina mutata in posizione 501 a cisteina risulta invece in grado di legare il metallo a livelli paragonabili a quelli osservati per la Fpn wt. Altro dato interessante è che anche per il mutante N174I, si registra alterazione nella capacità di legame del ferro, a indicazione del fatto che probabilmente la modifica di questo residuo, nonostante non sia situato nel canale proteico, blocchi la proteina in uno stato non-funzionale.

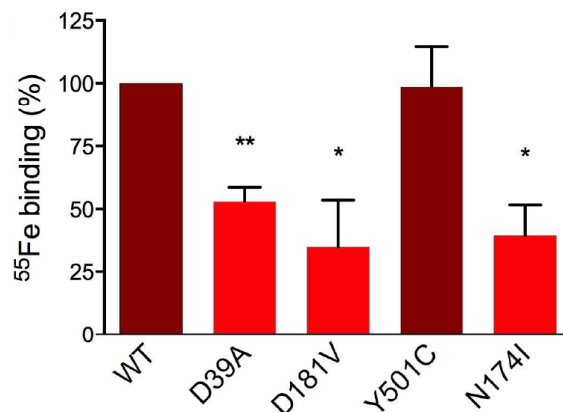


Figura 25. Capacità di legame del ferro della ferroportina wild type e delle varianti indicate. La proteina purificata è stata saggiata attraverso saggio di legame su membrana di nitrocellulosa (vedi materiali e metodi). I dati indicano la media \pm SE di due esperimenti indipendenti. *P < 0,05 e **P < 0,01 sono stati ottenuti per comparazione alla Fpn wt.

Anche il ruolo degli altri due residui carichi identificati nel canale proteico, in prossimità dei due siti putativi di legame col metallo è stato valutato attraverso misure di efflusso del ferro su cellule in coltura. Come riportato nella **Figura 24**, la mutazione a carico dell'aspartato 325 e, in misura maggiore quella sull'arginina 466 riduce significativamente (P < 0,05) la capacità di trasporto del ferro di ferroportina. Data la loro localizzazione, questi residui non possono essere considerati parte dei siti di legame del ferro. Una possibilità è che

l'arginina 466, essendo situata in stretta prossimità dei residui D181 e Y318, localizzati nel sito di legame interno del ferro, possa agire da sensore della presenza del metallo legato all'interno della ferroportina. Se ciò fosse vero, questo residuo potrebbe innescare il passaggio dalla conformazione inward alla outward-open. L'aspartato in posizione 325, localizzato al di sopra dell'arginina 466, potrebbe invece facilitare il rilascio del ferro dal sito di legame e la traslocazione del metallo verso l'ambiente extracellulare. Inizialmente era stata identificata anche una seconda arginina (p.Arg40) quale potenziale sensore del ferro, in quanto situata in prossimità dei ligandi del sito interno di legame al metallo. Il mutante p.Arg40Met però, in linea con i dati di Le Gac et al. (2013), si è rivelato essere pienamente funzionale (**Figura 24**), e quindi questa ipotesi è stata esclusa.

La conclusione che si può trarre da questa analisi sperimentale del modello è che uno dei siti putativi di legame col ferro (quello interno) identificati nello studio bioinformatico di modellamento molecolare è coinvolto nel legame e nel trasporto del ferro. Il fatto che solo un sito di legame del ferro è rilevante suggerirebbe una stechiometria 1:1 del ferro con la Fpn, ipotesi che necessita però per essere confermata di ulteriori caratterizzazioni biochimiche sulla proteina purificata. Ad ogni modo, la presenza di un singolo sito di legame per il substrato è compatibile con il meccanismo di accesso alternato proposto per l'antiportatore GlpT (Law et al., 2008). Anche se sicuramente coinvolti nella traslocazione del ferro, resta da identificare l'esatto ruolo dei residui Asp325 e Arg466.

Osservazioni sui modelli 3D

A un primo sommario confronto con le strutture 3D già pubblicate di ferroportina, il nostro modello inward-open risulta più simile a quello descritto da Wallace e collaboratori piuttosto che a quello del gruppo di Le Gac. Indipendentemente dagli algoritmi utilizzati, ciò è giustificato dal fatto che una delle due proteine (LacY) su cui ci siamo basati per il modellamento di questa struttura della Fpn è la stessa utilizzata da Wallace, che ha predetto, allo stesso modo, una conformazione in stato inward-open per il trasportatore. Il gruppo di Le Gac invece, ha proposto una struttura di Fpn in stato "occluso", sulla base dell'omologia con il trasportatore EmrD (codice PDB: 2GFP) della MSF di *Escherichia coli*. Inoltre, a causa dei diversi approcci utilizzati per la loro costruzione, vengono riscontrate differenze significative anche confrontando la posizione dei singoli residui in strutture predette a partire da uno stessa

proteina stampo. Ovviamente, tutti i modelli in questione, data la bassa identità di sequenza tra la Fpn e le proteine utilizzate come stampo, devono essere considerati a bassa risoluzione.

Analizzando il modello ottenuto in conformazione aperta verso l'interno della cellula, si può osservare che i residui coinvolti nel legame con l'epcidina (la regione che si estende dalla Gly323 alla Ser343 (De Domenico et al., 2008) e in particolare la Phe324 e la Tyr333 (Preza et al., 2011)) sono parzialmente celati nei segmenti TM e diventano invece completamente accessibili al solvente in quello outward-open. Residui le cui mutazioni determinano una localizzazione aberrante della Fpn (A77D (De Domenico et al., 2006), R88G e W158C/L (Detiveaud et al., 2013)) si trovano invece posizionati al confine tra segmenti TM e citoplasma, confermando un loro possibile ruolo nel corretto ripiegamento della proteina.

Come già evidenziato, l'analisi dei modelli 3D generati attraverso metodiche bioinformatiche, ha consentito di fare ipotesi che sono state verificate sperimentalmente, sul ruolo dei singoli residui nelle relazioni struttura-funzione della ferroportina. Su questa base, è stata validata sperimentalmente l'importanza per il traffico del ferro dei residui identificati nel canale proteico individuato al centro della proteina in conformazione aperta verso l'interno della cellula. Mentre la bassa risoluzione intrinseca dei modelli non permette di trarre conclusioni sulla possibile geometria di coordinazione del ferro a livello di questi siti, le distanze tra i carboni α dei residui amminoacidici ivi presenti sono risultate coerenti con la struttura di un sito in grado di ospitare il ferro. Queste distanze, infatti, tra 10,2 e 14,9 Å, sono simili a quelle osservate in strutture cristallografiche di altre proteine note leganti il ferro, come la lattoferrina bovina (11,0÷12,3 Å, codice PDB: 4NED), la proteina periplasmatica legante il ferro di *Thermus thermophilus* (14,4 Å, codice PDB: 4ELR) e la transferrina sierica umana (11,1÷12,9 Å, codice PDB: 4HOW).

I cluster amminoacidici di legame del ferro appaiono distrutti nella struttura proteica outward-open. La transizione dalla conformazione aperta verso l'interno a quella aperta verso l'esterno della cellula, potrebbe essere responsabile dell'allentamento dei siti di legame al metallo e della conseguente liberazione del ferro. A tale riguardo, si può considerare la possibilità che parte dell'energia contenuta nel legame metallico possa dissiparsi durante l'induzione del cambiamento conformazionale nella proteina.

Dei quattro residui aminoacidi individuati nel sito di legame intracellulare al ferro, due sono associati a mutazioni naturali in membri di famiglie italiane colpite da emocromatosi di tipo IV: si tratta dell'aspartato 181 sostituito a valina (Cremonesi et al., 2005) e della tirosina

501 a cisteina (Letocart et al., 2009). Il fenotipo associato alla mutazione D181V, caratteristico della malattia classica da ferroportina, trova una semplice spiegazione nei nostri dati, in quanto il mutante in questione ha mostrato compromissione sia nel trasporto che nel legame del ferro. Dall'altro lato, il mutante Y501C risulta, secondo le nostre osservazioni sperimentali, in grado sia di legare il ferro che di esportarlo correttamente, in linea con il fenotipo clinico associato alla sostituzione del residuo, che è quello della malattia da ferroportina non classica. Questo fenotipo risulta dalla resistenza all'epcidina, quindi da una forma funzionale e permanentemente 'accesa' di Fpn (Mayr et al., 2010). Queste osservazioni sembrano essere apparentemente in contrasto con la possibile presenza del residuo 501 nel sito di legame del ferro. Una possibile spiegazione è che i ligandi all'interno del sito di legame per il metallo non contribuiscano nella stessa misura alla forza di legame: un residuo potrebbe semplicemente agire da modulatore dell'affinità piuttosto che come determinante strutturale tout-court. Inoltre, è da sottolineare che il trasporto cellulare del ferro è difficile da misurare in condizioni simili a quelle fisiologiche, e che le misurazioni sono generalmente effettuate in presenza di ferro in eccesso. Ciò potrebbe mascherare sottili differenze nell'efficienza (cioè nella cinetica) di esporto del metallo dalla cellula mediato dalla proteina wt rispetto ai mutanti. Pertanto, non possiamo escludere che la Tyr501 (e anche la Tyr318, associata anch'essa a un mutante funzionale) possa comunque essere situata nel sito di legame ma che abbia magari un ruolo più marginale nel legame e nella traslocazione del ferro, e che questo non possa essere adeguatamente rilevato nelle nostre condizioni sperimentali. Una diversa spiegazione potrebbe invece coinvolgere la posizione riscontrata per la Tyr 501 nel modello proposto da Le Gac, che risulta leggermente diversa da quella prevista dalla nostra struttura.

Sempre per quanto riguarda il mutante Y501C, il fatto che sia resistente all'epcidina (Letocart et al., 2009), non implica necessariamente che il residuo sia direttamente parte del suo dominio di legame in Fpn. Come recentemente dimostrato per l'istidina 507 (Mayr et al., 2011) e correttamente sottolineato da Le Gac (2013), un residuo non deve essere necessariamente parte del dominio di legame per l'epcidina per sortire effetti sul suo legame. Vale la pena osservare che la cisteina 326 e l'istidina 507, due residui la cui mutazione conferisce resistenza all'epcidina a causa della perdita/riduzione del legame con l'ormone (Fernandes et al., 2009, Mayr et al., 2011), risultano inaccessibili al solvente nel modello inward-open, mentre lo diventano nella struttura aperta verso l'esterno e sono tra loro abbastanza vicini per stabilire un legame idrogeno. Da questa osservazione, si può ipotizzare

che la coppia Cys-His contribuisca alla formazione di un sito di aggancio essenziale per l'epcidina quando la Fpn si trova nello stato outward-open e che quindi la mutazione di uno dei due residui distrugga il sito e porti alla resistenza all'ormone. I due residui in questione sono stati riscontrati accessibili all'epcidina nel modello di Le Gac, al contrario dei dati presentati da Wallace. A nostro parere, lo stato "occluso", riportato dal primo gruppo non è la scelta migliore per mimare il legame con l'epcidina, inoltre gli stessi autori riconoscono che la posizione dell'istidina 507 è difficile da predire con precisione nel loro modello, in quanto situata in un loop non strutturato. La nostra previsione della struttura proteica in entrambe le conformazioni permette di trovare un accordo a questa discrepanza: il sito di legame per l'epcidina sarebbe disponibile per l'aggancio del peptide solo nella conformazione outward-open. Questo ha senso se si considera la forma inward-open come uno stato di riposo della proteina e quella outward-open come conformazione ottenibile solo in presenza di ferro intracellulare e cioè quando la Fpn oscilla tra i due stati. Il legame selettivo dell'epcidina alla Fpn nella conformazione rivolta verso l'esterno potrebbe pertanto garantire che la degradazione avvenga solo quando il ferro intracellulare è presente in abbondanza.

Il nostro modello di Fpn nella conformazione outward-open suggerisce una ulteriore considerazione. È noto che i pazienti eterozigoti per la mutazione N174I a carico della Fpn mostrano sovraccarico di ferro nelle cellule di Kupffer. Il mutante in questione si localizza sulla superficie cellulare, risulta sensibile all'epcidina, ma è incapace di trasportare il metallo (De Domenico et al., 2006). Abbiamo in aggiunta dimostrato che la proteina mutata non è in grado di legare ferro, nonostante il residuo alterato non sia un ligando del ferro. Una possibilità è che la mutazione porti la proteina ad adottare uno stato conformazionale che limiti l'accesso al sito di legame per il substrato. Come mostrato in **Figura 26**, Asn174 sembra essere l'unico residuo polare presente in una zona idrofobica che si forma quando la Fpn si muove verso la conformazione outward-open. Pertanto, è molto probabile che la sostituzione della asparagina altamente polare con il residuo idrofobo di isoleucina favorisca questa forma, stabilizzandola attraverso interazioni idrofobiche e impedendo quindi alla proteina di legare il ferro e funzionare correttamente.

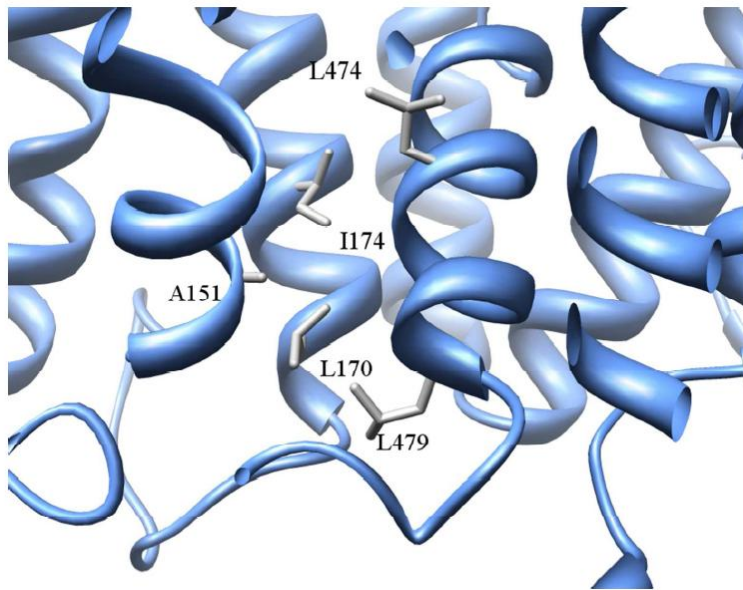


Figura 26. Vista schematica della estremità citosolica del poro del mutante di ferroportina N174I nella conformazione aperta verso l'esterno della cellula. È evidente il raggruppamento idrofobico che si verrebbe a creare nel caso della sostituzione dell'asparagina 174 in isoleucina, che coinvolge gli amminoacidi del dominio N-terminale (Ala151, Leu170 e Ile174) e del dominio C-terminale della proteina (Leu474 e Leu479). Per mostrare le pareti del poro con maggiore chiarezza, parte della struttura è stata rimossa.

4.3 Analisi della ferroportina umana espressa in *Pichia pastoris*

Con lo stesso sistema di espressione e purificazione messo a punto per la ferroportina umana wild type in *Pichia pastoris*, sono state preparate anche le versioni mutate in corrispondenza dei siti putativi di legame con il ferro. Sia la proteina wild type che le varianti prodotte sono state sottoposte ad una serie di analisi volte alla caratterizzazione proteica.

Analisi della glicosilazione della hFpn prodotta in Pichia pastoris

Per verificare l'effettivo stato di glicosilazione della ferroportina prodotta in *Pichia pastoris*, la proteina wild type, purificata attraverso cromatografia di affinità, è stata sottoposta a trattamento con due enzimi deglicosilanti, Endo-H e PNGasi F. Come appare chiaro dall'analisi di western blot condotta dopo reazione enzimatica, la ferroportina viene completamente deglicosilata solo dall'enzima Endo-H (**Figura 27**), mentre il trattamento con PNGasi F sembra essere solo parzialmente efficace. Questo risultato dimostra come, in lievito, la Fpn sia prodotta in forma glicosilata. La proteina subisce una modifica differente da quella che avviene in cellule di mammifero. Infatti la proteina prodotta da mammifero viene

deglicosilata totalmente solo dopo trattamento con la PGNasi F (Pignatti et al., 2005; Gonçalves et al., 2006). L'apparato di glicosilazione di *Pichia pastoris* è in qualche modo in grado di mimare la maturazione che avviene nelle cellule di mammifero, in cui ferroportina mostra un peso molecolare di 67 kDa dovuto all'effetto della sua N-glicosilazione, anche se il tipo di zuccheri complessi legati alla proteina è di natura diversa.

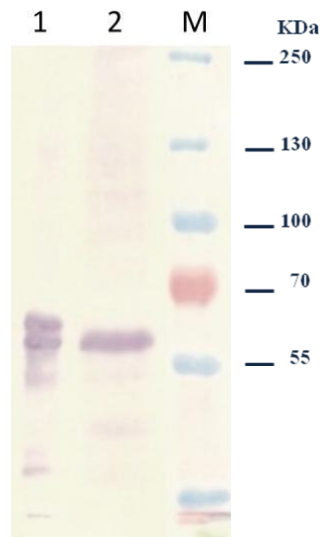


Figura 27. Western blot su estratti di membrane del ceppo GS115/hFpn-FLAG wt dopo trattamento con endo-H. 1: hFpn-FLAG wt, 2: hFpn-FLAG wt dopo trattamento con Endo-H, M: Marker di peso molecolare.

Per valutare quanto la proteina prodotta fosse stabile e quali siano le condizioni più idonee da impiegare quando si lavora con la Fpn è stata eseguita un'analisi della stabilità termica, esponendo la proteina a temperature di 4, 37, 60 e 95°C e a condizioni riducenti o meno. Il western blot eseguito dopo i differenti trattamenti mostra come la condizione migliore per ferroportina è quella che prevede l'esposizione diretta della proteina con sample buffer prima del caricamento su gel SDS-PAGE (**Figura 28**). Trattamenti a temperature crescenti portano ad una graduale degradazione della proteina riscontrabile su membrana di nitrocellulosa: all'aumentare della temperatura, non risultano più visualizzabili le due bande immunoreattive nette con cui si identifica Fpn. Il riducente sembra, invece, non sortire alcun effetto sul pattern di migrazione elettroforetica della proteina.

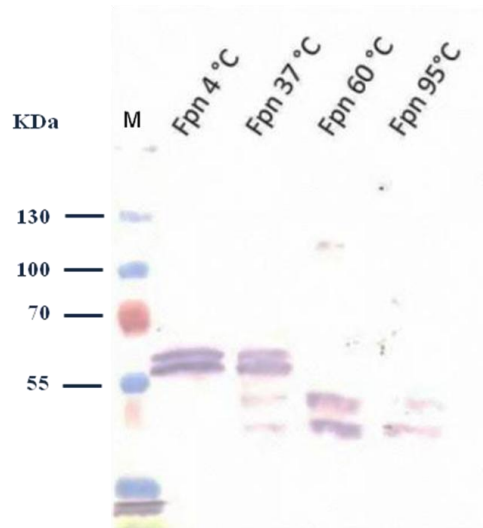


Figura 28. Western blot su hFpn-FLAG wt dopo trattamento a varie temperature (indicate nella parte superiore del gel). M: Marker di peso molecolare.

Localizzazione sub-cellulare di ferroportina

Per analizzare la localizzazione cellulare della ferroportina in lievito, è stata utilizzata, come marcatore, la GFP. La sequenza nucleotidica di questa proteina fluorescente è stata clonata a valle di quella codificante per ferroportina nel vettore di espressione pIB2, utilizzato per la trasformazione del ceppo GS115 di *Pichia pastoris*.

Attraverso microscopia a fluorescenza è stata verificata la localizzazione di una serie di varianti proteiche della Fpn-GFP: la wild type (Fpn wt-GFP), la wild type a seguito di aggiunta del peptide segnale di indirizzamento alla membrana plasmatica della ferrossidasi Fet3 di *Pichia pastoris* (Fpn S2-GFP wt) e il mutante non funzionale Fpn D39A-GFP. Per tutti i trasformanti analizzati, la proteina è stata riscontrata a livello di compartimenti intracellulari (**Figura 29**). In particolare, anche se la localizzazione appare variegata, in molte cellule è evidente una zona fluorescente circolare intorno al nucleo che fa pensare ad una proteina situata sulla membrana del reticolo endoplasmatico. In ogni caso, la ferroportina in tutte le varianti analizzate non raggiunge la membrana plasmatica del lievito. Ciò non toglie che la proteina possa mantenere una corretta funzionalità, come già riscontrato per altri recettori e trasportatori di membrana di mammifero (Sarramegna et al. 2002; Shukla et al. 2007).

Sono stati analizzati, sempre al microscopio in fluorescenza, gli stessi ceppi cresciuti in terreno arricchito con ferro (100 μM) per verificare se, anche in lievito, ferroportina si comporti come nei macrofagi, dove in condizioni di ferro ottimali è localizzata principalmente in domini intracellulari, mentre trasloca alla membrana plasmatica nel momento in cui si verifica un aumento della concentrazione intracellulare del metallo (Delaby et al., 2008). In lievito, il pattern di localizzazione di ferroportina è risultato insensibile alla quantità di ferro intracellulare.

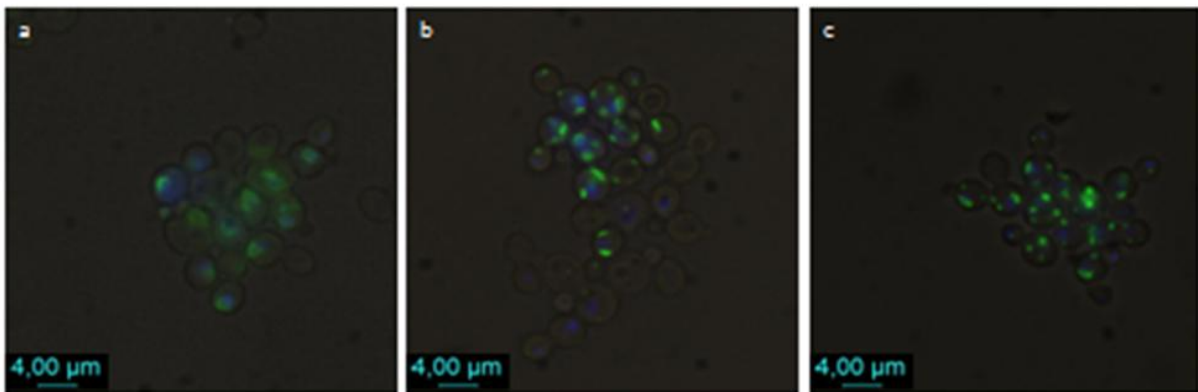


Figura 29. Cellule di *Pichia pastoris* (GS115) sono state trasformate con ferroportina (a. GS115/hFpn wt, b. GS115/hFpn-S2 wt, c. GS115/hFpn D39A) e osservate in fluorescenza con obiettivo a immersione (ingrandimento 100X). La Fpn è espressa come prodotto di fusione alla GFP e risulta visibile in verde, mentre i nuclei sono stati colorati con Hoechst e appaiono blu.

Analisi dell'espressione di ferroportina in Pichia pastoris: curve di crescita e metabolismo del ferro

È stata valutata attraverso diversi parametri la possibile influenza dell'espressione di ferroportina sui ceppi di lievito trasformati. Da un lato è stato analizzato l'andamento della crescita nel tempo, dall'altro l'eventuale alterazione del metabolismo del ferro, attraverso valutazione dell'espressione della ferrossidasi ferro-dipendente Fet3 in trasformanti selezionati. I ceppi su cui sono stati analizzati questi parametri sono stati i seguenti: il ceppo parentale GS115, GS115/hFpn wt, GS115/hFpn-S2 wt e GS115/hFpn D39A. Gli stessi ceppi sono stati analizzati anche in versione di fusione alla GFP.

Per quanto riguarda l'analisi della crescita dei ceppi di *P. pastoris* in esame, le curve, ottenute attraverso la misurazione dell'assorbanza a 600 nm nel tempo delle cellule coltivate in YPD addizionato del chelante del ferro BPS (80 μM) o di Fe^{2+} (100 μM) (**Figura 30**), mostrano che l'espressione della proteina, in tutte le versioni analizzate, non influenza significativamente questo parametro. La crescita dei trasformanti in esame mostra infatti un

andamento paragonabile a quello dei lieviti di riferimento (GS115 e GS115/GFP), sia in presenza che in carenza di ferro.

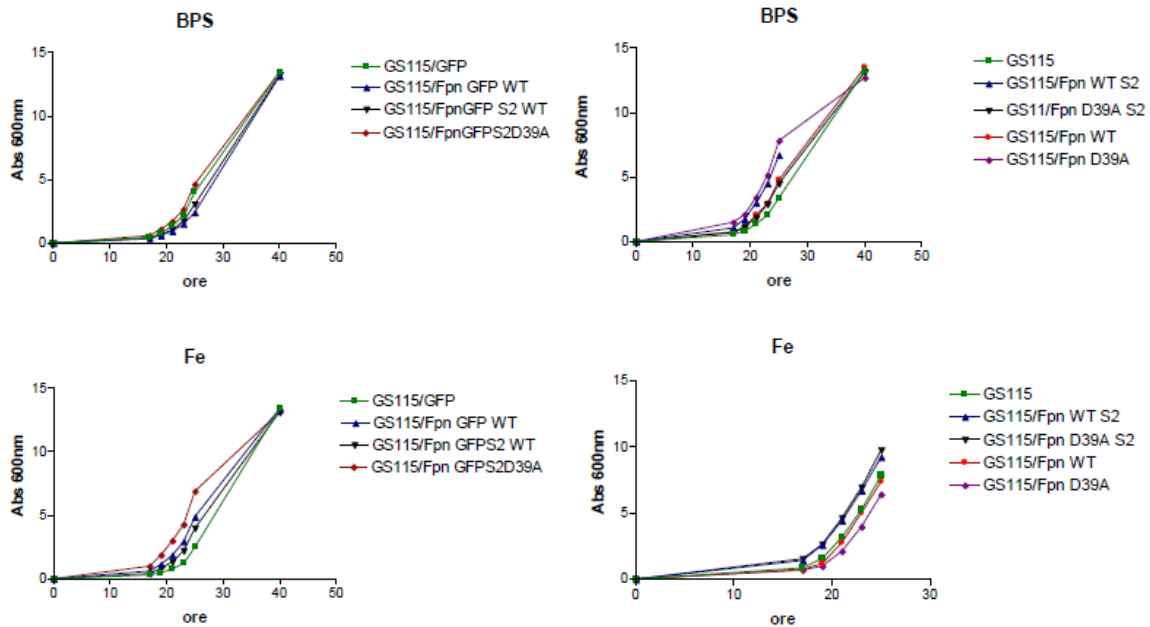


Figura 30. Curve di crescita ottenute monitorando l'assorbanza a 600 nm nel tempo, dei ceppi di *Pichia pastoris* indicati in figura (nei grafici a sinistra i ceppi sono stati trasformati con le stesse versioni di ferroportina dei ceppi di destra, con l'aggiunta della GFP fusa al C- terminale proteico). Le colture sono state fatte crescere in YPD, in presenza di BPS 80 µM o di Fe²⁺ 100 µM.

Sono stati in aggiunta valutati i livelli di espressione della ferrossidasi Fet3. Questa proteina fa parte del sistema di importo ad alta affinità del ferro nel lievito e la sua espressione è regolata dai livelli intracellulari del metallo: viene indotta in carenza e repressa in condizioni di eccesso del metallo (Rutherford & Bird, 2004). Dall'analisi dei gel di poliacrilammide trattati con *o*-dianisidina (**Figura 31**), substrato utilizzabile da Fet3, che ossidato forma un precipitato colorato, è evidente come non ci siano sostanziali differenze nei quantitativi proteici della ferrossidasi tra i ceppi esponenti Fpn e quelli di controllo. Si assiste infatti, come in condizioni normali, ad un'induzione di Fet3 in carenza di ferro (cioè in presenza del chelante BPS).

In generale quindi, l'espressione della ferroportina non sembra influenzare la crescita e il metabolismo del ferro nel lievito, indicando che la proteina ricombinante non interviene nei meccanismi cellulari di esporto/traffico del metallo.

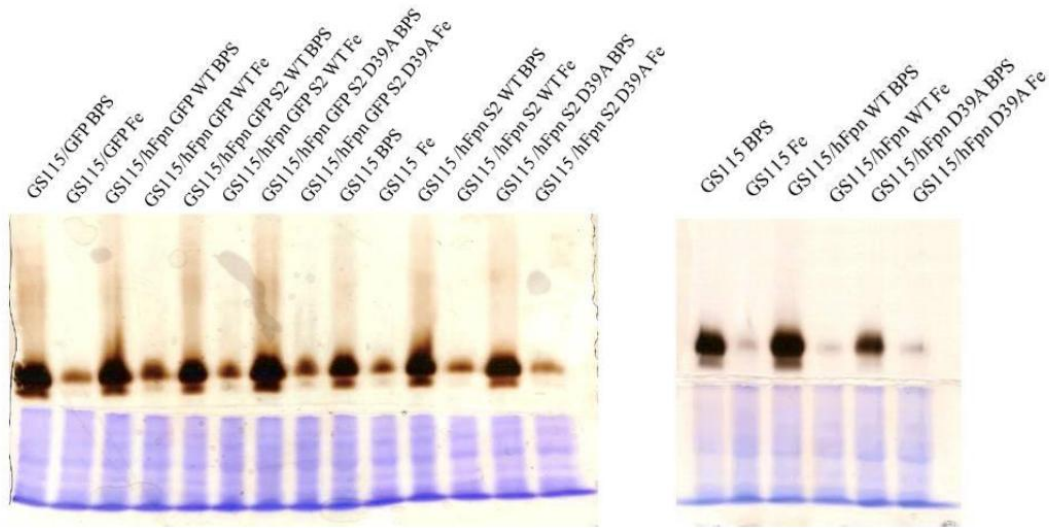


Figura 31. Gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 7,5% su membrane cellulari dei ceppi di *Pichia pastoris* indicati nella parte superiore dell'immagine. Il gel è stato trattato con *o*-dianisidina (porzione superiore) o Blu Coomassie (porzione inferiore). Ogni trasformatante è stato analizzato in due differenti condizioni di crescita: in presenza di BPS 80 μM o Fe^{2+} 100 μM .

Valutazione della qualità della proteina purificata da Pichia pastoris: dicromismo circolare e saggi di legame con l'epcidina

Sia la forma wt che alcuni dei mutanti di ferroportina realizzati sono stati utilizzati, dopo espressione su larga scala e purificazione su resina anti-FLAG, per studi di dicromismo circolare e caratterizzati per il legame con l'epcidina. Per quanto riguarda questo secondo parametro, sono state valutate sia la saturazione del legame che la competizione dose-dipendente della Fpn con epcidina-25 umana.

Oltre alla forma wild type, le proteine scelte per queste analisi sono state: tre tra quelle con mutazioni a livello del sito interno di legame putativo col ferro (mutanti D39A, D181V e Y501C), una rappresentativa del sito di legame esterno (mutante Y331F) e R466M, mutante con alterazione di uno dei due residui localizzati tra i due siti putativi di legame nel canale proteico. A queste varianti è stato aggiunto N174I, mutante naturale utilizzato come controllo.

Dicromismo circolare

Dagli spettri di dicromismo circolare ottenuti (**Figura 32**) si può osservare che la Fpn wild type ha un andamento paragonabile a quello di un polipeptide con struttura ad α -elica, con due picchi negativi di grandezza comparabile a circa 222 e 208 nm e un picco positivo molto più

intenso intorno a 190 nm. Questo risultato è in accordo con i modelli strutturali che prevedono che le regioni TM della proteina siano ripiegate ad α -elica.

Tutti i mutanti di Fpn analizzati mediante dicroismo circolare hanno fatto registrare uno spettro molto simile a quello della proteina wild type. Le lievi variazioni presenti sono nel rapporto tra i picchi a 222 e 208 nm e probabilmente rispecchiano piccole differenze nell'impaccamento delle eliche (**Figura 32, b**).

Poiché la proteina viene eluita a basso pH durante la cromatografia di affinità (glicina 0,1 M a pH 3,5), è stata eseguita anche una analisi degli spettri sulla Fpn wt in funzione del pH, per valutare eventuali cambiamenti strutturali indotti da una variazione di cariche. Partendo da uno stock di proteina a pH 5,2 è stato gradualmente aumentato il pH fino a un valore di 7,9 e sono stati registrati gli spettri di dicroismo circolare. I cambiamenti strutturali rilevati (**Figura 31, a**) sono modesti, per cui si può concludere che Fpn risulta correttamente ripiegata in un ampio intervallo di pH.

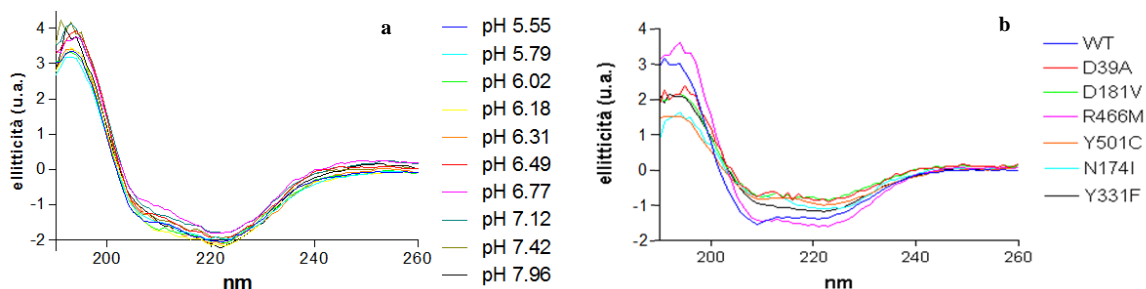


Figura 32. Spettri di dicroismo circolare registrati durante l'analisi di ferroportina wild type a differenti pH (**a**) e di vari mutanti di ferroportina (indicati in figura, **b**) registrati a pH 7,4. In entrambi i casi l'analisi è stata condotta in fosfato di potassio 10 mM a pH 6,5/ Na_2SO_4 50 mM/DDM 0,03%.

Saggio di legame ferroportina/epcidina

Il legame dell'epcidina alla ferroportina purificata è stato misurato nei saggi condotti come incremento della polarizzazione di fluorescenza dell'epcidina-25-M21K-TMR umana.

Tutti i mutanti di ferroportina umana testati hanno fatto registrare una affinità di legame per l'epcidina più bassa (alti valori di EC_{50} sulle curve di saturazione di legame, **Tabella 2, Figura 33**) rispetto a quella riscontrata per la forma wild type della proteina. Per il mutante Y331F è stata registrata la diminuzione di affinità minore, con una EC_{50} risultata di circa 2,5 volte più alta di quella della Fpn wild type. All'altro estremo la perdita di affinità più accentuata, con una EC_{50} risultata di circa 9 volte più alta, è stata osservata per il mutante naturale N174I. Il dato sembra in accordo con dati già riportati in bibliografia (De Domenico

et al., 2006) che mostrano come la proteina mutata, usata per esperimenti di trasfezioni *in vitro*, permanga su membrana dopo trattamento con epcidina.

Tra i mutanti risultati con l'affinità maggiore, si evidenzia, oltre a Y331F anche Y501C; entrambe le proteine risultano in grado di esportare il ferro secondo i risultati ottenuti dalle trasfezioni *in vitro* sulle HEK293T e secondo quanto riportato in bibliografia per Y501C, che rappresenta, come già sottolineato più volte, un mutante naturale funzionale di Fpn (Letocart et al., 2009).

Sempre se confrontati con la proteina wt, i mutanti hanno mostrato una risposta massimale ridotta nel legame con l'epcidina (**Figura 33**).

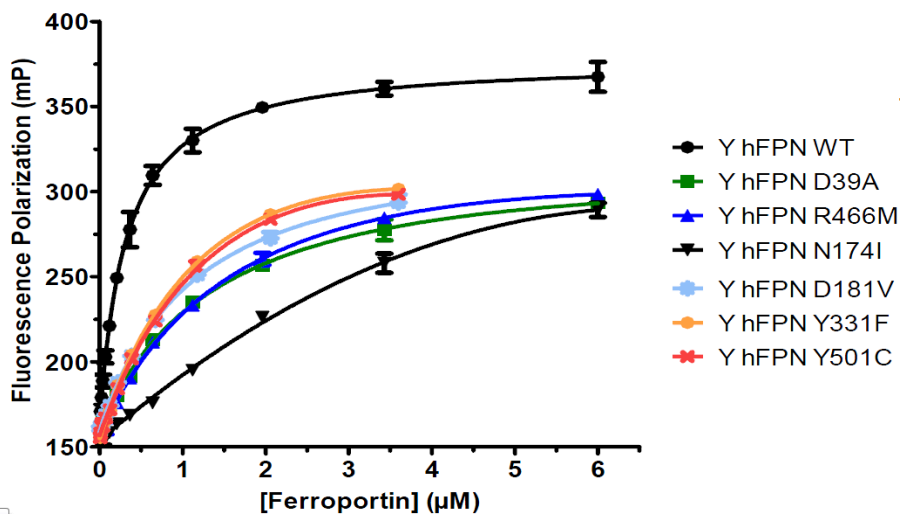


Figura 33. Curve di saturazione del legame della ferroportina wild type e mutanti con l'epcidina. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della stessa con ferroportina (wt o mutanti) a differenti concentrazioni.

L'affinità di legame per l'epcidina-25 della ferroportina wild type umana purificata da lievito è stata anche confrontata a quella registrata per una variante wt di topo espressa e purificata da cellule d'insetto (proteina messa a disposizione dalla Vifor Pharma) (**Figura 34**). La variante umana, con una K_d pari a $0,322 \mu\text{M}$, mostra, una affinità, in questo caso di circa 4,5 volte, maggiore rispetto al suo omologo ($K_d=1,425 \mu\text{M}$).

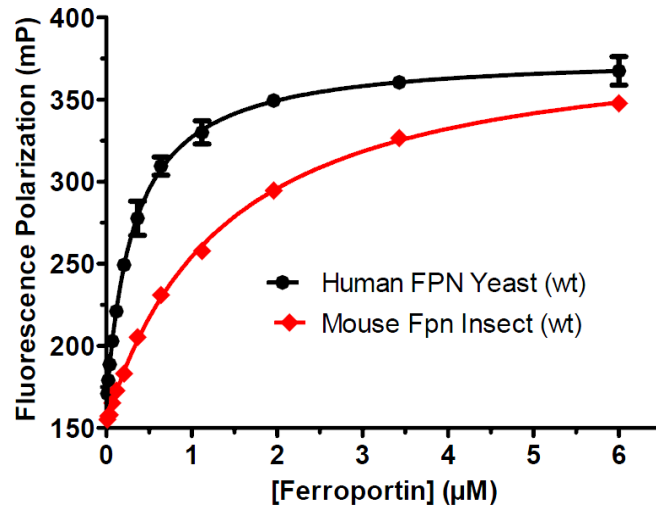


Figura 34. Curve di saturazione del legame della ferroportina wild type umana (purificata da lievito) o di ratto (purificata da insetto) con l'epcidina. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della stessa con ferroportina a differenti concentrazioni.

Saggio di legame ferroportina/epcidina-20

È stata valutato anche il legame tra la ferroportina umana e la forma tronca di epcidina di 20 amminoacidi, priva di attività biologica (**Figura 35, a**).

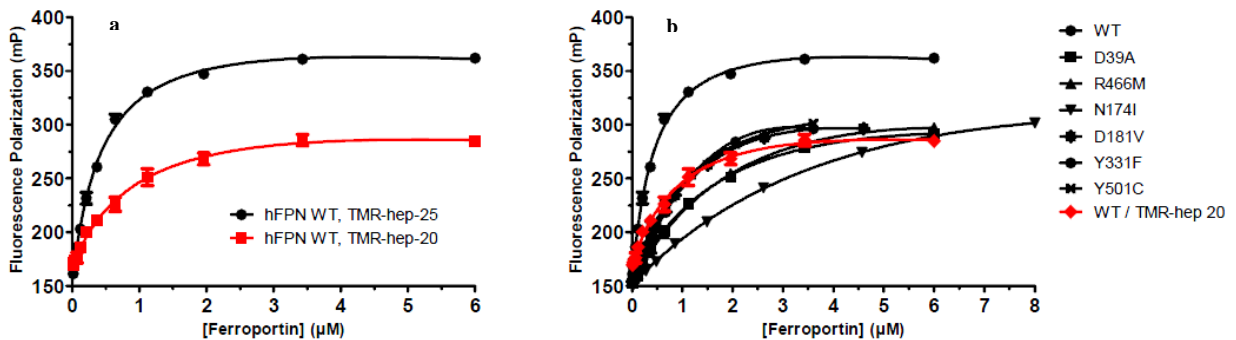


Figura 35. Curve di saturazione del legame ferroportina/epcidina. Nell'immagine **a** sono visibili le curve di saturazione del legame della ferroportina wt con le due differenti tipologie di epcidina umana (20 o 25) utilizzate negli esperimenti. Nell'immagine **b** la curva di saturazione registrata per la Fpn wt con l'epcidina-20 è posta a confronto con quella dei mutanti di Fpn con epcidina-25. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 o della epcidina-20 fluorescente, dopo incubazione della stessa con ferroportina (wt o mutanti) a differenti concentrazioni.

Se si compara l'affinità della Fpn wt umana per l'epcidina-20 con quella ottenuta effettuando gli stessi esperimenti con l'epcidina-25, essa risulta di circa due volte più bassa. Anche la risposta massimale di legame della forma di epcidina tronca alla ferroportina wt subisce una diminuzione, che in ogni caso risulta sempre inferiore rispetto a quella registrata

per i mutanti di ferroportina presi in esame (**Figura 35**). La differenza, in termini di segnale di polarizzazione di fluorescenza (ΔmP), registrato a una concentrazione di Fpn pari a 6 μM (intorno a cui si ha saturazione del legame), tra la Fpn per il legame con l'epcidina-25 o con l'epcidina-20 è di 77 mP.

Nonostante questo dato sulla riduzione del legame massimale, l'affinità dell'epcidina-20 rispetto a quella dell'epcidina-25 per la Fpn wt è quella che subisce una alterazione più lieve se confrontata a quella dei mutanti testati.

Competizione dose-risposta

In aggiunta ai dati sull'affinità, è stata valutata anche la specificità del legame tra ferroportina ed epcidina tramite saggi di competizione di legame alla ferroportina della epcidina-25 non marcata con quella marcata. Il grado di competizione si riflette in una riduzione del segnale di polarizzazione di fluorescenza all'aumentare della concentrazione di epcidina non marcata (**Figura 36**). Il legame della Fpn wild type all'epcidina-25 è risultato specifico, con una concentrazione inibente IC_{50} di circa 0,3 μM . Espresso in percentuale, il 22% del segnale di polarizzazione di fluorescenza dovuto al legame della epcidina-25 marcata alla Fpn wt viene perso se si incuba con epcidina non marcata. Questo indica anche che la maggior parte del legame osservato tra le due molecole non è specifico. Tutti i mutanti analizzati, hanno comunque mostrato minore specificità di legame con l'epcidina-25 con le seguenti percentuali di riduzione del segnale di polarizzazione di fluorescenza: 14% per Y331F, 5% per D181V, 4% per D39A, 2,8% per R466M, 2,7% per Y501C e N174I a seguire (**Figura 36**).

Si può affermare quindi che solo la variante Y331F mostra una forte competizione dose-dipendente. Tutti gli altri mutanti hanno mostrato principalmente una competizione parziale e ciò indica che il legame osservato con l'epcidina è per lo più non specifico.

Nonostante l'alta affinità di legame con l'epcidina rilevata per il mutante naturale Y501C, la specificità di questa interazione è risultata tra le più basse. Questa osservazione è in linea con quanto riportato in bibliografia; la variante proteica in questione è infatti associata *in vivo* ad un fenotipo patologico atipico, caratterizzato da mancanza di risposta alla regolazione omeostatica mediata dall'epcidina (Letocart et al., 2009).

Anche se per le varianti testate a una prima osservazione sono rilevabili piccole variazioni nei valori di IC_{50} rispetto alla proteina wt, bisogna considerare l'intervallo del segnale di

polarizzazione di fluorescenza in cui si osserva l'effetto di competizione, che deve risultare pronunciato per essere associato a un dato significativo. Per i mutanti in questione, questo intervallo è lieve e di conseguenza sta ad indicare una bassa competizione (**Figura 37**).

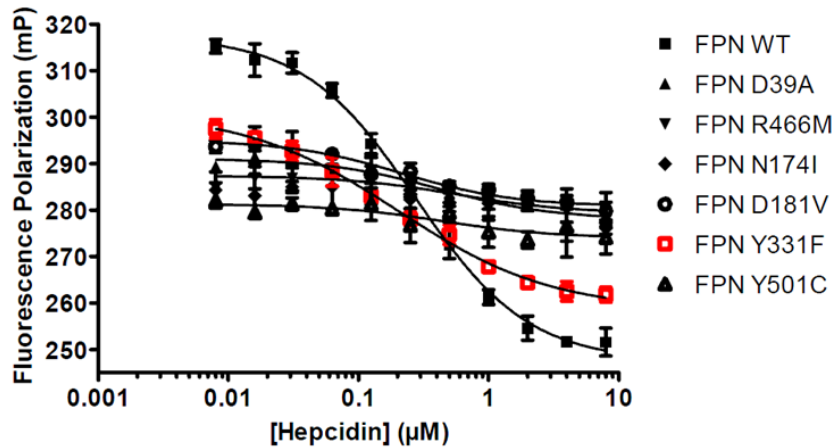


Figura 36. Competizione dose-risposta del legame epcidina/ferroportina. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della ferroportina (wt o mutanti) con epcidina-25 non marcata a differenti concentrazioni. La concentrazione di ferroportina utilizzata è pari alla EC_{60} stimata dalle curve di saturazione.

Per quanto riguarda invece la risposta registrata a seguito di aggiunta di epcidina-20 non marcata nel legame dell'epcidina-25M21K alla ferroportina wt, non è osservabile una diminuzione del segnale di polarizzazione di fluorescenza (**Figura 38**), ad indicazione che l'epcidina-20 non compete con la 25 per il legame alla Fpn.

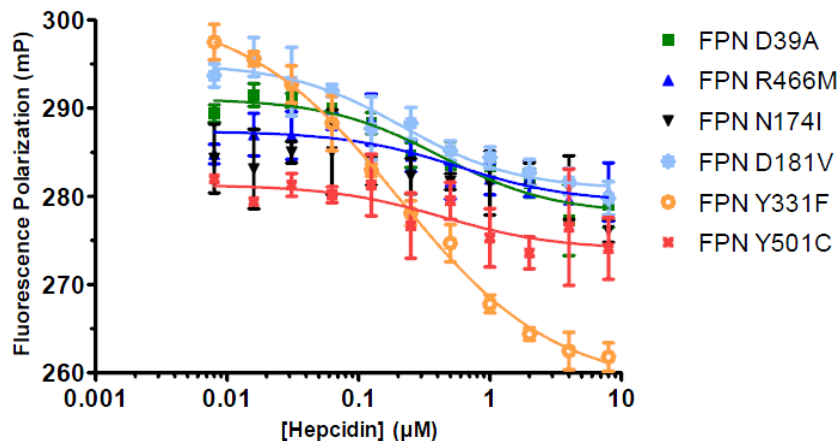


Figura 37. Competizione dose-risposta del legame epcidina/ferroportina. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione dei mutanti di ferroportina (indicati in grafico) con epcidina-25 non marcata a differenti concentrazioni. La concentrazione di ferroportina utilizzata è pari alla EC_{60} stimata dalle curve di saturazione.

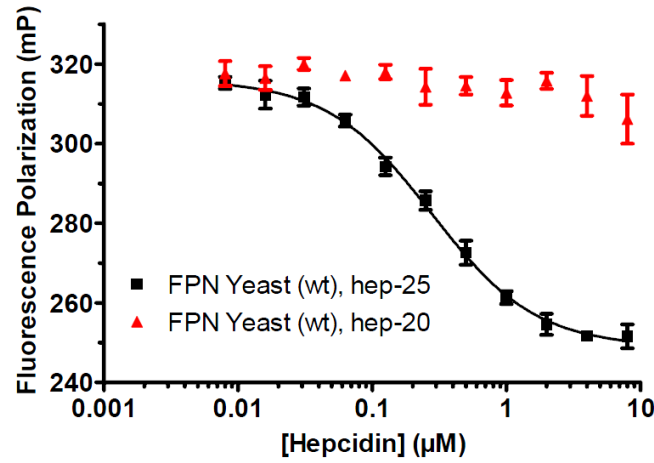


Figura 38. Competizione dose-risposta del legame epcidina/ferroportina. I dosaggi sono stati condotti registrando il segnale di polarizzazione di fluorescenza della M21K-TMR-epcidina-25 dopo incubazione della ferroportina wt con epcidina-25 o -20 non marcata a differenti concentrazioni. La concentrazione di ferroportina utilizzata è pari alla EC_{60} stimata dalle curve di saturazione.

Fpn	TMR-epcidina	EC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ M) SD	K_d (μ M)	K_d (μ M) SD	ΔEC_{50} (mP)	IC_{50} (μ M)	ΔIC_{50} (mP)
WT	25	0,340	0,032	0,395	0,104	212	0,277	70
WT	20	0,755	-	1,083	-	138	> 8	(112)
D39A	25	1,481	0,148	1,904	0,554	173	0,422	13
N174I	25	3,102	0,288	70,8	89,9	195	>8	(~8032)
D181V	25	0,980	195	1,598	0,545	169	0,217	14
Y331F	25	0,860	0,032	3,079	1,785	168	0,203	43
R466M	25	1,327	0,111	2,679	0,936	164	0,578	8
Y501C	25	1,039	0,141	1,834	0,612	184	0,440	7

Tabella 2. Nella tabella sono riportati i valori di concentrazione efficace 50 (EC_{50}), di costante di dissociazione (K_d) e di concentrazione inibente 50 (IC_{50}) calcolati per le proteine indicate (Fpn wt e mutanti) sulla base delle curve di saturazione e dose-risposta. Il ΔEC_{50} e il ΔIC_{50} rappresentano la differenza tra il segnale massimo e minimo di polarizzazione di fluorescenza misurato.

4.4 Espressione e purificazione di ferroportina in *Saccharomyces cerevisiae*

Espressione di omologhi di ferroportina in Saccharomyces cerevisiae

È stato utilizzato il lievito *Saccharomyces cerevisiae* come ulteriore sistema di espressione per la ferroportina. La sequenza codificante ferroportina umana, di ratto e di topo è stata clonata nel vettore pDDEGFP2, sotto il controllo del promotore inducibile GAL1, come prodotto di fusione alla GFP e a un tag molecolare di otto istidine, nel ceppo BJ5460. Questo ha consentito di valutare l'espressione della proteina semplicemente misurando la fluorescenza sia su cellule vitali che su gel di poliacrilammide esposto a radiazioni di opportuna lunghezza d'onda. Altro vantaggio del sistema di espressione della ferroportina fusa alla GFP è stato quello di andare a verificare la qualità della proteina utilizzando cromatografia di esclusione molecolare in fluorescenza (FSEC) prima della purificazione.

Dopo le prime analisi, effettuate su piccola scala, di misurazione della fluorescenza cellulare a seguito di induzione con galattosio e della visualizzazione dei gel di poliacrilammide sugli estratti di membrana grezzi dei trasformanti per i tre omologhi (**Figura 39**), è stata evidenziata assenza di espressione della ferroportina umana che è stata esclusa dagli studi successivi. Le membrane di BJ5460/mFpn e rFpn sono state invece utilizzate per una FSEC e tra i due omologhi, quello di ratto che è risultato il migliore a livello qualitativo (**Figura 40**) è stato scelto per l'espressione su larga scala.

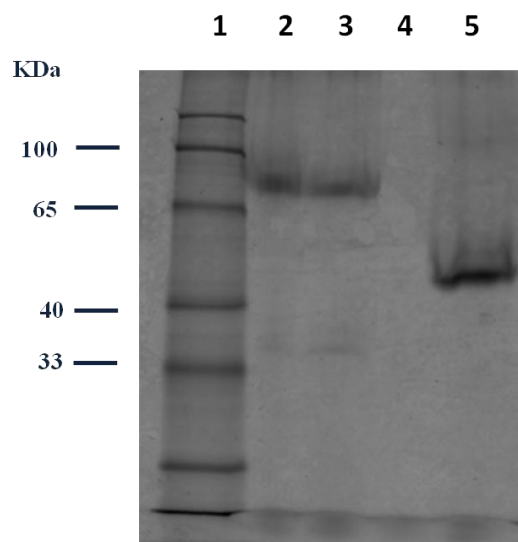


Figura 39. Gel di poliacrilammide al 12% visualizzato in fluorescenza. 1: marker di peso molecolare; 2: membrane da lisi di cellule BJ5460/rFpn; 3: membrane da lisi di cellule BJ5460/mFpn; 4: membrane da lisi di cellule BJ5460/hFpn; 4: controllo positivo.

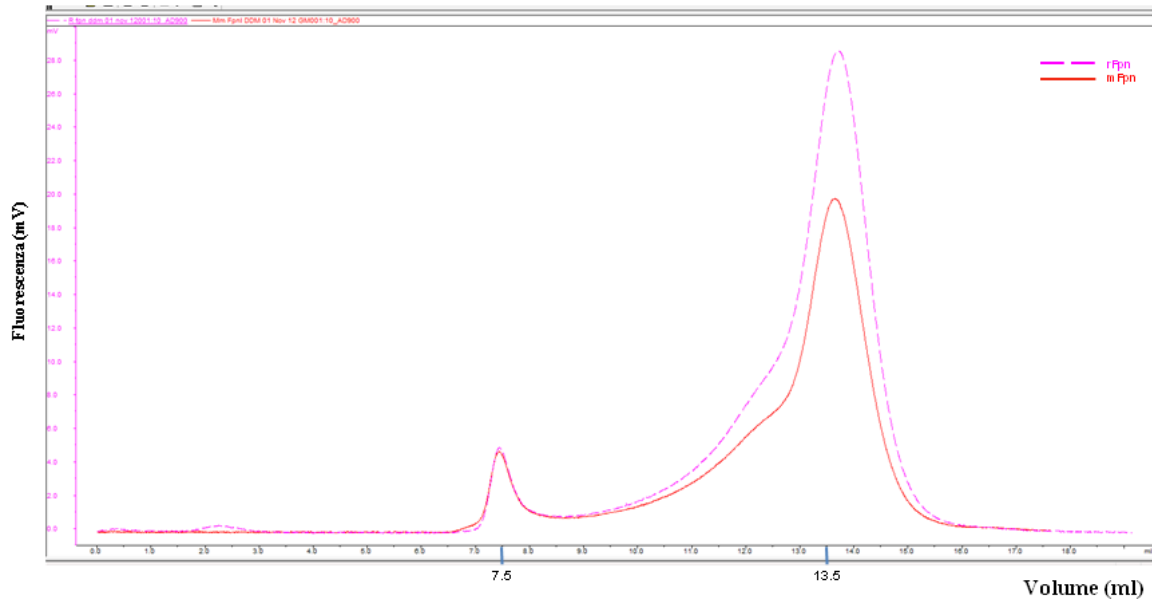


Figura 40. Spettro registrato dall'analisi di cromatografia di esclusione molecolare in fluorescenza, condotta con sistema Akta FPLC (colonna Superose 6 10/300, GE Healthcare), su mFpn e rFpn. Sull'asse delle ordinate è indicato l'assorbimento in fluorescenza registrato durante la cromatografia. Sulle ascisse sono indicati i ml e il numero delle frazioni raccolte. Tampone di corsa: Tris HCl 20 mM/NaCl 150 mM/DDM 0,03%.

*Purificazione di ferroportina di ratto da *Saccharomyces cerevisiae* su larga scala*

La proteina di ratto è stata utilizzata per l'espressione su larga scala. Dieci litri di coltura per volta di BJ5460/rFpn sono stati fatti crescere e sottoposti a induzione con galattosio per l'espressione di ferroportina. Dopo lisi delle cellule e solubilizzazione della proteina in *n*-dodecil β -D-maltoside si è proceduto con la purificazione che in questo caso ha previsto un doppio passaggio di cromatografia di affinità al nichel. Il secondo passaggio è stato fatto per aumentare la purezza della proteina dopo taglio proteolico del tag GFP-8His dal suo C-terminale.

La proteina ottenuta è stata concentrata e sottoposta a un ulteriore passaggio cromatografico di esclusione molecolare su Superdex S200. La ferroportina di ratto eluisce come forma monomerica facendo registrare un picco intorno ai 13 ml (**Figura 41**).

Durante i vari passaggi di preparazione della proteina sono state eseguite letture in fluorescenza (**Tabella 3**) che hanno consentito una valutazione dell'efficienza di solubilizzazione e di legame alla resina al nichel (nel primo passaggio cromatografico) della proteina. Sia l'efficienza di solubilizzazione che di legame alla resina sono state stimate essere di circa il 70%.

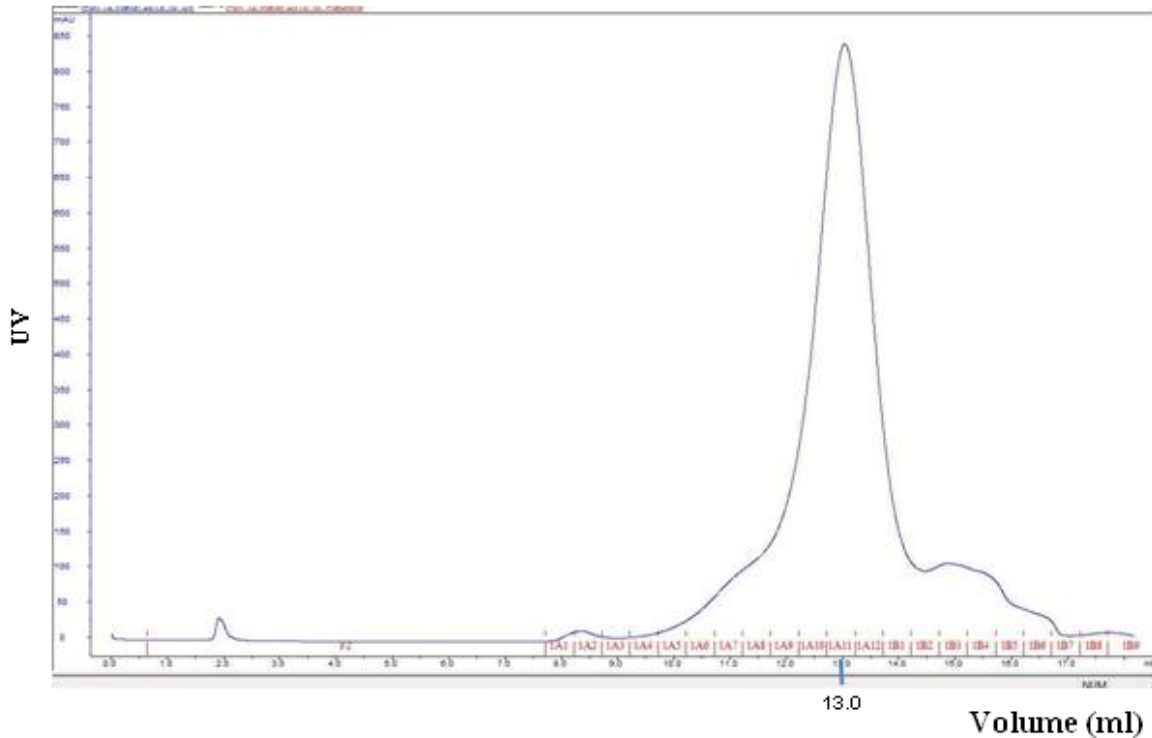


Figura 41. Spettro registrato dall'analisi di cromatografia di esclusione molecolare, condotta con sistema Akta FPLC (colonna Superose 200 10/300, GE Healthcare), su rFpn. Sull'asse delle ordinate è indicato l'assorbimento a 280 nm registrato durante la cromatografia. Sulle ascisse sono indicati i ml e il numero delle frazioni raccolte. Tampone di corsa: Tris HCl 20 mM/NaCl 150 mM/DDM 0,03%.

Dopo l'ultimo passaggio cromatografico, le frazioni evidenziate dal cromatogramma quali contenenti rFpn sono state sottoposte a verifica su gel di poliaccrilammide per l'effettiva presenza della proteina, riunite e concentrate per le successive determinazioni

CAMPIONE	emissione a 512 nm	
solubilizzazione	5000	% di solubilizzazione: 70
surnatante dopo ultracentrifuga post-solubilizzazione	3500	
non ritenuto dopo primo passaggio cromatografico su resina NI-NTA	1000	% di legame alla resina: 70
eluato da cromatografia su resina NI-NTA	15700	

Tabella 3. Letture in fluorescenza ($\lambda_{\text{eccitazione}}$: 488nm; $\lambda_{\text{emissione}}$: 512nm) su vari campioni raccolti durante la solubilizzazione e purificazione di rFpn su larga scala. Le letture sono state condotte su 100 μ l di campione in piastra da microtitolazione.

Valutazione della qualità della proteina purificata da Saccharomyces cereviae: dicroismo circolare

La proteina purificata sottoposta ad analisi di dicroismo circolare ha fatto registrare uno spettro che, come per la varianti preparate con *Pichia pastoris*, è risultato quello di una tipica proteina con ripiegamento ad α -elica (**Figura 42**).

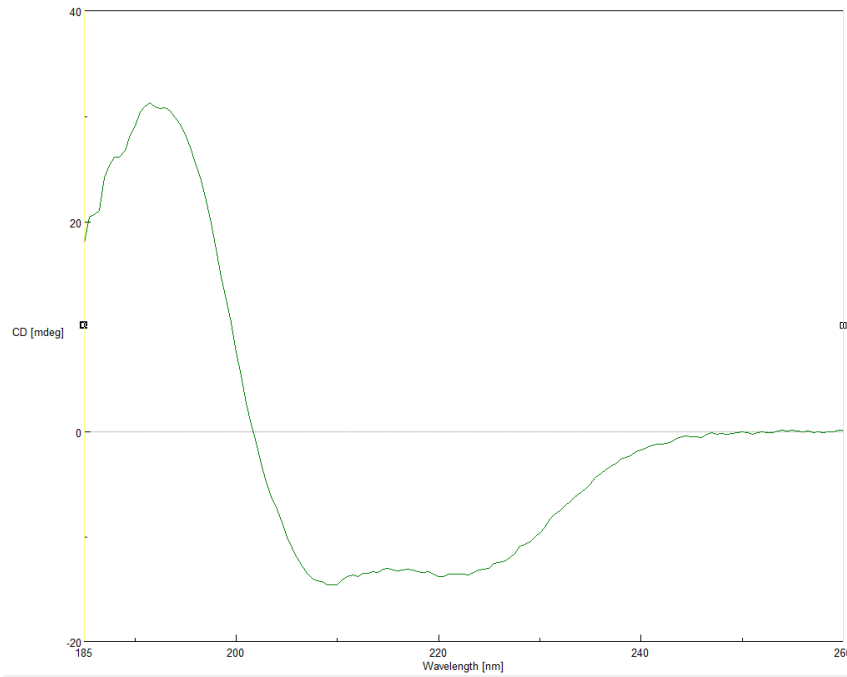


Figura 42. Spettro di dicroismo circolare registrato durante l'analisi di ferroportina wild type di ratto. L'analisi è stata condotta in fosfato di potassio 10 mM a pH 6,5/ Na_2SO_4 50 mM/DDM 0,03%.

In aggiunta, è stata valutata la stabilità termica della Fpn di ratto, attraverso il monitoraggio del segnale di dicroismo a 209 e a 220 nm a differenti temperature, comprese tra 20°C e 85°C registrando il segnale ad incrementi di 2°C (**Figura 43**). Gli spettri registrati mostrano una proteina abbastanza stabile che risente poco dell'innalzamento della temperatura.

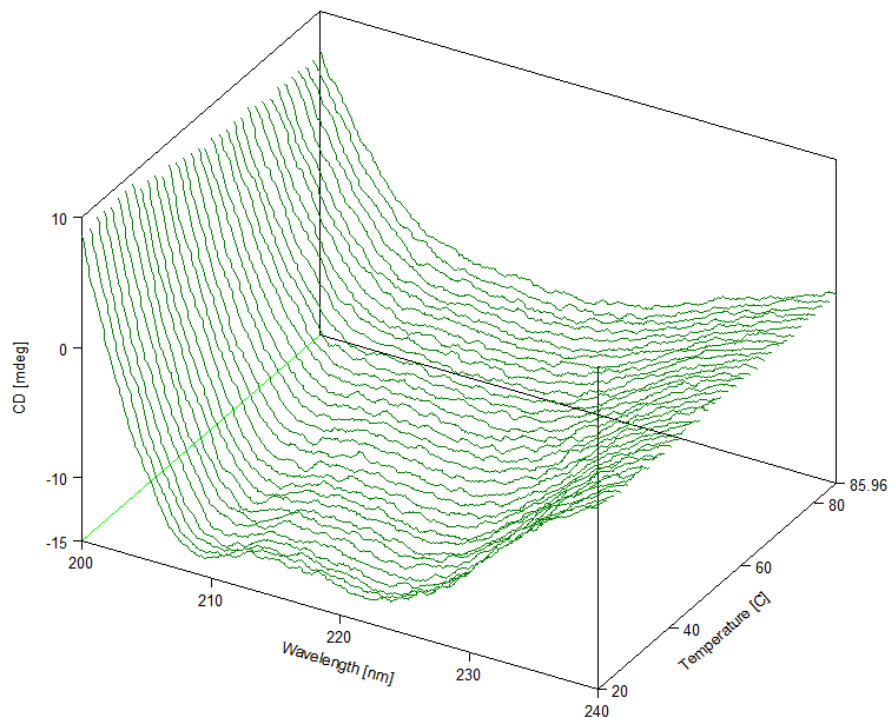


Figura 43. Spettri di dicroismo circolare registrati per ferroportina wild type di ratto. La proteina è stata esposta a differenti temperature, comprese tra 20°C e 85°C e il segnale registrato a ogni incremento di 2°C. L'analisi è stata condotta in fosfato di potassio 10 mM a pH 6,5/Na₂SO₄ 50 mM/DDM 0,03%.

4.5 Prove cristallografiche

Sia la ferroportina umana che la versione di ratto, purificate rispettivamente da *Pichia pastoris* e da *Saccharomyces cerevisiae*, sono state utilizzate per testare differenti condizioni cristallografiche attraverso l'allestimento di piastre da microtitolazione MemGold e MemGold2 (Molecular Dimensions, Ltd). Le proteine purificate sono state portate e utilizzate a differenti concentrazioni e le piastre sono state preparate in duplicato per l'incubazione a 4°C e a 20°C. In aggiunta, la variante di ratto è stata utilizzata anche dopo ricostituzione in fase lipidica cubica in rapporto 40:60 con la monoleina.

Un riassunto delle condizioni utilizzate per i due omologhi è mostrato in **Tabella 4**.

Le piastre vengono attualmente monitorate per valutare l'eventuale formazione di cristalli e per cercare di ottimizzare le condizioni da utilizzare per i futuri screening.

proteina e concentrazione	tipo di piastra	temperatura di incubazione	data
hFpn 3,7mg/ml	MemGold	r.t.	11.12.12
hFpn 10mg/ml	MemGold	r.t.	12.12.12
hFpn 10mg/ml	MemGold	4°C	12.12.12
rFpn 5,7mg/ml	MemGold2	r.t.	18.02.13
rFpn 5,7mg/ml	MemGold2	4°C	18.02.13
rFpn 8,5mg/ml	MemGold	r.t.	21.03.13
rFpn 8,5mg/ml	MemGold	4°C	21.03.13
rFpn 8,5mg/ml	MemGold2	r.t.	21.03.13
rFpn 8,5mg/ml	MemGold2	4°C	21.03.13
rFpn (8,5mg/ml) 40:60 con monoleina	MemGold2	r.t.	12.04.13
rFpn (8,5mg/ml) 40:60 con monoleina	LCPI screen	r.t.	12.04.13

Tabella 4. La tabella riassume le attuali condizioni utilizzate per le analisi di cristallografia.

5. CONCLUSIONI

Ad oggi, mancano in letteratura dati cristallografici su ferroportina e quindi sulla sua effettiva struttura tridimensionale. Qualsiasi nuova acquisizione in materia risulterebbe utile anche ai fini della comprensione del meccanismo molecolare di esporto del ferro da essa mediato e di quello di regolazione a cui è soggetta.

Durante il lavoro di dottorato, quello di tipo bioinformatico è stato il primo approccio utilizzato per la caratterizzazione strutturale di ferroportina. In aggiunta, si è cercato un sistema di espressione volto alla produzione di quantitativi proteici su cui condurre studi di tipo strutturale e funzionale.

L'elaborazione di modelli tridimensionali per proteine di cui non è nota la struttura è ormai una pratica consolidata nel campo della bioinformatica, messa in atto per rispondere all'enorme quantità di informazioni su sequenze nucleotidiche e amminoacidiche derivanti dallo sviluppo delle recenti tecnologie della genomica e della proteomica. Avere a disposizione le coordinate spaziali di una proteina permette di avanzare ipotesi razionali, da verificare sperimentalmente, sul ruolo dei singoli residui presumibilmente coinvolti nella relazione struttura-funzione della proteina in esame.

Le analisi bioinformatiche, condotte su ferroportina, hanno confermato l'appartenenza della proteina alla superfamiglia dei trasportatori MFS, validando le recenti pubblicazioni dei gruppi di Wallace (2010) e di Le Gac (2013). La proteina risulta ripiegata nel doppio strato fosfolipidico in 12 α -eliche transmembrana che si organizzano attorno ad un canale centrale e presenta le estremità N- e C-terminali rivolte verso l'interno della cellula. Analizzando il modello generato, è stato possibile identificare all'interno della cavità una serie di residui putativamente coinvolti nell'interazione con il ferro. A partire da queste osservazioni è stata formulata un'ipotesi sul meccanismo molecolare alla base della traslocazione del metallo attraverso la membrana plasmatica che ha trovato riscontro in sistemi sperimentali *in vitro*.

Durante il dottorato, sono stati anche messi a punto due sistemi eterologhi di espressione per ferroportina, basati sul clonaggio della proteina in ceppi di lievito differenti. Il lievito metilotrofico *Pichia pastoris* è stato utilizzato per la produzione di ferroportina umana, mentre *Saccharomyces cerevisiae* si è prestato bene alla produzione della variante di ratto. Entrambe le proteine vengono purificate con questi sistemi in forma monomerica in un ripiegamento, in termini di struttura secondaria, che rispetta le previsioni fatte finora su

ferroportina. Tra le due, la forma umana ha anche mostrato una buona risposta ai saggi di legame, condotti sia con il suo regolatore ormonale, l'epcidina, che con il substrato di cui media l'esporto, il ferro, evidenziando la produzione di una proteina che sicuramente mantiene in buona parte la sua funzionalità.

Riuscire a produrre e purificare Fpn rappresenta il punto di partenza obbligato per una sua caratterizzazione strutturale e funzionale: attualmente, si stanno portando avanti screening di cristallizzazione su entrambe le varianti proteiche ed è prevista la messa a punto di dosaggi per la valutazione del trasporto del ferro.

Appare ovvia la rilevanza che potrebbe avere la messa in luce della struttura di ferroportina e del suo esatto meccanismo di azione ai fini della comprensione della "patologia da ferroportina". Oltre che fornire una spiegazione ai differenti fenotipi patologici evidenziati in soggetti affetti da emocromatosi di tipo 4, si potrebbe puntare alla progettazione di nuove e più mirate strategie terapeutiche.

Bibliografia

Abboud, S. & Haile, D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **275**, 19906–19912

Aisen, P. (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2137–2143

Anderson, G. J. & Vulpe, C. D. (2009) Mammalian iron transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 3241-3261

Auriac, A. Willemetz, A. Canonne-Hergaux, F. (2010) Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica*, **95**, 1269–1277

Baker, H.M. Anderson, B.F. & Baker, E.N. (2003) Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 3579-3583

Bonaccorsi di Patti, M. C. Persichini, T. Mazzone, V. Polticelli, F. Colasanti, M. & Musci, G. (2004) Interleukin-1beta up-regulates iron efflux in rat C6 glioma cells through modulation of ceruloplasmin and ferroportin-1 synthesis. *Neurosci Lett*, **363**, 182-186

Camaschella, C. (2013) Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **1**, 1-8

Canonne-Hergaux, F. Donovan, A. Delaby, C. Wang, H. Gros, P. (2006) Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**, G156- G163

Camaschella, C. Roetto, A. Calì, A. De Gobbi, M. Garozzo, G. Carella, M. Majorano, N. Totaro, A. Gasparini, P. (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*, **25**, 14-15

Cau, M. Melis, M. A. Congiu, R. Galanello, R. (2010) Iron-deficiency anemia secondary to mutations in genes controlling hepcidin. *Expert Rev Hematol*, **3**, 205-16

Chua, A. C. Graham, R. M. Trinder, D. Olynyk, J. K. (2007) The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **44**, 413–459

Courville, P. Chaloupka, R. Cellier, M.F. (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem Cell Biol*, **84**, 960–978

Cremonesi, L. Forni, G. L. Soriani, N. Lamagna, M. Fermo, I. Daraio, F. Galli, A. Pietra, D. Malcovati, L. Ferrari, M. Camaschella, C. & Cazzola, M. (2005) Genetic and clinical heterogeneity of ferroportin disease. *Brit J Haematol*, **131**, 663-670

Dancis, A. Klausner, R. D. Hinnebusch, A. G. Barriocanal, J. G. (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 2294–2301

Dang, S. Sun, L. Huang, Y. Lu, F. Liu, Y. Gong, H. Wang, J. Yan, N. (2010) Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*, **467**, 734-738

De Domenico, I. McVey Ward, D. Nemeth, E. Vaughn, M. B. Musci, G. Ganz, T. & Kaplan, J. (2005) The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Nat Acad Sci USA*, **102**, 8955–8960

De Domenico, I. McVey Ward, D. Nemeth, E. Ganz, T. Corradini, E. Ferrara, F. Musci, G. Pietrangelo, A. & Kaplan, J. (2006) Molecular and clinical correlates in iron overload associated with mutations in ferroportin. *Haematologica*, **91**, 1092-1095

De Domenico, I. McVey Ward, D. Musci, G. Kaplan, J. (2007a) Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood*, **109**, 2205–2209

De Domenico, I. McVey Ward, D. di Patti, M.C. Jeong, S. Y. David, S. Musci, G. Kaplan, J. (2007b) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J*, **26**, 2823–2831

De Domenico, I. McVey Ward, D. Langelier, C. Vaughn, M. B. Nemeth, E. Sundquist, W. I. Ganz, T. Musci, G. Kaplan, J. (2007c) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin downregulation. *Mol Biol Cell*, **18**, 2569–2578

De Domenico, I. McVey Ward, D. and Kaplan, J. (2008) Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 72-81

Delaby, C. Pilard, N. Puy, H. Canonne-Hergaux, F. (2008) Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochem J*, **411**, 123-131

Detiveaud, L. Island, M.L. Jouanolle, A.M. Ropert, M. Bardou-Jaquet, E. Le Lan, C. Mosser, A. Leroyer, P. Deugnier, Y. David, V. Brissot, P. & Loreal, O. (2013) Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mut*, **34**, 1529-1536

Drew, D. Newstead, S. Sonoda, Y. Kim, H. von Heijne, G. & Iwata, S. (2008) GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat protoc*, **3**, 784 -798

Donovan, A. Brownlie, A. Zhou, Y. Shepard, J. Pratt, S. J. Moynihan, J. Paw, B. H. Drejer, A. Barut, B. Zapata, A. Law, T. C. Brugnara, C. Lux, S. E. Pinkus, G. S. Pinkus, J. L. Kingsley, P. D. Palis, J. Fleming, M. D. Andrews, N. C. Zon, L. I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776–781

Dürrenberger, F. Abbate, V. Ma, Y. Arno, M. C. Jaiash, D. Parmar, A. Marshall, V. Latunde-Dada, G. O. Zimmermann, T. Senn, D. Altermatt, P. Manolova, V. Hider, R. C. & Bansal, S. S. (2013) Functional Characterization of Fluorescent Hepcidin. *Bioconjugate Chem*, **24**, 1527–1532

Du, X. She, E. Gelbart, T. Truksa, J. Lee, P. Xia, Y. Khovananth, K. Mudd, S. Mann, N. Moresco, E. M. Beutler, E. Beutler, B. (2008) The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, **320**, 1088-1092

Fairweather-Tait, S. J. (2004) Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proc Nutr Socb*, **63**, 519–528

Feder, J. N. Gnirke, A. Thomas, W. Tsuchihashi, Z. Ruddy, D. A. Basava, A. Dormishian, F. Domingo, R. Jr Ellis, M. C. Fullan, A. Hinton, L. M. Jones, N. L. Kimmel, B. E. Kronmal, G. S. Lauer, P. Lee, V. K. Loeb, D. B. Mapa, F. A. McClelland, E. Meyer, N. C. Mintier, G.A. Moeller, N. Moore, T. Morikang, E. Prass, C. E. Quintana, L. Starnes, S. M. Schatzman, R. C. Brunke, K. J. Drayna, D. T. Risch, N. J. Bacon, B. R. Wolff, R. K. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet*, **13**, 399–408

Feder, J. N. Gnirke, A. Thomas, W. Tsuchihashi, Z. Ruddy, D. A. Basava, A. (2003) The discovery of the new haemochromatosis gene. 1996. *J Hepatol*, **38**, 704-9

Fernandes, A. Preza, G. C. Phung, Y. De Domenico, I. Kaplan, J. Ganz, T. Nemeth, E. (2009) The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*, **114**, 437–443

Finberg, K. E. Heeney, M. M. Campagna, D. R. Aydinok, Y. Pearson, H. A. Hartman, K. R. Mayo, M. M. Samuel, S. M. Strouse, J. J. Markianos, K. Andrews, N. C. Fleming, M. D. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) (2008) *Nat Genet*, **40**, 569–571

Ganz, T. (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*, **93**, 1721–1741

Girelli, D. De Domenico, I. Bozzini, C. Campostrini, N. Busti, F. Castagna, A. Soriani, N. Cremonesi, L. Ferrari, M. Colombari, R. McVey Ward, D. Kaplan, J. Corrocher, R. (2008) Clinical, pathological, and molecular correlates in ferroportin disease: a study of two novel mutations. *J Hepatol*, **49**, 664-671

Gonçalves, A. S. Muzeau, F. Blaybel, R. Hetet, G. Driss, F. Delaby, C. Canonne-Hergaux, F. Beaumont, C. (2006) Wild-type and mutant ferroportins do not form oligomers in transfected cells. *Biochem J*, **396**, 265-275

Guan, L. Mirza, O. Verner, G. Iwata, S. Kaback, H. R. (2007) Structural determination of wild-type lactose permease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 15294-15298

Gunshin, H. Mackenzie, B. Berger, U. V. Gunshin, Y. Romero, M. F. Boron, W. F. Nussberger, S. Gollan, J. L. Hediger, M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488

Hider, R. C. (2002) Nature of nontransferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest*, **32**, 50-54

Holmberg, C. G. & Laurell, C. B. (1947) Investigations in serum copper; nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem Scand*, **1**, 944-50

Huang, Y. Lemieux, M. J. Song, J. Auer, M. Wang, D. N. (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 616-620

Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, **211**, 969-70

Jeong, S. Y. & David, S. (2003) Glycosylphosphatidylinositol anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem*, **278**, 27144-27148

Johnson, M. B. Chen, J. Murchison, N. Green, F. A. Enns, C. A. (2007) Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Mol Biol Cell*, **18**, 743-754

Khafizov, K. Staritzbichler, R. Stamm, M. Forrest, L. R. (2010) A Study of the Evolution of Inverted-Topology Repeats from LeuT-Fold Transporters Using AlignMe. *Biochemistry*, **49**, 10702-10713

Kovaleva, E. G. & Lipscomb, J. D. (2008) Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nat Chem Biol*, **4**, 186-193

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685

Laskowski, R. MacArthur, M. Moss, D. & Thornton, J. (1993) PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**, 283-291

Law, C. J. Maloney, P. C. & Wang D. N. (2008) Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annu Rev Microbiol*, **62**, 289–305

Lawrence, C. M. Ray, S. Babyonyshev, M. Galluser, R. Borhani, D. W. Harrison, S. C. (1999) Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science*, **286**, 779–782

Le Gac, G. Ka, C. Joubrel, R. Gourlaouen, I. Lehn, P. Mornon, J.P. Ferec, C. & Callebaut, I. (2013) Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 mutations and identification of critical residues. *Hum Mut* **34**, 1371-1380

Letocart, E. Le Gac, G. Majore, S. Ka, C. Radio, F. C. Gourlaouen, I. De Bernardo, C. Ferec, C. & Grammatico, P. (2009) A novel missense mutation in SLC40A1 results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases. *Brit J Haematol*, **147**, 379-385

Levy, J. E. Jin, O. Fujiwara, Y. Kuo, F. Andrews, N. C. (1999) Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*, **21**, 396–399

Liu, X. B. Yang, F. Haile, D. J. (2005) Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 33-46

Mayr, R. Griffiths, W. J. H. Hermann, M. McFarlane, I. Halsall, D. J. Finkestedt, A. Douds A. Davies, S. E. Janecke, A. R. Vogel, W. Cox, T. M. & Zoller, H. (2011) Identification of mutations in SLC40A1 that affect ferroportin function and phenotype of human ferroportin iron overload. *Gastroenterology*, **140**, 2056-2063

Mayr, R. Janecke, A. R. Schranz, M. Griffiths, W. J. H. Vogel, W. Pietrangelo, A. & Zoller, H. (2010) Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol*, **53**, 941-949

McArdle, H. J. Andersen, H. S. Jones, H. Gambling, L. (2008) Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions. *J Neuroendocrinol*, **20**, 427–431

McKie, A. T. Marciani, P. Rolfs, A. Brennan, K. Wehr, K. Barrow, D. Miret, S. Bomford, A. Peters, T. J. Farzaneh, F. Hediger, M.A. Hentze, M.W. Simpson, R.J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, **5**, 299–309

Montosi, G. Donovan, A. Totaro, A. Garuti, C. Pignatti, E. Cassanelli, S. Trenor, C. C. Gasparini, P. Andrews, N. C. Pietrangelo, A. (2001) Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (*SLC11A3*) gene. *J Clin Invest*, **108**, 619-623

Napier, I. Ponka, P. Richardson, D. R. (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*, **105**, 1867–1874

Nemeth, E. Tuttle, M. S. Powelson, J. Vaughn, M. B. Donovan, A. McVey Ward, D. Ganz, T. Kaplan, J. (2004) Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, **306**, 2090-2093

Nevo, Y. (2008) Site-directed mutagenesis investigation of coupling properties of metal ion transport by DCT1. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 334–341

Newstead, S. Kim, H. von Heijne, G. Iwata, S. and Drew, D. (2007) High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, **104**, 13936–13941

Njajou, O. T. Vaessen, N. Joosse, M. Berghuis, B. van Dongen, J. W. Breuning, M. H. Snijders, P. J. Rutten, W. P. Sandkuijl, L. A. Oostra, B. A. van Duijn, C. M. Heutink, P. (2001) A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet*, **28**, 213-214

Papanikolaou, G. Samuels, M. E. Ludwig, E. H. MacDonald, M. L. Franchini, P. L. Dubé, M. P. Andres, L. MacFarlane, J. Sakellaropoulos, N. Politou, M. Nemeth, E. Thompson, J. Risler, J. K. Zaborowska, C. Babakaiff, R. Radomski, C. C. Pape, T. D. Davidas, O. Christakis, J. Brissot, P. Lockitch, G. Ganz, T. Hayden, M. R. Goldberg, Y. P. (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, **36**, 77-82

Paradkar, P. N. Zumbrennen, K. B. Paw, B. H. McVey Ward, D. Kaplan, J. (2009) Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol*, **29**, 1007–1016

Petrey, D. Xiang, Z. Tang, C. L. Xie, L. Gimpelev, M. Mitros, T. Soto, C. S. Goldsmith-Fischman, S. Kernytsky, A. Schlessinger, A. Koh, I. Y. Alexov, E. Honig, B. (2003) Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins*, **53**, 333–595

Pettersen, E. F. Goddard, T. D. Huang, C. C. Couch, G.S. Greenblatt, D. M. Meng, E. C. Ferrin T. E. (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605-12

Philpott, C. C. & Protchenko, O. (2008) Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **7**, 20–27

Pietrangelo, A. (2004) *Blood Cells Mol Dis*, **32**, 131–138

Pignatti, E. Mascheroni, L. Sabelli, M. Barelli, S. Biffo, S. Pietrangelo, A. (2005) Ferroportin is a monomer in vivo in mice. *Blood Cells Mol Dis*, **36**, 26-32

Preza, G. C. Ruchala, P. Pinon, R. Ramos, E. Qiao, B. Peralta, M. A. Sharma, S. Waring, A. Ganz, T. Nemeth, E. (2011) Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest*, **121**, 4880–4888

Qiao, B. Sugianto, P. Fung, E. Del-Castillo-Rueda, A. Moran-Jimenez, M. J. Ganz, T. Nemeth, E. (2012) Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab*, **15**, 918–924

Rice, A. E. Mendez, M. J. Hokanson, C. A. Rees, D. C. Bjorkman, P. J. (2009) Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *J Mol Biol*, **386**, 717–732

Roetto, A. Daraio, F. Alberti, F. Porporato, P. Cali, A. De Gobbi, M. Camaschella, C. (2002) Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2. *Blood Cells Mol Dis*, **29**, 465–470

Roetto, A. Papanikolaou, G. Politou, M. Alberti, F. Girelli, D. Christakis, J. Loukopoulos D. & Camaschella C. (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, **33**, 21 – 22

Roy, A. Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat Protoc*, **5**, 725–738

Ross, S. L. Tran, L. Winters, A. Lee, K. J. Plewa, C. Foltz, I. King, C. Miranda, L. P. Allen, J. Beckman, H. Cooke, K. S. Moody, G. Sasu, B. J. Nemeth, E. Ganz, T. Molineux, G. Arvedson, T. L. (2012) Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab*, **15**, 905–917

Rouault, T. A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*, **2**, 406-414

Rutherford, J. C. & Bird, A. J. (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, **3**, 1-13

Sarramegna, V. Talmont, F. Sere de Roch, M. Milon, A. Demange, P. (2002) Green fluorescent protein as a reporter of human mu-opioid receptor overexpression and localization in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, **99**, 23-39

Schimanski, L. M. Drakesmith, H. Merryweather-Clarke, A. T. Viprakasit, V. Edwards, J. P. Sweetland, E. Bastin, J. M. Cowley, D. Chinthammitr, Y. Robson, K. J. H. & Townsend, A. R. M. (2005) In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis associated FPN mutations. *Blood*, **105**, 4096-4102

Sham, R. L. Phatak, P. D. Nemeth, E. Ganz, T. (2009) Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood*, **114**, 493–494

Sheftela, A. D. Masonb, A. B. & Ponkac, P. (2012) The Long History of Iron in the Universe and in Health and Disease. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 161–187

Shukla, A. K. Haase, W. Reinhart, C. Michel, H. (2007) Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 931-42

Wallace, D. F., Clark, R. M., Harley, H. A. & Subramaniam, V. N. (2004) *J Hepatol* **40**, 710–713

Waterhouse, A. M. Procter, J. B. Martin, D. M. A. Clamp, M. & Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, **25**, 1189-1191

Weyand, S. Shimamura, T. Beckstein, O. Sansom, M. S. Iwata, S. Henderson, P. J. Cameron, A. D. (2010) The alternating access mechanism of transport as observed in the sodiumhydanoin transporter Mhp1. *J Synchrotron Radiat*, **18**, 20-23

Wu, S. & Letchworth, G. J. (2004) High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, **36**, 152-154

Yan, H. Huang, W. Yan, C. Gong, X. Jiang, S. Zhao, Y. Wang, J. and Shi, Y. (2013) Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Rep*, **3**, 716–723

Yeh, K. Y. Yeh, M. Watkins, J. A. Rodriguez-Paris, J. Glass, J. (2000) Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol*, **279**, G1070–G1079

Zimmermann, M. B. & Hurrell, R. F. (2007) Nutritional iron deficiency. *Lancet*, **370**, 511–520