



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA**

**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**

**Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA – CICLO XXIII**

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-10**

**MOLECULAR GENETICS OF FAMILIAL TUBULOPATHIES:  
Claudin-16 and Claudin-19 Mutations in Familial Hypomagnesemia,  
Hypercalciuria, and Nephrocalcinosis**

Dottorando: Dott.ssa Sara Missaglia  
Matricola: 716473

Coordinatore: Prof. Enzo Wanke  
Tutor: Prof. Paolo Tortora

Anno Accademico 2009/2010

ai miei genitori, i miei  
fratelli e Simona

# INDICE

<b>Riassunto</b>	<b>5</b>
<b>Abbreviazioni</b>	<b>7</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>9</b>
1.1 Tight junctions	9
1.2 Claudine nel rene	13
1.2.1 Riassorbimento del magnesio	16
1.3 Claudina-16	18
1.4 Claudina-19	25
1.5 Principali patologie tubulo-renali	28
1.6 Ipomagnesemia ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare	31
1.7 Scopo della tesi	38
<b>2. Materiali e Metodi</b>	<b>40</b>
2.1 Famiglie e pazienti	40
2.2 Isolamento di acidi nucleici e proteine totali da sangue	40
2.2.1 Estrazione di DNA genomico da sangue intero	40
2.2.2 Isolamento di linfociti da sangue intero con Histopaque®-1077 ed estrazione di RNA con TRIzol® Reagent	40
2.3 Quantificazione e stima della purezza degli acidi nucleici	41
2.4 PCR e RT-PCR	42
2.4.1 Reazioni di PCR	42
2.4.2 Retrotrascrizione di RNA totale estratto da linfociti e fibroblasti	42
2.5 Amplificazione dei frammenti genomici e del cDNA	43
2.6 Digestione enzimatica	46
2.7 Analisi elettroforetica degli acidi nucleici	47
2.8 Purificazione degli amplificati e sequenziamento del DNA	47
2.9 Clonaggio	48
2.10 Purificazione del plasmide	49
2.11 Mutagenesi sito-diretta	50
2.12 Banche dati elettroniche	53

<b>3. Risultati</b>	<b>54</b>
3.1 Raccolta di materiale genetico da pazienti affetti da FHHNC	54
3.2 Quadro clinico dei pazienti studiati	58
3.3 Analisi mutazionale del gene CLDN16	61
3.3.1 Mutazione Arg149X	61
3.3.2 Mutazione Leu151Phe	64
3.3.3 Mutazione Ser110Arg	64
3.3.4 Mutazione Asn123fs	64
3.3.5 Mutazione Leu145Pro	66
3.3.6 Nuove mutazioni e nuove variazioni identificate	66
3.4 Analisi mutazionale del gene CLDN19	70
3.4.1 Mutazione Gly20Asp	70
3.4.2 Delezione del gene CLDN19	72
3.4.3 Una nuova variazione del gene CLDN19	74
3.5 Predizione dei tratti transmembrana di claudina-16 e claudina-19	78
3.6 Espressione della claudina-16 in cellule tumorali del seno	82
<b>4. Discussione</b>	<b>85</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>92</b>

## RIASSUNTO

L'ipomagnesemia, ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare (FHHNC; OMIM 248250) è una tubulopatia renale rara a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da perdita della funzione di riassorbimento del magnesio, ipercalciuria, nefrocalcinosi, formazione di calcoli renali, ricorrenti infezioni renali e progressiva insufficienza renale (i pazienti sono candidati a trapianto renale). I pazienti sono anche soggetti a spasmi muscolari, convulsioni e anomalie oculari. Sono inoltre stati osservati alti livelli dell'ormone paratiroideo (PTH) nel corso della malattia. Fino ad oggi la FHHNC è stata diagnosticata in circa 200 individui sparsi in tutto il mondo.

Nelle famiglie FHHNC finora indagate la sindrome cosegrega con mutazioni nei geni CLDN16 e CLDN19. Questi due geni codificano per due proteine appartenenti alla famiglia delle claudine, le claudine 16 e 19, espresse nelle tight junctions nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. Attualmente si hanno poche informazioni sulla struttura e funzione di queste due proteine. È stato però ipotizzato che, interagendo tra loro, formerebbero dei pori attraverso cui passerebbe il magnesio secondo gradiente elettrochimico.

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di (1) espandere lo spettro delle mutazioni nei geni CLDN16 e CLDN19 nelle famiglie FHHNC e indagare la loro distribuzione all'interno di popolazioni differenti e diverse aree geografiche, (2) cercare di stabilire una correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti dalla patologia e contribuire all'analisi della relazione struttura-funzione delle claudine 16 e 19, (3) identificare altri eventuali geni coinvolti nell'insorgenza della FHHNC, (4) e, poiché recenti studi hanno associato la sovraespressione di CLDN16 con una diminuzione dell'aggressività del carcinoma al seno, indagare se le mutazioni in CLDN16 identificate come causa dell'insorgenza della FHHNC possano influire sulle eventuali capacità antitumorali della proteina.

Lo studio presentato in questa tesi di dottorato è stato condotto su 27 famiglie FHHNC non consanguinee, per un totale di 33 pazienti sottoposti ad analisi genetica. Per ciascuno di questi pazienti e per alcuni parenti sani abbiamo raccolto campioni di sangue dai quali sono stati estratti DNA, RNA totale e proteine.

Per ciascuno dei 33 pazienti FHHNC l'analisi genetica è iniziata con il sequenziamento diretto dell'intera regione codificante e dei siti di regolazione dello *splicing* del gene CLDN16. In 12 pazienti abbiamo identificato complessivamente tre nuove mutazioni non senso (R214X, W217X, Y213X), quattro nuove variazioni presumibilmente associabili all'insorgenza della malattia (L116F, C120Y, G239V, E294K) e cinque mutazioni già precedentemente descritte (S110R, N123fs, L145P, R149X, L151F).

Per i 21 pazienti FHHNC, risultati negativi per mutazioni nel gene CLDN16, la caratterizzazione molecolare è proseguita con l'analisi della sequenza codificante e dei siti di regolazione dello *splicing* del gene CLDN19. In 12 pazienti abbiamo identificato complessivamente una mutazione già descritta in precedenza (G20D) e una delezione che interessa gli esoni 1-4 del gene (è il primo caso noto di delezione quasi totale del gene CLDN19).

Risultano tuttora in corso la caratterizzazione molecolare di 9 pazienti per i quali non sono state identificate mutazioni associabili all'insorgenza della malattia nei geni CLDN16 e CLDN19 e le analisi per valutare se mutazioni che comportano una completa o parziale scomparsa della funzione di claudina-16 nel rene possano causare anche diminuzione o scomparsa della sua ipotetica capacità antitumorale nelle cellule di tumori del seno.

I risultati di questo lavoro espandono lo spettro delle mutazioni patogenetiche di CLDN16 e CLDN19 nei pazienti FHHNC, contribuendo a fornire informazioni relative alla patogenesi della sindrome e allo studio della relazione struttura-funzione nelle claudine 16 e 19. Saranno tuttavia necessari ulteriori approfondimenti sperimentali per comprendere meglio l'effetto di ciascuna mutazione sulla funzionalità delle due proteine.

## ABBREVIAZIONI

ADH	Antidiuretic hormone
BSND	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness
CaSR	Calcium-sensing receptor
ClCKb	Chloride channel protein
CLDN16	Claudin-16
CLDN19	Claudin-19
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
FHHNC	Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
KCNJ1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1
Na/K	pompa sodio/potassio
NKCC	Na-K-Cl cotransporter
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	PSD-95/ discs-large and zona occludens-1
pERK	endoplasmic reticulum-resident protein kinase
PKA	Protein Kinase A
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
SLC12A1	solute carrier family 12, member 1
TAE	Tris-Acetate-EDTA

TBE

Tris-Borate-EDTA

TRPM6

transient receptor potential cation channel M6

VASP

vasodilator-stimulated phosphoprotein

ZO-1

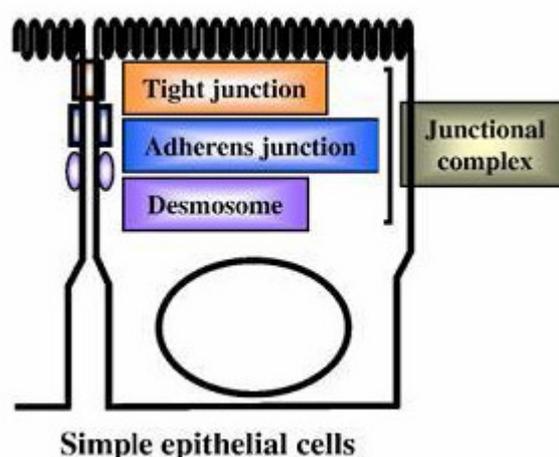
Zona Occludens-1

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Tight junctions

Una giunzione cellulare è una specializzazione del lembo di membrana che rende possibile controllare i processi di adesione tra cellule. Tali processi sono anche resi possibili dalla struttura di rivestimento esterno adesa al versante extracellulare del plasmalemma detta glicocalice. Nei vertebrati, a livello funzionale si distinguono tre tipi di giunzioni cellulari (Figura 1):

- Giunzioni occludenti (tight junctions o zonulae occludentes)
- Giunzioni comunicanti (gap junctions)
- Giunzioni aderenti o di ancoraggio (anchoring junctions o zonulae adherentes)

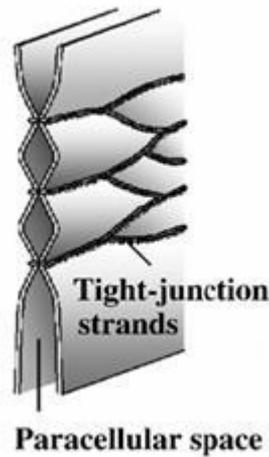


**Figura 1:** Schematizzazione dei complessi giunzionali (Chiba et al, 2008)

Le tight junctions (o zonula occludens o giunzioni occludenti) formano una cintura continua attorno alle cellule che rivestono le cavità corporee. Esse saldano insieme le cellule ed impediscono il passaggio dei liquidi tra la cavità corporea e le cellule sottostanti. Sono presenti in modo particolare negli epitelii di rivestimento dell'apparato digerente e tra le cellule delle pareti dei capillari in localizzazioni particolari, come il cervello e il testicolo dove impediscono che il sangue si mescoli ai fluidi extracellulari.

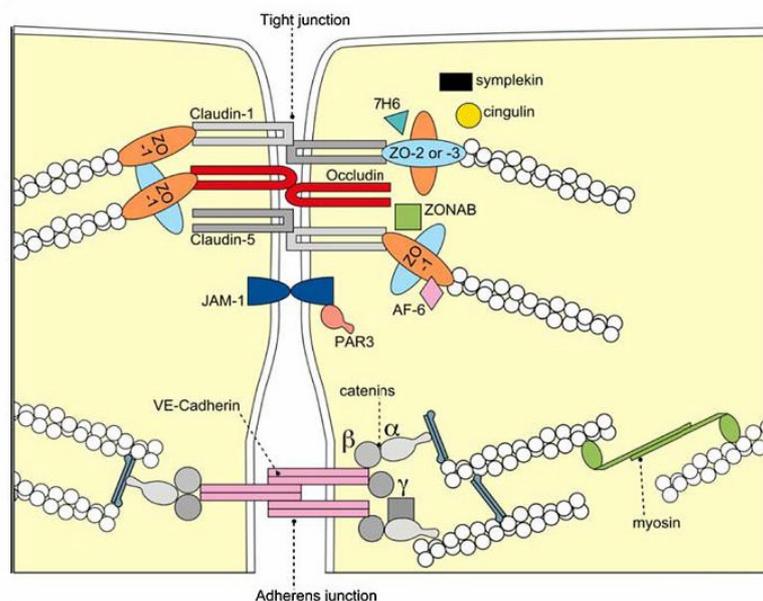
Nella regione interessata da una tight junction, gli emistrati esterni delle due membrane plasmatiche che costituiscono la giunzione si fondono tra loro lungo una linea di coniugazione netta. La fusione in corrispondenza delle linee di coniugazione elimina lo spazio extracellulare e contribuisce a rendere impermeabile la giunzione al passaggio dei liquidi extracellulari e di ioni e

molecole in soluzione (Figura 2). Quanto le tight junctions eliminino lo spazio extracellulare dipende dal numero dei filamenti sigillanti paralleli: maggiore è il numero dei filamenti sigillanti, migliore è la sigillatura. I filamenti sigillanti costituiscono una barriera che impedisce anche il movimento laterale delle proteine e dei lipidi all'interno della membrana. La mobilità delle proteine integrali di membrana viene completamente bloccata dai filamenti sigillanti. Il blocco della mobilità dei lipidi riguarda solo l'emistrato esterno della membrana; i lipidi contenuti nell'emistrato rivolto verso il citoplasma sottostante possono muoversi liberamente in direzione laterale.



**Figura 2:** Struttura schematizzata delle tight junctions (Chiba et al, 2008)

Due differenti classi di proteine integrali di membrane costituiscono le tight junctions: le occludine e i membri della famiglia delle claudine. Inoltre, associate a queste giunzioni, ci sono molecole che regolano diversi processi fisiologici quali la proliferazione e la polarità cellulare (Figura 3).



**Figura 3:** Componenti molecolari delle tight junctions (Förster, 2008)

Strutturalmente le occludine presentano due loops extracellulari, un piccolo dominio intracellulare, un dominio N- e C-terminale citoplasmatici. Il primo loop citoplasmatico è ricco in tirosine e glicine, mentre il dominio C-terminale è ricco in serine, treonine e tirosine che sono frequentemente fosforilate da varie protein chinasi. Inoltre, il dominio C-terminale lega direttamente la proteina ZO-1 (Zona Occludens 1) che a sua volta interagisce con l'actina presente nel citoscheletro (Chiba et al, 2008). Da diversi esperimenti condotti su cellule di topo (Chiba et al, 2008; Förster, 2008 ), appare chiaro che le occludine non possono formare da sole le tight junctions. La formazione di queste giunzioni dipende dall'interazione delle occludine con le claudine.

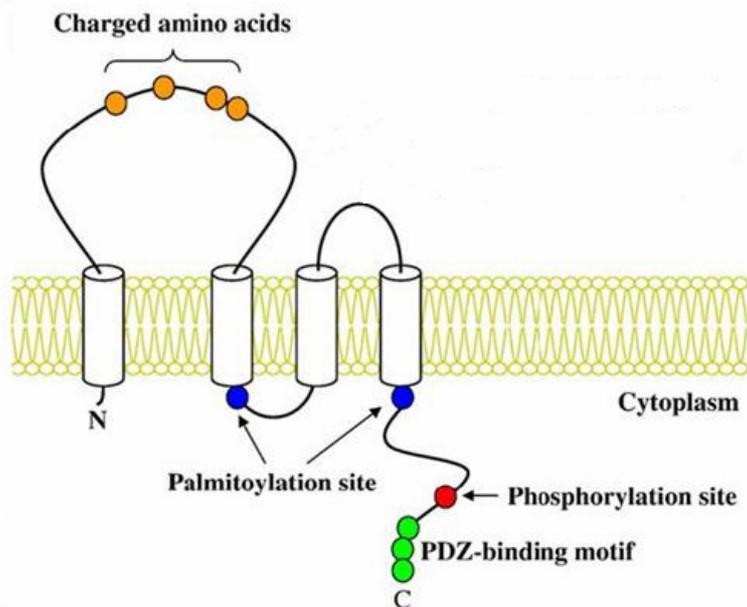
La famiglia delle claudine umane è composta da 24 membri compresi tra i 22 e i 34 kDa che a livello delle tight junctions giocano un ruolo importante nella regolazione della permeabilità paracellulare e mantengono la polarità nelle cellule endoteliali e epiteliali (Lal-Nag et al, 2009).

Non è chiaro l'esatto meccanismo di evoluzione delle claudine nei mammiferi ma molti dati suggeriscono che questa famiglia multigenica si sia espansa attraverso duplicazione genica. Infatti esiste un'alta omologia tra le proteine della famiglia delle claudine codificate dai geni CLDN presenti nei genomi di diversi mammiferi.

In generale, i geni che codificano per le claudine contengono pochi introni e sono quindi molto piccoli. Inoltre, molti di questi geni, che sono vicini tra loro nel genoma umano, sono molto simili sia nella sequenza sia negli arrangiamenti introni/esoni, come per esempio il gene della claudina 6 e quello della claudina 9, che si trovano sul cromosoma 16 e sono distanziati da solo 200 bp. Queste caratteristiche suggeriscono un meccanismo di duplicazione genica alla base dell'evoluzione di molte di queste proteine.

Le claudine mostrano notevoli similarità di sequenza e l'analisi filogenetica delle claudine umane dimostra una stretta relazione tra le sequenze di alcune di esse, come per esempio la claudina 6 e 9, mentre altre appaiono filogeneticamente più distanti.

Queste proteine presentano un piccolo dominio N-terminale citoplasmatico, due loops extracellulari e un dominio C-terminale citoplasmatico. Il primo loop extracellulare presenta dei residui amminoacidici GLWxxC(8-10aa)C altamente conservati che caratterizzano tutti i membri appartenenti alla famiglia delle claudine, mentre il C-terminale contiene un dominio PDZ (PSD-95/discs-large and zona occludens-1) necessario per l'interazione con diverse proteine (Chiba et al, 2008; Lal-Nag et al, 2009). Inoltre questo dominio sembra influenzare la stabilità di queste proteine, alterandone il turnover e modificando quindi la permeabilità paracellulare (Figura 4).



**Figura 4:** Modello strutturale delle claudine (Chiba et al, 2008)

Nelle membrane, le claudine formano oligomeri con una conformazione particolarmente instabile, anche se il tipo e la stabilità di queste interazioni possono variare tra cellule e tipi di claudine (Oliveira et al, 2009). Sono state identificate interazioni sia tra isoforme identiche di claudina (interazioni omofiliche) sia tra due isoforme diverse (interazioni eterofiliche), anche se dati sperimentali indicherebbero un ruolo maggiore delle interazioni omofiliche nelle interazioni claudina-claudina (Angelowa et al, 2007). Generalmente, a seguito di queste interazioni le claudine formano dei pori per il trasporto paracellulare di piccoli ioni e molecole. Ad esempio la claudina-2 forma un canale cationico mentre la claudina-10 forma un canale anionico (Will et al, 2008).

Infine le claudine presentano un'espressione tessuto specifica e alcune di esse sono espresse solo in determinate specie cellulari. In particolare, per quanto riguarda il rene, le diverse claudine vengono espresse in precisi segmenti del nefrone, dove regolano la selettività paracellulare dei piccoli ioni (Will et al, 2008).

## 1.2 Claudine nel rene

Il sistema escretore umano gioca un ruolo centrale nell'omeostasi idrico-salina in quanto regola la quantità di acqua e sali nei liquidi corporei producendo ed eliminando urina (Cremaschi, 1987).

I reni fanno parte del sistema escretore e sono formati da due regioni: quella corticale (esterna) e quella midollare (interna); ogni rene contiene unità funzionali chiamate nefroni, costituite da un tubulo e da capillari ad esso associati.

Il sangue da filtrare entra nel rene attraverso l'arteria renale e, a causa della pressione sanguigna, l'acqua e i soluti sono indotti a passare attraverso la capsula di Bowman ed entrare nel glomerulo, per poi passare nel tubulo prossimale (regione corticale), nell'ansa di Henle, un tratto a forma di U che porta il filtrato verso la regione midollare e lo riporta indietro in quella corticale fino al tubulo distale, che riversa poi il filtrato di molti nefroni nel dotto collettore, dove il filtrato diventa urina. L'urina viene poi trasportata alla pelvi renale, poi nell'uretere, nella vescica ed infine eliminata attraverso l'uretra.

Il nefrone ha annesso due reti distinte di capillari: la rete che forma il glomerulo proviene da un'arteriola che, superato il glomerulo, si ricostituisce e porta il sangue alla seconda rete di capillari (peritubolari), che partecipa all'elaborazione del filtrato. Questi poi, allontanandosi dal nefrone, si riuniscono formando una diramazione della vena renale.

Le funzioni base del sistema escretore sono quattro: i) la filtrazione, dove l'acqua e tutte le altre molecole abbastanza piccole passano dal glomerulo al tubulo del nefrone; ii) il riassorbimento, in cui l'acqua e importanti soluti (glucosio, sali e amminoacidi) vengono recuperati e rimessi nella circolazione; iii) la secrezione, dove alcune sostanze sono rimosse dal sangue dei capillari peritubolari e aggiunte al filtrato; iv) l'escrezione, in cui l'urina viene eliminata attraverso alcuni dotti fino all'uretra. Durante il riassorbimento e la secrezione le sostanze si spostano dal tubulo ai capillari passando per il liquido interstiziale.

Nella zona corticale, la concentrazione di soluti è minore rispetto alla zona midollare e mantenendo questo gradiente, il rene riesce a riassorbire e a recuperare gran parte dell'acqua del filtrato. Qui avviene anche la regolazione del pH grazie alla secrezione nel filtrato di ioni idrogeno e al riassorbimento di ioni bicarbonato. Inoltre, le cellule del tubulo prossimale sintetizzano e secernono ammoniaca che neutralizza l'acidità del filtrato.

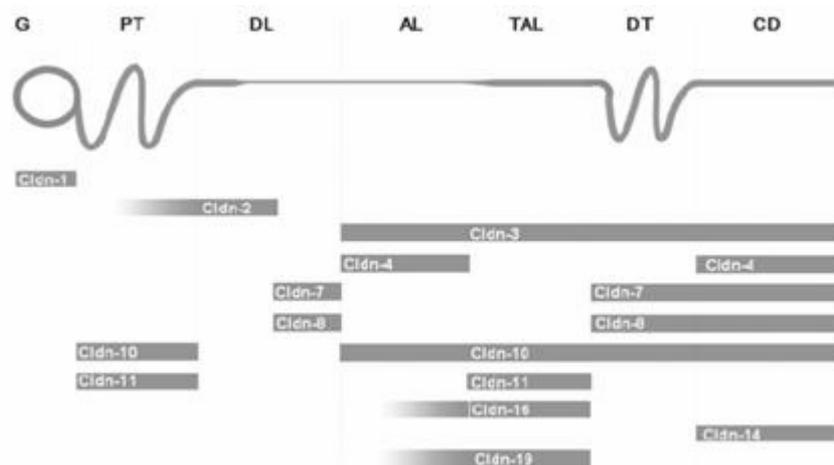
L'ansa di Henle e il dotto collettore hanno principalmente il compito di riassorbire l'acqua; la concentrazione nella regione midollare, dovuta alla presenza di cloruro di sodio e urea, incrementa la quantità d'acqua che verrà assorbita per osmosi. Questa, passata nel liquido interstiziale, viene prelevata dai capillari circostanti; nel tratto ascendente dell'ansa di Henle, il

riassorbimento dell'acqua cessa perché questa parte del tubulo è impermeabile. Il riassorbimento di cloruro di sodio nella regione midollare è passivo, perché la sua concentrazione nei tubuli è maggiore rispetto a quella nel liquido interstiziale. Il cloruro di sodio viene invece riassorbito per trasporto attivo nella regione corticale.

Il dotto collettore, assorbendo cloruro di sodio, gioca un ruolo fondamentale nel determinare la quantità di sale che viene eliminato con le urine. Infine, prima che l'urina passi nella pelvi, viene riassorbita altra acqua dal filtrato.

Tutte le funzioni dei reni sono regolate da ormoni. Infatti, quando la concentrazione dei soluti aumenta nei liquidi corporei, viene aumentata la produzione di ADH (Antidiuretic hormone) da parte dell'ipotalamo, che segnala al nefrone di riassorbire più acqua dal filtrato. L'ormone antidiuretico aumenta la permeabilità cellulare e l'assorbimento dell'acqua a livello dell'ansa di Henle.

Nelle tight junctions dei vari tratti del nefrone sono espresse varie claudine che regolano il passaggio di ioni diversi (Figura 5) (Will et al, 2008).



**Figura 5:** Distribuzione delle claudine (Cldn) nel nefrone. Ogni claudina ha una precisa e distinta regione del nefrone dove viene espressa. G = glomerulo; PT =tubulo prossimale; DL = tratto discendente dell'ansa di Henle; AL = tratto ascendente dell'ansa di Henle; TAL = tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle; DT =tubulo distale; CD =dotto collettore (Will et al, 2008)

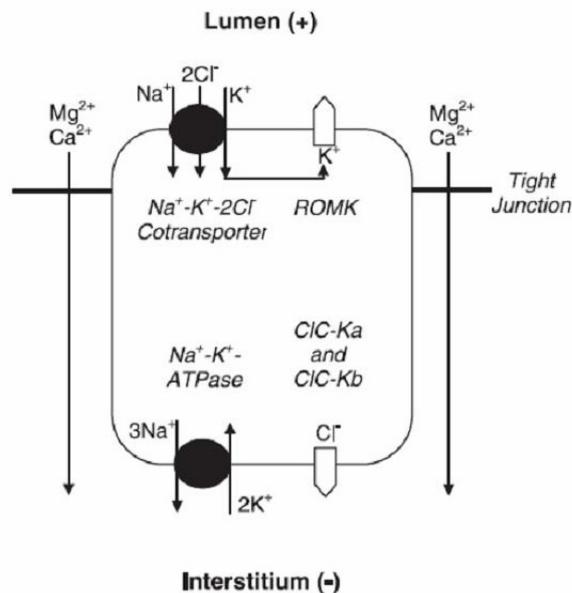
Il glomerulo e la capsula di Bowman's sono deputati alla filtrazione del sangue. Il filtro è formato dall'endotelio, dalla membrana basale e dai podociti. In questa zona, apicalmente e basolateralmente, sono espresse la claudina-1 e la claudina-2 (Kiuchi-Saishin et al, 2002).

Il tubulo prossimale ha la funzione di riassorbire la maggior parte dei soluti, le molecole più piccole e le proteine a basso peso molecolare. In particolare, nel primo tratto del tubulo prossimale si ha il riassorbimento del sodio che è critico per il movimento degli altri soluti. Nella parte

terminale del tubulo, invece, il riassorbimento trans o paracellulare del sodio è accoppiato a quello del cloro (Carpi-Medina et al, 1988). In questo tratto del nefrone sono espresse la claudina-2, la claudina-10 e la claudina-11. È stato dimostrato che la sovraespressione della claudina-2 porta a un aumento della permeabilità paracellulare del sodio, suggerendo un coinvolgimento di questa proteina nella formazione di pori per il passaggio di questo ione (Angelowa et al, 2007). La claudina-2 è anche espressa nel tratto discendente dell'ansa di Henle.

Sempre nell'ansa di Henle, in prossimità dell'ansa, si trovano la claudina-7 e la claudina-8 che contribuiscono alla permeabilità ionica e alla formazione di una barriera anionica e cationica, rispettivamente. Queste due claudine sono espresse anche a livello del tubulo distale e del dotto collettore dove si ha la formazione finale dell'urina. In questo tratto del nefrone il ruolo delle tight junctions è quello di formare una barriera cationica per prevenire un riflusso dallo spazio interstiziale al lume.

Nel tratto ascendente dell'ansa di Henle si trovano le claudine 3, 4, 10, 16 e 19. È stata anche dimostrata l'espressione della claudina-8 nel tratto discendente, in accordo con il suo ruolo di barriera cationica (Yu et al, 2003). L'alto gradiente elettrolitico nel tratto ascendente dell'ansa di Henle, combinato con la carica positiva del lume, rappresenta un forte supporto al riassorbimento paracellulare dei cationi e contribuisce al flusso paracellulare in questo segmento renale. L' NaCl riassorbito passa attraverso il cotrasportatore  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}$  di tipo 2 nella membrana apicale. In quella basolaterale la pompa sodio/potassio (Na/K) scambia il sodio in uscita con il potassio in entrata. Il potassio e' poi secreto nel lume tramite il canale ROMK (Renal Outer Medullary Potassium channel). Il cloro esce attraverso il canale CLC. Il continuo riassorbimento di NaCl porta a una graduale diluizione del fluido tubulare e alla formazione di un gradiente di concentrazione di NaCl transepiteliale. La formazione di questo gradiente genera un potenziale di diffusione positivo verso il lume. Questo potenziale guida il riassorbimento di calcio e magnesio (Balkovetz, 2008) (Figura 6).



**Figura 6:** Modello schematico del riassorbimento degli ioni nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (Lee et al, 2006)

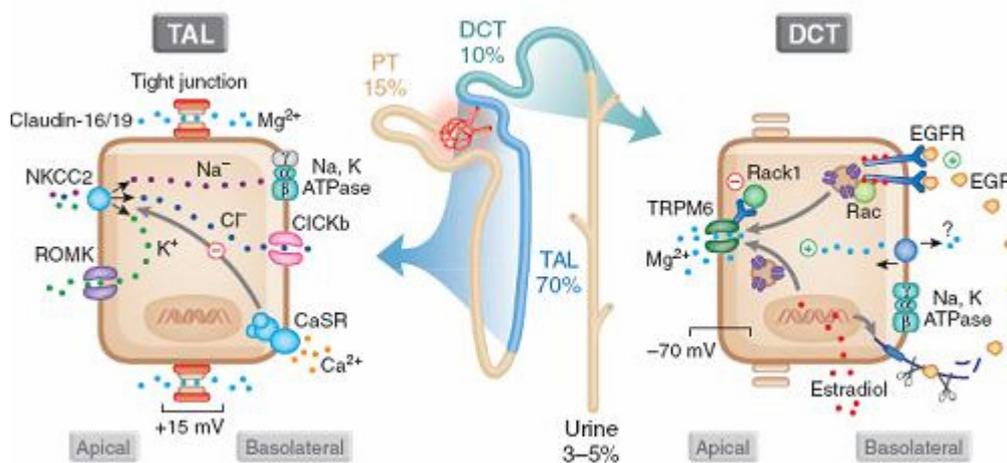
### 1.2.1 Riassorbimento del magnesio

Il magnesio è il secondo catione intracellulare più abbondante e un minerale importante per la stabilità delle ossa, la distensione muscolare, la neurotrasmissione, le reazioni enzimatiche e molte altre funzioni cellulari. Per questo, la carenza di magnesio provoca convulsioni, aritmia cardiaca, fragilità ossea e predispone alla formazione di calcoli renali. Di conseguenza, l'omeostasi del magnesio è altamente controllata.

Normalmente la concentrazione di magnesio è mantenuta tra 0.7 e 1.1 mmol/L e il magnesio extracellulare è scambiato in continuazione con quello immagazzinato nelle ossa e nel tessuto muscolare. Una dieta bilanciata dovrebbe fornire 12 mmol (400 mg) di magnesio per giorno. Di queste, 6 mmol vengono assorbite, 2 mmol vengono secrete nell'intestino e 4 mmol nelle urine. Una diminuzione del consumo di magnesio è bilanciata da un aumento dell'assorbimento nell'intestino e da una riduzione dell'escrezione renale. Questi processi sono regolati da influenze metaboliche e ormonali (Konrad et al, 2003).

Nell'intestino l'assorbimento del magnesio avviene sia per via transcellulare, con un trasporto attivo saturabile, che per via paracellulare, tramite un trasporto passivo non saturabile. La saturazione dell'assorbimento transcellulare ad alte concentrazioni di magnesio nel lume è spiegabile con una limitata capacità dei sistemi di trasporto dei trasporti attivi. A basse concentrazioni di magnesio nel lume invece, il suo trasporto avviene principalmente tramite il trasporto attivo.

Il rene gioca un ruolo centrale nel mantenere bilanciata la quantità di magnesio presente nell'organismo (Figura 7). Approssimativamente l'80% del magnesio plasmatico è filtrato dal glomerulo e la maggior parte di esso è riassorbita nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle tramite una via paracellulare e nel tubulo distale tramite una via transcellulare (Wagner et al, 2007).



**Figura 7:** Regolazione dell'omeostasi del magnesio nel rene. Circa l'80% del magnesio è filtrato dal glomerulo, il 15% del quale è assorbito dal tubulo prossimale, il 70% dal tratto ascendente dell'ansa di Henle e il 15% dal dotto collettore. (Todd et al, 2008)

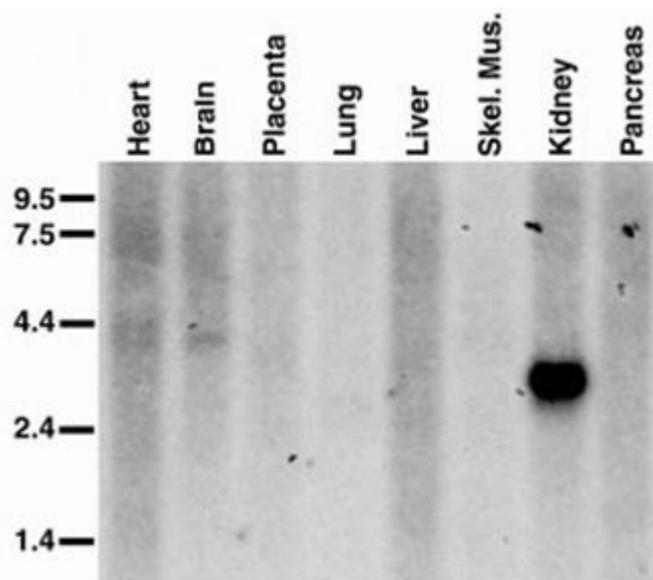
Nel tratto ascendente dell'ansa di Henle il riassorbimento paracellulare del magnesio è un processo dalle claudine 16 e 19. Questo processo dipende da un riassorbimento attivo del sodio, mediato dal cotrasportatore sodio-potassio-cloro NKCC. Il sodio passa poi attraverso la pompa Na-K-ATPasi. Il flusso dello ione Cl passa attraverso CICKb (Chloride channel protein) e il potassio ritorna nel lume attraverso il canale ROMK. Il recettore sensibile del calcio CaSR può inibire questo processo e prevenire il riassorbimento di calcio e magnesio.

Sono state identificate quattro molecole che giocano un importante ruolo nel trasporto del magnesio. La prima identificata è la subunità gamma della pompa Na-K-ATPasi. Mutazioni in questa subunità causano una perdita del magnesio a livello renale. Un'altra proteina coinvolta nel trasporto del magnesio è TRPM6 (transient receptor potential cation channel M6), espressa nel tubulo distale. Associata con TRPM7, una proteina omologa, forma un canale ionico. È stato inoltre identificato il regolatore ormonale EGF, che stimola l'attività di TRPM6 per il trasporto del magnesio nel rene. Le ultime due molecole identificate sono le claudine 16 e 19, che sembrano interagire tra loro per formare un poro per il trasporto del magnesio.

### 1.3 Claudina-16

La claudina-16, o paracellina-1, è una proteina espressa nel tratto ascendente dell'ansa di Henle. Qui essa forma dei canali attraverso i quali si ha il trasporto paracellulare del magnesio e del calcio. Inoltre, è stato recentemente osservato che una delezione del gene CLDN16 provoca una displasia del tubulo renale nei bovini (Ohba et al, 2000). Ciò suggerisce che questa claudina, oltre a svolgere la funzione di riassorbimento degli ioni, può giocare un ruolo importante nel normale sviluppo e organizzazione del tubulo renale. Il gene CLDN16 è stato mappato sul cromosoma 3 da Simon nel 1999 ed è costituito da 5 esoni. La proteina codificata da questo gene è composta da 305 aminoacidi e ha un peso di 27 kDa.

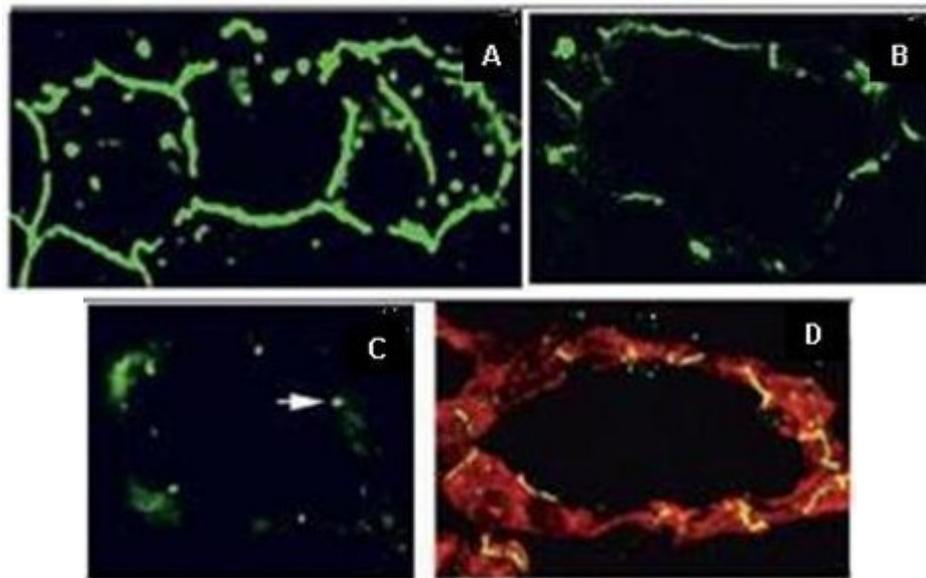
Per verificare dove essa fosse espressa, Simon eseguì un'analisi northern degli RNA provenienti da diversi tessuti umani, constatando la presenza di RNA CLDN16 solo nel tessuto renale (Figura 8).



**Figura 8:** Northern blot di claudina 16 (Simon et al, 1999)

Successivamente, per identificare dove fosse espressa esattamente nel rene la proteina CLDN16, lo stesso autore eseguì una dissezione dei vari segmenti del nefrone e utilizzando un anticorpo specifico per CLDN16 trovò la proteina solo nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e nel tubulo convoluto distale. Infine, utilizzando il microscopio confocale per stabilire la localizzazione di anticorpi specifici per CLDN16 e per le proteine chiamate occludine, espresse nelle tight junctions, riuscì a stabilire che CLDN16 co-localizzava con le occludine. Questi risultati permisero di classificare la claudina-16 come una proteina renale espressa esclusivamente nelle

tight junctions del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e del tubulo convoluto distale (Figura 9).



**Figura 9:** Immunolocalizzazione della claudina-16 in sezioni di rene umano congelate. Le sezioni sono state trattate con anticorpi e analizzate poi al microscopio confocale. A) Sezione longitudinale di cellule del tubulo renale trattate con un anticorpo per la claudina-16. B) Sezione tangenziale di cellule del tubulo renale trattate con un anticorpo per la claudina 16. C) Sezione trasversale di cellule del tubulo renale trattate con un anticorpo per la claudina-16 che mostrano una localizzazione della proteina a livello delle giunzioni intercellulari (indicata dalla freccia). D) Sezione tangenziale di cellule del tubulo renale trattate con un marker per le proteine del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle e con FITC marcato con un anticorpo per la claudina-16. Le restanti immagini mostrano la colocalizzazione delle occludine con la claudina 16. (Simon et al, 1999)

In seguito furono condotti ulteriori studi per cercare di capire la regolazione trascrizionale alla base di questa espressione tessuto specifica. Fu identificata una regione di 70 bp tra le posizioni -1633 e -1703 rispetto al gene CLDN16 che potrebbe giocare un ruolo chiave nell'attività del promotore del gene CLDN16 (Efrati et al, 2005). È stata infatti dimostrata un'interazione tra un regolatore positivo presente in questa regione e un regolatore negativo che si lega più lontano in 5'. Questa interazione determinerebbe l'espressione specifica nelle cellule renali di questo gene. Inoltre l'attività del promotore è influenzata anche dalla concentrazione di magnesio nell'ambiente e l'espressione del gene è regolata trascrizionalmente dai Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), una famiglia di recettori ormonali nucleari coinvolti in diversi processi quali il metabolismo dei lipidi, la proliferazione cellulare e l'apoptosi (Guan et al, 2001; Berger et al, 2002).

La claudina-16 mostra un'identità di sequenza tra il 10% e il 18% con gli altri membri della famiglia delle claudine (Figura 10). In particolare, l'omologia più alta si riscontra in un segmento del primo loop extracellulare che si pensa faccia da ponte con lo spazio intercellulare.

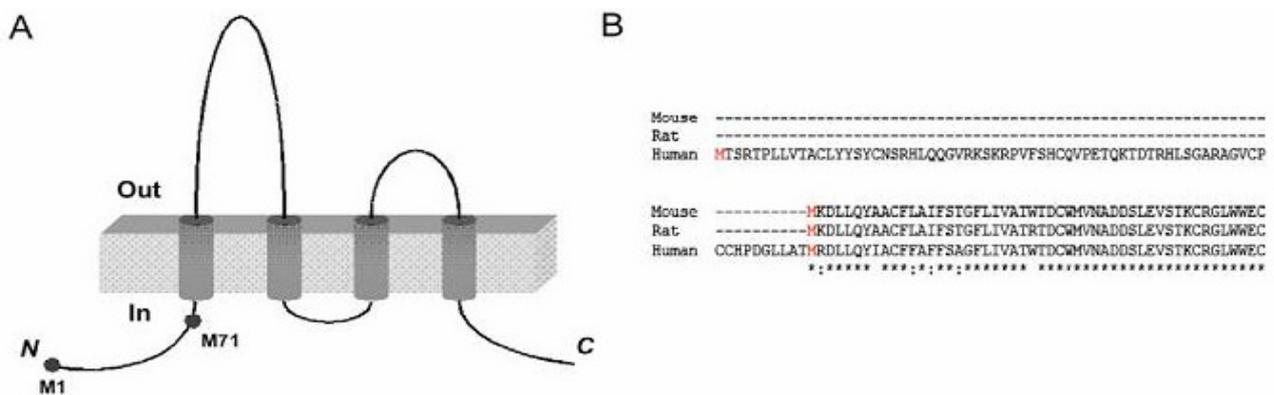
```

MTSRTPLLVTACLYYSYCNRRHLQQGVRKSKRPVFSHCQVPETQKTDTRHLSGARAGVPCCHPDGLLATMR 72
      TM1
DLLQYIACFFAFFSAGFLIVATWTDWCMVNADDSLEVSTKCRGLLWEQVTFNAFDGIRTCDEYDSILAEHPLK 144
      TM2                                TM3
LVVTRALMITADIDAGFGFLTLLGLDCVKFLPDEPYIKVIRICFVAGATLLIACTPFGIIGSVWYAVDVYVER 216
      TM4
STLVLHNIFLGIQYKFCMNSCWLEMGAGSLGCFLACAVLTCGLYLFKDVGPERNYPYSLRKAYSAGVSMASYS 288
SAPRTETAKMYAVDTRV 305

```

**Figura 10:** Sequenza aminoacidica della claudina-16. I putativi domini transmembrana sono indicati come TM1, TM2, TM3 e TM4. Gli aminoacidi evidenziati sono i residui conservati nei diversi membri della famiglia delle claudine (Simon et al, 1999)

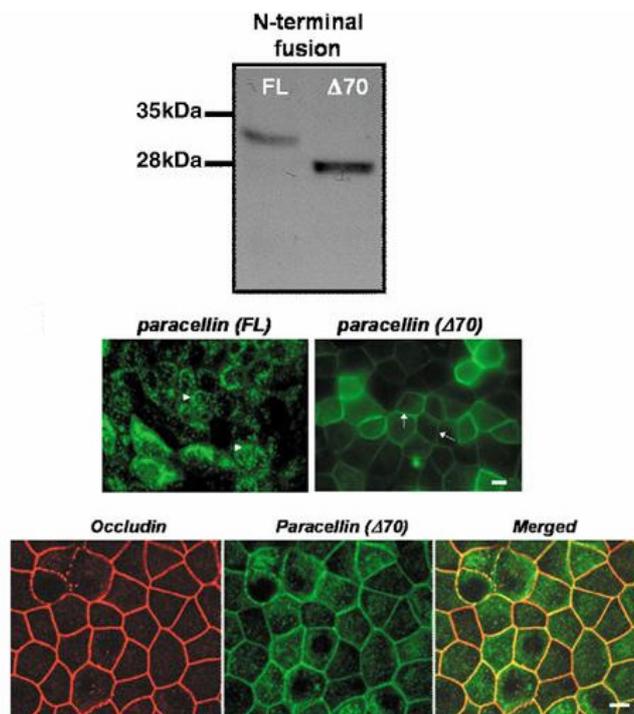
Inoltre, la claudina-16 contiene in C-terminale un dominio PDZ con una sequenza di aminoacidi, Thr-X-Val, conservata nelle diverse specie. Per quanto riguarda la sequenza N-terminale, Simon aveva osservato che, dove le altre claudine presentano non più di 6-7 amminoacidi, la claudina-16 presenta 73 residui aminoacidici. Osservazioni successive hanno consentito di individuare 2 probabili codoni di inizio della traduzione, chiamati M1 e M71, nell'mRNA della claudina-16 (Figura 11 A) (Hou et al, 2005). Per cercare di identificare il reale codone di inizio della traduzione è stato fatto un confronto tra la claudina-16 umana e le proteine ortologhe di ratto e topo. Da questo confronto è emerso che il residuo metionina corrispondente a M71 nella claudina-16 umana è altamente conservato nelle proteine di ratto e topo, dove rappresenta l'inizio della proteina (Figura 11 B).



**Figura 11:** A) Struttura della claudina-16 con l'indicazione delle due metionine in N-terminale. B) Confronto della sequenza aminoacidica della claudina-16 in topo, ratto e uomo. Il residuo M71 nella sequenza della claudina-16 umana rappresenta l'estremità N-terminale delle proteine di ratto e topo (Hou et al, 2005)

Per verificare che il codone M71 rappresenti il reale codone di inizio della traduzione anche per l'mRNA della proteina umana, con diversi costrutti codificanti per la proteina full-length e per la proteina privata dei primi 70 amminoacidi all'N-terminale sono state trasfettate linee cellulari

canine e umane. Entrambi i tipi di costrutti venivano tradotti dando origine rispettivamente a due specie proteiche di 33 e 27 kDa. Lo studio della localizzazione subcellulare di queste proteine ha mostrato che la forma proteica tradotta a partire da M1 si localizza a livello dei lisosomi, dove viene degradata, mentre la proteina tradotta a partire dal M71 si co-localizza con le occludine a livello delle giunzioni cellulari. Questi risultati indicano che il codone di inizio della traduzione della claudina-16 funzionante è la M71 anche nell'uomo (Figura 12).



**Figura 12:** Analisi western di estratti totali preparati da cellule trasfettate con due costrutti della claudina-16. Il costrutto full-length (FL) viene tradotto in una proteina di 33 kDa, mentre il costrutto privato dei primi 70 codoni ( $\Delta 70$ ) viene tradotto in una proteina di 27 kDa. In basso, è mostrata la localizzazione subcellulare della claudina-16 determinata tramite microscopia confocale. La proteina full-length, in fusione con GFP, si localizza a livello dei lisosomi, mentre la proteina di 27 kDa è localizzata a livello delle giunzioni cellulari. Inoltre essa colocalizza con le occludine (Hou et al, 2005).

La claudina-16 presenta 4 domini transmembrana e 2 domini citosolici, rispettivamente in N- e C-terminale. Studi recenti hanno dimostrato che i 2 loops extracellulari sono essenziali per il trasporto paracellulare del magnesio (Hou et al, 2005). Il riassorbimento dei soluti attraverso lo strato epiteliale tubulare segue due vie distinte: una via transcellulare e una paracellulare. La via paracellulare è regolata dalle tight junctions che formano una barriera per la diffusione dei soluti attraverso le cellule epiteliali e separano le membrane apicali da quelle basolaterali conservando la polarità cellulare. La claudina-16, che regola il trasporto paracellulare del magnesio, è stata la prima proteina della tight junctions ad essere identificata come coinvolta nel riassorbimento degli ioni (Konrad et al, 2003).

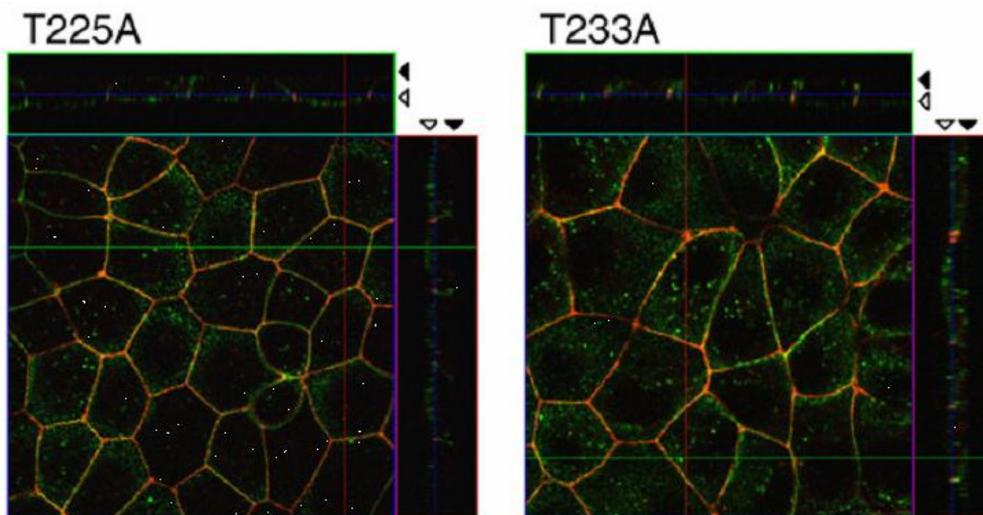
Esperimenti condotti alcuni anni fa hanno inoltre dimostrato che l'interazione tra la claudina-16 e la proteina ZO-1 è essenziale per la localizzazione della claudina-16 nelle tight junctions e che porta a un aumento del riassorbimento dei cationi divalenti nelle cellule renali (Ikari et al, 2004). È stato innanzitutto verificato che la regione di legame tra CLDN16 e ZO-1 fosse il C-terminale inserendo mutazioni puntiformi al C-terminale della claudina-16 e osservando che i residui essenziali per l'interazione fra le due proteine sono una treonina e una valina della regione di legame PDZ di questa proteina. Inoltre, le forme mutanti nel C-terminale di CLDN16 non riuscendo più a interagire con ZO-1, si distribuiscono in tutta la membrana laterale senza concentrarsi in modo specifico nelle tight junctions. Questi risultati indicano che ZO-1 gioca un ruolo fondamentale nella localizzazione di CLDN16 nelle tight junctions. Inoltre l'interazione di CLDN16 con ZO-1 incrementa la permeabilità paracellulare dei cationi divalenti.

Affinché la proteina si localizzi nelle tight junctions, è essenziale che CLDN16, oltre a interagire con ZO-1, sia fosforilata sulla Ser217 dalla protein chinasi A (PKA). Fino a poco tempo fa non era chiaro se la fosforilazione di CLDN16 da parte di PKA avvenisse in modo diretto o indiretto. Era però noto che il substrato preferito per PKA nelle cellule epiteliali ed endoteliali era la proteina VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Bachmann et al., 1999) la cui forma fosforilata è coinvolta nella regolazione mediata da cAMP del riassetto giunzionale epiteliale (Lawrence et al., 2002) e, in particolare, sembra direttamente coinvolta nella biogenesi delle tight junctions. Su queste basi si è ipotizzato che la fosforilazione e la localizzazione di CLDN16 fosse regolata da VASP (Ikari et al., 2008). È stato poi scoperto che la formazione delle tight junctions è regolata dalla fosforilazione di VASP, mentre la localizzazione di CLDN16 è regolata dalla fosforilazione della Ser217 ad opera di cAMP/PKA, ma è indipendente dalla fosforilazione di VASP ed è necessaria affinché essa si leghi a ZO-1 e si localizzi correttamente nelle tight junctions.

Gli ultimi studi condotti sulla fosforilazione della Ser217 di CLDN16 non solo hanno confermato che essa è importante per la sua localizzazione nelle tight junctions (la defosforilazione della proteina provoca la sua traslocazione nei lisosomi dove viene degradata), ma hanno anche mostrato che gioca un ruolo importante nelle condizioni fisiologiche e patologiche di un individuo (Ikari et al, 2010). In particolare, i valori della pressione sanguigna sono inversamente proporzionali ai livelli di magnesio nel corpo (Whelton et al, 1989) e l'aggiunta di magnesio tramite la dieta impedisce l'insorgere di ipertensione (Touyz et al, 1999). In questo contesto, esperimenti condotti su ratti dimostrano che alti livelli di fosforilazione di CLDN16 abbassano l'ipertensione, suggerendo un coinvolgimento di questa proteina nella riduzione dell'ipertensione (Ikari et al, 2006). Inoltre, il livello di Ser217 fosforilata in CLDN16 è ridotto da alte concentrazioni di cationi

divalenti extracellulari, incluso il magnesio, suggerendo che la dissociazione di CLDN16 dalle tight junctions ad alte concentrazioni di magnesio previene un eccessivo riassorbimento (Ikari et al, 2008).

In molte claudine la localizzazione nelle tight junctions avviene anche grazie alla fosforilazione di una treonina nel C-terminale (Fujibe et al, 2004). Esperimenti condotti su CLDN16 hanno dimostrato che una diminuzione di magnesio provoca un abbassamento dei livelli sia della chinasi p-ERK (endoplasmic reticulum-resident protein kinase) che di CLDN16 fosforilata in treonina (Ikari et al, 2010). Ciò può indicare che p-ERK è coinvolta nella fosforilazione di una treonina di CLDN16. Quindi la localizzazione di CLDN16 potrebbe essere regolata da due meccanismi di fosforilazione, uno dipendente da PKA e uno dipendente da ERK. Questa ipotesi è stata verificata tramite l'utilizzo dei due mutanti T225A e T233A di CLDN16, che interessano due treonine del C terminale. Entrambe le proteine mutanti vengono espresse, ma la loro associazione con ZO-1 è minore di quella della proteina selvatica. Infatti le due proteine mutanti si localizzano a livello delle membrane apicali e laterali, mentre ZO-1 si localizza solo a livello delle membrane apicali (Figura 13). Inoltre i livelli di permeabilità transepiteliare del magnesio sono molto più bassi nei mutanti rispetto a quelli di cellule che esprimono la proteina selvatica.



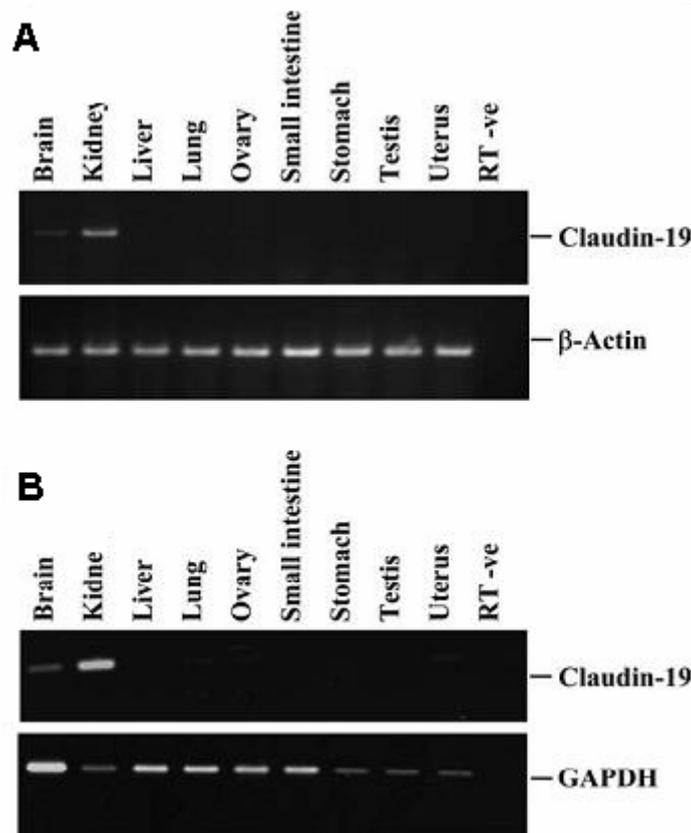
**Figura 13:** Effetti delle mutazioni T225A e T233A sulla localizzazione nelle tight junctions della claudina-16. Le due varianti mutate espresse dalle cellule e fuse con un flag sono marcate con un anticorpo anti-flag (in verde) mentre la proteina ZO-1 è marcata con un anticorpo anti-ZO-1 (in rosso). Entrambe le varianti mutate non colocalizzano più solo con ZO-1, ma si distribuiscono in altre parti della cellula (Ikari et al, 2010)

Si è anche osservato che l'inibizione di ciascuna chinasi induce la dissociazione di CLDN16 dalle tight junctions e fa diminuire la permeabilità transepiteliare del magnesio. Inoltre, CLDN16 si distribuisce nei lisosomi o sulla membrana plasmatica a seconda che diminuisca la fosforilazione della serina o della treonina. In base a queste osservazioni è stata avanzata l'ipotesi che la

fosforilazione della serina possa essere implicata nel meccanismo di passaggio degli ioni, mentre la fosforilazione della treonina potrebbe essere coinvolta nell'ancoraggio di CLDN16 alle tight junctions (Ikari et al, 2010) dove, interagendo con la claudina-19, formerebbe dei pori attraverso cui passerebbe il magnesio secondo gradiente elettrochimico. La co-localizzazione di queste 2 proteine e' stata dimostrata grazie a esperimenti di coimmunolocalizzazione (Hou et al, 2008).

## 1.4 Claudina-19

Nel 2005 un gruppo di ricercatori condusse degli esperimenti per verificare se altre claudine, oltre la claudina-16, fossero coinvolte nel riassorbimento paracellulare renale e nel mantenere l'omeostasi del rene (Lee et al, 2006). Si è osservato che l'mRNA della claudina-19 era presente solo nel tessuto renale di topo e ratto, in particolare a livello del tubulo distale e del dotto collettore (Figura 14).

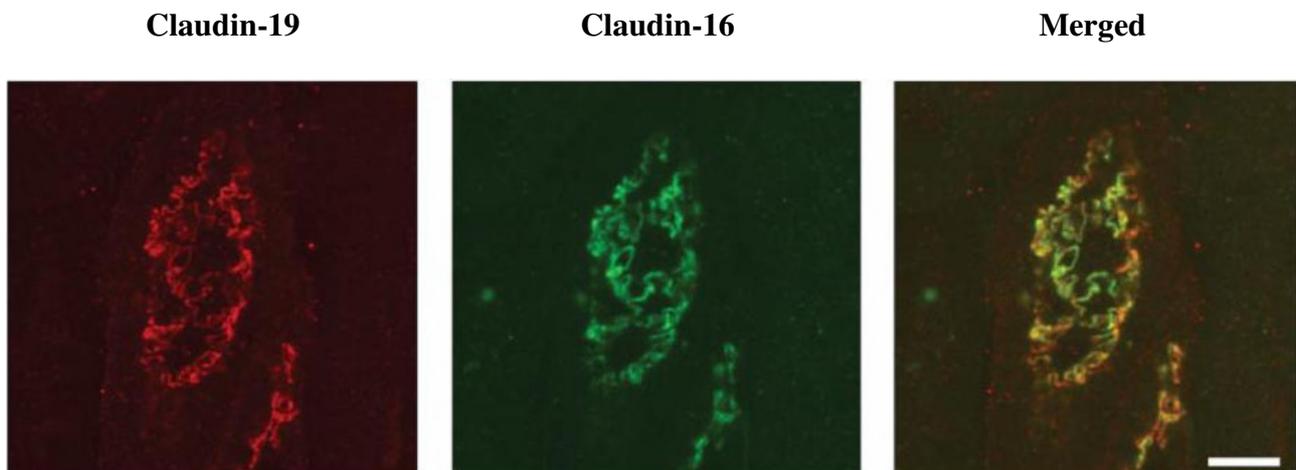


**Figura 14:** L'espressione dell'mRNA di claudina-19 è stata verificata con una RT-PCR semi-quantitativa in diversi tessuti di topo (A) e ratto (B) (Lee et al, 2006)

Il gene CLDN19 di topo è stato mappato sul cromosoma 4 e codifica per una proteina di 23,8 kDa composta da 224 amminoacidi. Un'analisi di idrofilia ha indicato che la claudina-19 di topo ha probabilmente 4 domini transmembrana con due regioni N- e C-terminali intracellulari. Inoltre è stata osservata un'identità di sequenza amminoacidica compresa tra il 95% e il 98,2% tra le claudine-19 di topo, ratto e uomo. Il gene CLDN19 umano è stato mappato sul cromosoma 1, è costituito da 5 esoni e codifica per una proteina di circa 24 kDa composta da 224 amminoacidi ed espressa nel tratto ascendente dell'ansa di Henle.

Successivamente, esperimenti di immunolocalizzazione hanno evidenziato che la claudina-19 è espressa a livello delle giunzioni cellulari, in siti simili a quelli in cui si trova ZO-1 suggerendo una colocalizzazione delle due proteine. L'ipotesi è stata confermata da esperimenti di immunostochimica in cui sezioni di rene di topo e ratto trattate con anticorpi specifici rispettivamente per CLDN19 e per ZO-1 hanno rilevato patterns di espressione molto simili tra le due proteine. Sulla base dei profili di espressione e localizzazione della claudina-19, è stato ipotizzato che questa proteina possa essere coinvolta nel riassorbimento di magnesio e calcio e che essa rappresenti un importante trasportatore di cationi delle tight junctions renali.

Esperimenti successivi hanno confermato l'espressione renale di CLDN19 e hanno rilevato un'espressione prevalente di questa proteina nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (Angelow et al, 2007). È stata inoltre osservata una totale colocalizzazione di CLDN19 e CLDN16 a livello del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle in topo (Figura 15)



**Figura 15:** Colocalizzazione di claudina-16 e claudina-19 nel tratto scendente spesso dell'ansa di Henle nel rene di topo. Le criosezioni di tessuto fissate con metanolo sono stratte, nel primo pannello, con un anticorpo claudina-19 e Alexa Fluor 555-anticorpo secondario coniugato (rosso); nel secondo pannello, con un anticorpo claudina-16 e Alexa Fluor 488-tiramide (verde). Nel terzo pannello si vede che la claudina-19 colocalizza totalmente con la claudina-16 nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle (Angelow et al, 2007)

Per verificare l'esistenza di un'interazione tra queste due proteine sono stati eseguiti degli esperimenti in lievito con il sistema del doppio ibrido (Hou et al, 2008). Si è così osservato che CLDN19 mostra livelli di interazione omomeriche paragonabili ai livelli di interazione eteromeriche con CLDN16. La formazione di eterodimeri CLDN16/CLDN19 fa aumentare l'assorbimento dei cationi nelle tight junctions, mentre la presenza di una sola delle due proteine diminuisce l'assorbimento. La stessa diminuzione è stata osservata facendo esprimere nelle tight junctions CLDN16 selvatica insieme a CLDN19 mutata e viceversa.

Per rafforzare questi dati sono stati eseguiti ulteriori esperimenti utilizzando uno small interfering RNA (siRNA) specifico per CLDN19 (Hou et al, 2009). La scomparsa di CLDN19 dalle

tight junctions del tratto ascendente dell'ansa di Henle provocava un mancato assorbimento di magnesio e calcio. Inoltre, in assenza di CLDN19, CLDN16 non si localizzava più a livello delle tight junctions dell'ansa di Henle. Ciò significa che, affinché ci sia l'integrazione di queste due proteine nella membrana a livello delle tight junctions, esse devono interagire tra di loro.

## 1.5 Principali patologie tubulo-renali

Mutazioni in CLDN16 e in CLDN19 causano l'insorgenza di una rara tubulopatia renale, l'ipomagnesemia ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare. Le tubulopatie sono malattie che interessano il tubulo renale, settore del nefrone che rielabora l'urina. Le malattie del tubulo renale riguardano soprattutto l'equilibrio idrico, degli oligoelementi e l'equilibrio acido-base (Agnati, 2001). Possono essere divise in tubulopatie primarie e secondarie.

Le tubulopatie renali primarie sono un gruppo biochimicamente e clinicamente eterogeneo di patologie dovute a difetti nel trasporto tubulare degli ioni. Possono essere classificate in tubulopatie prossimali (come la sindrome renale di Fanconi, la sindrome di Bartter e Gitelman) e le tubulopatie distali.

Nel gruppo delle tubulopatie renali secondarie sono comprese quelle nefropatie nelle quali la disfunzione renale insorge secondariamente ad altre patologie. Tra queste le più rilevanti sono le nefropatie diabetiche.

La sindrome renale di Fanconi è una particolare patologia renale metabolica che insorge con maggiore frequenza durante il periodo della crescita (Lee et al, 1972) e può provocare gravi danni quali ritardo nell'accrescimento, rachitismo, osteomalacia. La patologia si presenta con un alterato trasporto attraverso il tubulo prossimale del neurone di diverse sostanze quali aminoacidi, monosaccaridi, sodio, potassio, fosforo, calcio, bicarbonato, acido urico e proteine (Houston et al, 1966). Le cause possono essere congenite o acquisite come risultato di neoplasie maligne, intossicazione da farmaci o da metalli pesanti e carenza di vitamina D.

La sindrome di Bartter è caratterizzata dall'associazione tra alcalosi ipokaliemica, livelli elevati di renina plasmatica e aldosterone, ipotensione arteriosa e resistenza vascolare all'angiotensina II. La prevalenza è stimata in 1:830.000. Sebbene siano state descritte sei varianti genetiche, solo due forme della malattia possono essere distinte in base a criteri clinici: i) la sindrome di Bartter prenatale o infantile, caratterizzata da polidramnios, parto prematuro, poliuria, disidratazione, ipercalciuria e nefrocalcinosi e ii) la sindrome di Bartter classica, caratterizzata da poliuria-polidipsia nella prima infanzia e nell'infanzia e nell'età adulta, disidratazione e ritardo variabile della curva della crescita staturponderale. I livelli di calcio nell'urina sono normali o leggermente più elevati. I segni/sintomi caratteristici sono rispettivamente la perdita dell'udito nella sindrome di Bartter classificata come tipo 4 e l'ipocalcemia nella sindrome di Bartter classificata come tipo 5 (Hebert et al, 2003). La sindrome di Bartter è dovuta a un difetto di riassorbimento del sodio, del potassio e del cloro nell'ansa di Henle. Quattro delle varianti della sindrome di Bartner sono trasmesse come caratteri autosomici recessivi e si manifestano in presenza di mutazioni

eterozigoti composte o omozigoti in quattro geni che codificano per proteine coinvolte nel riassorbimento del cloro nella parte ascendente dell'ansa di Henle. In particolare mutazioni nel gene SLC12A1 (solute carrier family 12, member 1) (15q15-21), che codifica per il co-trasportatore sodio-potassio-cloro NKCC2, sono associate alla sindrome di Bartter di tipo 1 mentre l'inattivazione del gene KCNJ1 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1) (11q21-25), che codifica per il canale del potassio ROMK, è responsabile della sindrome nella forma di tipo 2. Inoltre, alterazioni nei geni CLCNKB (1p36), che codifica per il canale basolaterale del cloro, e BSND (Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness) (1p31), che codifica per una sottounità del canale del cloro, chiamata barttina, sono associate rispettivamente alla sindrome di tipo 3 e alla sindrome di tipo 4. Un'ultima variante della sindrome, indicata come tipo 5, viene invece trasmessa come carattere autosomico dominante e si manifesta in presenza di mutazioni attivanti eterozigoti nel gene CASR (3q13.3-q21), che codifica per il recettore del calcio (Naesens et al, 2004) .

La diagnosi della sindrome di Bartter si basa sul quadro clinico, sui livelli di elettroliti plasmatici, bicarbonato, magnesio, calcio, renina e aldosterone e sull'escrezione degli elettroliti urinari, del calcio e del magnesio ma la diagnosi definitiva viene fornita dai test genetici, che permettono di distinguere la sindrome di Bartter dalla sindrome pseudo-Bartter (abuso di diuretici, vomito surrettizio), dalla sindrome di Gitelman e dalla fibrosi cistica. In questo contesto, possono anche essere utili test diagnostici sugli amniociti nelle gravidanze di donne con figli affetti, sui pazienti e sui potenziali portatori eterozigoti (consanguinei dei soggetti affetti). Il trattamento comprende la somministrazione per via orale di potassio, l'indometacina e, possibilmente, diuretici in grado di risparmiare il potassio. In situazioni di stress (malattie concomitanti, interventi chirurgici, traumi), i livelli degli elettroliti nel sangue possono cambiare rapidamente e quindi è necessario un immediato e significativo trattamento endovena. Nei casi gravi le attese di vita sono ridotte mentre l'insufficienza renale è rara.

La sindrome di Gitelman (GS), nota anche come ipokaliemia-ipomagnesemia familiare, è caratterizzata da alcalosi metabolica ipokaliemica in associazione a significativa ipomagnesemia e diminuzione della secrezione urinaria di calcio. Si tratta di una delle malattie tubulari renali ereditarie più frequenti, con prevalenza stimata di circa 1/40.000 e conseguente prevalenza degli eterozigoti di circa 1% nelle popolazioni Caucasiche. La diagnosi si basa sui sintomi clinici e sulle anomalie biochimiche (ipokaliemia, alcalosi metabolica, ipomagnesemia e ipocalciuria) (Lemmink et al, 1996; Mastroianni et al 1996). Nella maggior parte dei casi, i sintomi non compaiono prima dell'età di sei anni e la malattia viene di solito diagnosticata durante l'adolescenza o l'età adulta. Nei pazienti GS sono stati osservati spesso periodi transitori di debolezza muscolare e tetania, in

associazione a volte con dolori addominali, vomito, febbre ed eventuali parestesie, specialmente del viso. Peraltro, alcuni pazienti sono completamente asintomatici salvo che per la comparsa in età adulta di una condrocalcinosi che causa rigonfiamento, calore locale e fragilità degli arti interessati. Inoltre, la loro pressione sanguigna è più bassa di quella della popolazione generale. Sono stati anche riportati i casi sporadici di arresto cardiaco. In generale, la crescita dei pazienti GS è normale ma può essere ritardata nei pazienti affetti da GS con ipokaliemia e ipomagneemia. La sindrome è trasmessa come carattere autosomico recessivo e appare associata, nella maggior parte dei pazienti, a mutazioni del gene SLC12A3 (solute carrier family 12, member 3), che codifica per il cotrasportatore Na-Cl (NCC) tiazide-sensibile. Al momento, sono state identificate più di 140 differenti mutazioni nell'intera regione codificante di NCC. Inoltre, mutazioni del gene CLCNKB che codifica per il canale del cloro ClC-Kb, sono state identificate in un piccolo gruppo di pazienti affetti da GS.

## 1.6 Ipomagnesemia ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare

Fra le tubulopatie renali primarie prossimali, oltre a quelle descritte nel paragrafo precedente, si annovera anche l'ipomagnesemia, ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare (FHHNC; OMIM 248250), una tubulopatia renale rara, che si trasmette come carattere autosomico recessivo, che è stata descritta per la prima volta da Michelis nel 1972 (Michelis et al, 1972) e che è stata diagnostica fino ad oggi in circa 200 individui sparsi in tutto il mondo.

L'FHHNC è caratterizzata da perdita della funzione di riassorbimento del magnesio nonostante somministrazione di magnesio o trattamento con diuretici, ipercalciuria, nefrocalcinosi, formazione di calcoli renali, progressiva insufficienza renale (i pazienti sono candidati a trapianto renale), ricorrenti infezioni renali, spasmi muscolari, convulsioni e anomalie oculari (Weber et al, 2000; Webber et al, 2001). Sono inoltre stati osservati alti livelli dell'ormone paratiroideo (PTH) nel corso della malattia (Praga et al, 1995). Le analisi istologiche di tessuto renale mostrano depositi di calcio, sclerosi glomerulare, glomeruli immaturi, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale (Weber et al, 2001). In generale, il successo terapeutico nella cura di questa malattia è scarso. Malgrado continue somministrazioni di magnesio, il suo livello nel sangue rimane basso, mentre aumenta la sua escrezione di magnesio nelle urine. Per ridurre la progressione della nefrocalcinosi si cerca di diminuire l'ipercalciuria tramite somministrazione di diuretici tiazidici. Una terapia di supporto è essenziale per proteggere la funzionalità del rene cercando di prevenire la formazione di calcoli renali e colonizzazioni batteriche. La cura definitiva di questa malattia resta comunque il trapianto del rene.

Nei pazienti affetti da FHHNC sono state individuate nel gene CLDN16 circa 40 mutazioni (Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002; Kang et al, 2005; Tajima et al, 2005; Tasic et al, 2005; Sanjad et al, 2006; Turkem et al, 2006; Staiger et al, 2007; Peru et al, 2008; Al-Hagggar et al, 2009), la maggior parte delle quali localizzate nelle sequenze codificanti per i due loops extracellulari della claudina-16. Queste mutazioni causano la ritenzione della proteina nel reticolo endoplasmatico, nei lisosomi o nell'apparato di Golgi e la sua successiva degradazione, oppure comportano l'espressione di una proteina difettosa nel trasporto paracellulare del magnesio (Tabella 1).

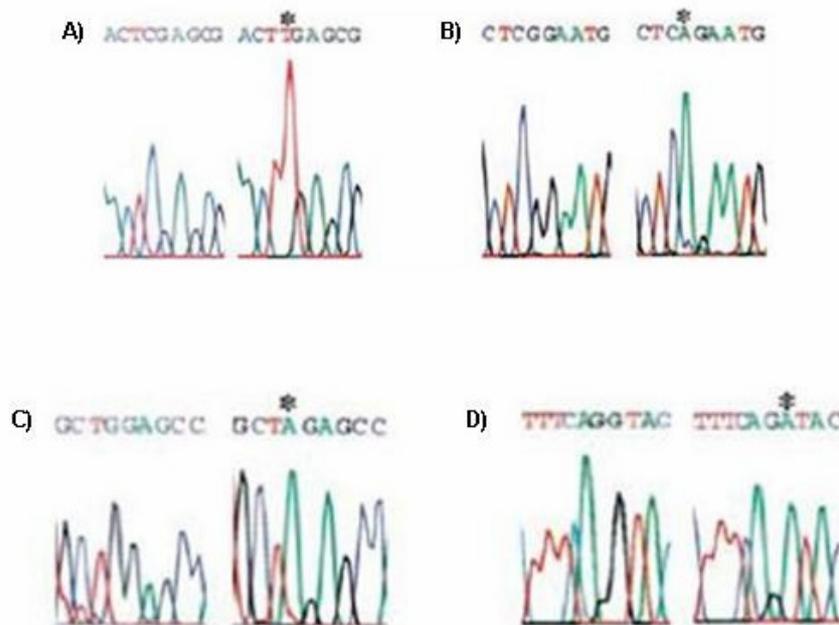
**Tabella 1:** Elenco mutazioni individuate in CLDN16

	<b>MUTAZIONE</b>	<b>ESONE</b>
*1	del GG165→ins C→ fs	ex 1
*2	Met71Thr	ex 1
*3	Cys80fsX91	ex 1

*4	Gly88Glu	ex 1
*5	Ser110Arg	ex 2
*6	Arg114Gln	ex 2
*7	Trp117X	ex 2
*8	Cys120Arg	ex 2
*9	del A →Asnfs123X143	ex 2
*10	Arg129Cys	ex 2
*11	Cys131Arg	ex 2
*12	del Ile137	ex 2
*13	Ala139Val	ex 2
*14	His141Asp	ex 2
*15	Leu145Pro	ex 3
*16	Arg149X	ex 3
*17/18	Arg149Gln; Arg149Leu	ex 3
*19/20	Leu151Trp; Leu151Pro	ex 3
*21	Leu151Phe	ex 3
*22	Gly162Val	ex 3
*23	Leu167Pro	ex 3
*24	Gly191Arg	ex 3
*25	Gly198Ala	ex 4
*26	Ala209Thr	ex 4
*27/28	Arg216Thr; Arg216Cys	ex 4
*29	Gly227Arg	ex 4
*30	Phe232Cys	ex 4
*31	Thr233Arg	ex 4
*32	Ser235Pro	ex 4
*33/34	Ser235Phe; Ser235Tyr	ex 4

*35	Trp237Ter	ex 4
*36	Gly239Arg	ex 4
*37	Leu273Ter	ex 5
*38	Tyr277Cys	ex 5
*39	Thr303Arg	ex 5

Dopo aver sottoposto ad analisi genetica 10 diverse famiglie in cui compariva questa patologia, Simon individuò le prime 10 mutazioni in CLDN16 implicate nell'insorgenza della malattia. In particolare, 8 pazienti risultarono omozigoti per una di queste mutazioni, mentre 2 erano eterozigoti composti. Tra le mutazioni individuate, una dava origine a un codone di stop prematuro in posizione 149, con la conseguente produzione di una proteina tronca non funzionante mentre altre causavano il cambiamento di amminoacidi con conseguente diminuzione o perdita della funzione della proteina (Figura 15).

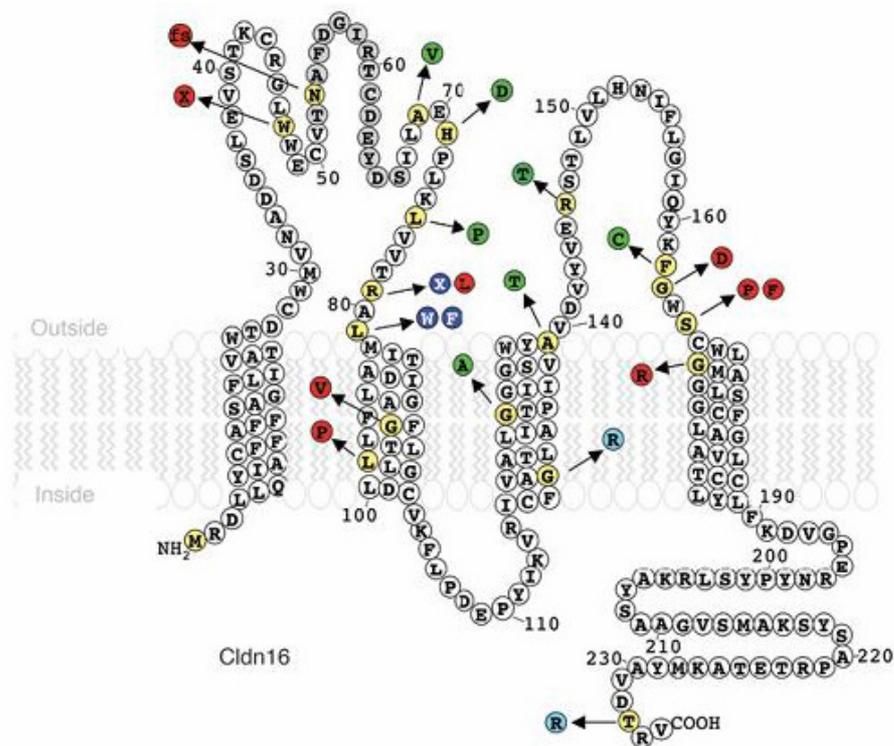


**Figura 15:** Mutazioni nel gene della claudina-16 identificate in diversi pazienti affetti da FHHNC. Gli asterischi evidenziano la base mutata che determina l'insorgenza della malattia nelle sequenze dedotte dagli elettroferogrammi corrispondenti. Sulla sinistra di ogni immagine è riportata la sequenza con il corrispondente elettroferogramma di controlli sani. A) Mutazione del codone 149 che determina la formazione di un codone di stop prematuro. B) Mutazione del codone 239 con cambiamento aminoacidico da glicina a arginina. C) Mutazione del codone 191 con cambiamento aminoacidico da glicina a arginina. D) Mutazione del codone 198 con cambiamento aminoacidico da glicina aacido aspartico. (Simon et al, 1999)

Un successivo studio su 25 famiglie con individui affetti da FHHNC ha permesso di individuare nuove mutazioni e di mettere in relazione per la prima volta la presenza di una

mutazione con le origini etniche dei pazienti (Weber et al, 2001). In particolare, si è osservato che la mutazione Leu151Phe è specificamente diffusa tra i pazienti di origine germanica o dell'Europa dell'Est indicando che essa è stata probabilmente trasmessa da un progenitore ancestrale comune a tutti i portatori.

Più di 20 delle 40 mutazioni individuate in CLDN16, localizzate nelle regioni codificanti per uno dei 4 domini transmembrana o uno dei 2 loops extracellulari, sono state analizzate in modo approfondito e sono state divise in due categorie (Kausalya et al, 2006). La prima categoria comprende le mutazioni che impediscono la localizzazione della claudina-16 nelle tight junctions. Queste proteine mutate vengono espresse su tutta la superficie cellulare oppure vengono traslocate nel reticolo endoplasmatico, nell'apparato di Golgi o nei lisosomi. La seconda categoria comprende le mutazioni che interferiscono direttamente con il trasporto del magnesio ma hanno anche influenza sulla localizzazione della claudina-16. In particolare, la mutazione T233R, che si trova nel C-terminale citosolico, inibisce il legame della CLDN16 con ZO-1 e la proteina mutata viene traslocata nei lisosomi dove avviene la sua degradazione (Figura 16).

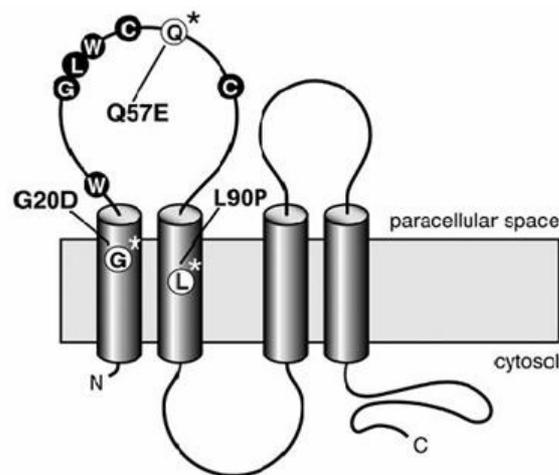


**Figura 16:** Rappresentazione schematica delle conseguenze sulla sequenza amminoacidica di claudina-16 delle mutazioni trovate nei pazienti affetti da FHHNC. Ogni amminoacido mutato è indicato con un colore diverso a seconda degli effetti che provoca sulla proteina. In grigio sono indicate le sostituzioni che impediscono la localizzazione di CLDN16 nelle tight junctions; in rosso quelle che la portano a localizzarsi nel reticolo endoplasmatico; in blu quelle che la portano a localizzarsi nel Golgi; in azzurro quelle che la portano a localizzarsi nei lisosomi (Kausalya et al, 2006).

Da questi dati appare chiara l'esistenza di una correlazione tra la localizzazione di una particolare mutazione e i suoi effetti sulla localizzazione della claudina-16. Per esempio, mutazioni nel primo loop extracellulare, come W47X e N53fs, nel primo dominio transmembrana, come L75P e G92V, nel secondo loop extracellulare, come G163 e S165P, determinano la traslocazione della proteina mutata nei lisosomi. Inoltre, mutazioni che provocano diverse sostituzioni dello stesso amminoacido, come ad esempio R79L/P, L81W/F e S165P/F, causano un effetto simile sulla proteina. Non sembra esserci invece una correlazione tra una particolare mutazione o una specifica localizzazione subcellulare della claudina-16 con il fenotipo clinico dei pazienti.

Le mutazioni di CLDN16 sono state successivamente suddivise in 3 categorie sulla base dei loro effetti sul comportamento della proteina (Konrad et al, 2008): 1) mutazioni che causano la completa scomparsa della funzione della proteina (L145P, M71, R216T, S235P, D123fs, W117X, G239R, G198D); 2) mutazioni che alterano parzialmente la funzione della proteina (L151F, R149L, A209T, L151T, H141D); 3) mutazioni che non sembrano avere effetti sulla funzione della proteina. In base a questa nuova classificazione, si è osservato che pazienti omozigoti per mutazioni che portano alla completa scomparsa della funzione della proteina sembrano manifestare prima i sintomi della malattia rispetto a pazienti omozigoti o eterozigoti per mutazioni che comportano una parziale scomparsa della proteina. Inoltre i pazienti nei quali la malattia insorge prima presentano una progressione più rapida dell'insufficienza renale cronica.

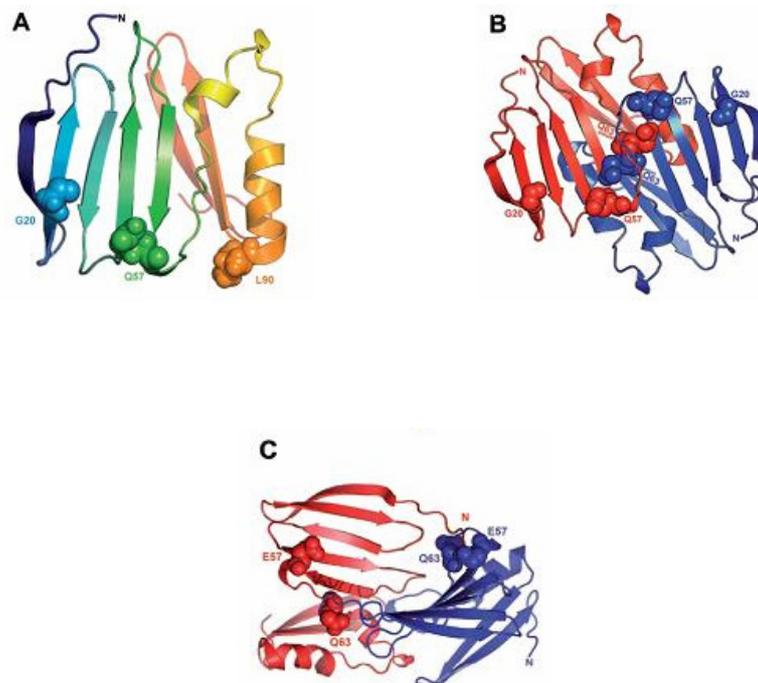
Per quanto riguarda il gene CLDN19, sono state individuate per ora solo 3 mutazioni associate all'insorgere della malattia (Figura 17) (Konrad et al, 2006).



**Figura 17:** Rappresentazione della struttura presunta di CLDN19. Sono indicati con un asterisco i 3 amminoacidi che risultano sostituiti in seguito alle mutazioni finora identificate nel gene corrispondente in pazienti affetti da FHHNC (Konrad et al, 2006)

La mutazione più diffusa in questo gene è nel codone 20 e causa la sostituzione di una glicina con un acido aspartico. In base alla struttura presunta della claudina-19, la glicina sostituita si trova nel primo dominio transmembrana della proteina. Questa mutazione è stata individuata in famiglie spagnole o di origine ispanica e sembra essere molto diffusa in particolare nella zona di Valencia, facendo pensare che possa essere stata trasmessa da un antenato ancestrale comune a tutti gli individui portatori. Questa mutazione causa la completa abolizione della funzione della proteina (Konrad et al, 2008).

Anche le altre 2 mutazioni identificate in CLDN19 causano sostituzioni amminoacidiche. Una di esse, che interessa il codone 57 e comporta il cambiamento da glutammina ad acido glutammico, è stata identificata in una famiglia svizzera, mentre l'altra localizzata nel codone 90 causa la sostituzione di una leucina con una prolina ed è stata identificata in una famiglia di origine turca. Sulla base della struttura teorica della claudina-19, queste 2 sostituzioni sarebbero collocate rispettivamente nel primo loop extracellulare e nel secondo dominio transmembrana. Per cercare di capire gli effetti di queste sostituzioni sulla struttura della proteina e sulla sua capacità di formare eterodimeri con la claudina-16 sono stati costruiti dei modelli tridimensionali teorici dei primi 115 amminoacidi della proteina (Figura 18).



**Figura 18:** Modelli computazionali della struttura tridimensionale di claudina-19 (Konrad et al, 2006). A) Modello dei primi 115 amminoacidi con l'N-terminale colorato in blu. La mutazione G20D è localizzata nel primo dominio transmembrana, la Q57E nel primo loop extracellulare e la L90P nel secondo dominio transmembrana. B) Modello della formazione di omodimeri di claudina-19. Le due molecole di claudina-19 sono colorate in rosso e in blu. L'omodimero sembra essere stabilizzato dall'interazione di Q57 di una molecola con Q63 dell'altra molecola. C) Modello computazionale sugli effetti della mutazione Q57E sulla formazione di omodimeri di claudina-19. La formazione dei dimeri è impedita nella proteina mutante probabilmente a causa di una forte repulsione elettrostatica.

In base ad essi, la sostituzione G20D sembra trovarsi nel primo dominio transmembrana, che assume una struttura a foglietti  $\beta$ . Il forte cambiamento di carica dovuto alla sostituzione di una glicina con acido aspartico presumibilmente influenza le interazioni intramolecolari. La seconda mutazione, Q57E, si trova nel primo loop extracellulare e potrebbe influenzare interazioni elettrostatiche alterando le interazioni proteina-proteina. Infatti, il residuo Q57 sembra essere coinvolto nella formazione di omodimeri tra le molecole di CLDN19 interagendo con i residui Q61 e Q63 per formare una struttura stabile. Invece il dimero non si formerebbe in presenza di un residuo Glu in posizione 57 a causa di una forte repulsione elettrostatica. Un meccanismo analogo potrebbe interferire anche con la formazione di eterodimeri CLDN19-CLDN16, instaurando repulsioni elettrostatiche che impedirebbero alle due proteine di interagire e di formare il canale per il passaggio del magnesio e del calcio.

## 1.7 Scopo della tesi

Gli studi finora condotti sulla FHHNC hanno permesso di mettere in relazione l'insorgenza di questa rara tubulopatia renale con mutazioni nei geni codificanti per due proteine della famiglia delle claudine, CLDN16 e CLDN19, che sono espresse specificatamente nelle tight junctions del tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle. Sono state inoltre identificate regioni particolari di entrambe le proteine in cui si riscontrano più frequentemente alterazioni associate alla patologia. Infine, sembra che alcune delle mutazioni identificate siano più diffuse di altre in alcune etnie.

L'obiettivo iniziale di questo lavoro di tesi è stata l'identificazione di mutazioni in CLDN16 e CLDN19 associabili all'insorgenza della malattia. A tale scopo, abbiamo cercato di raccogliere campioni di materiale genetico dal maggior numero possibile di pazienti affetti da questa malattia. Avere a disposizione un numero significativo di pazienti provenienti da varie parti del mondo e appartenenti a diverse etnie è essenziale per identificare il maggior numero possibile di mutazioni che alterano le due proteine. L'estrema rarità della malattia è stata perciò la difficoltà principale nel raggiungimento di questo obiettivo. Per ora, sono stati individuati circa 200 pazienti affetti da FHHNC in tutto il mondo ed è difficile compiere un'indagine ampia avendo un numero così esiguo di pazienti. Inoltre, sebbene i sintomi della malattia siano stati identificati da diversi anni, essa viene spesso scambiata per altre tubulopatie più frequenti e più conosciute a livello medico, che sono causate da mutazioni in altri geni o da infezioni. Per questi motivi, si è creata una collaborazione internazionale con medici che hanno in cura individui che presentano sintomi riconducibili alla FHHNC e ai quali è stato chiesto di inviare campioni biologici per effettuare la ricerca di mutazioni nei geni CLDN16 e CLDN19. L'analisi genetica è iniziata per tutti i pazienti a partire da CLDN16, la cui alterazione sembra avere un ruolo più determinante di quella di CLDN19 nel causare la malattia, che risulta più frequentemente associata a mutazioni in CLDN16 che a mutazioni in CLDN19. Nei pazienti che non risultavano presentare mutazioni in questo gene, veniva poi subito analizzato CLDN19, allo scopo di aumentare, se possibile, il numero di mutazioni in questo gene associate alla malattia.

L'identificazione del maggior numero possibile di mutazioni in questi geni associate a FHHNC aveva anche lo scopo di cercare di stabilire una correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti affetti dalla patologia e contribuire all'analisi della relazione struttura-funzione delle claudine 16 e 19. Infatti, individuare nuove mutazioni in regioni codificanti per domini delle due proteine che al momento ne presentano poche o nessuna aumenta la possibilità di approfondire la conoscenza della funzione stessa delle proteine e le loro interazioni molecolari con altre componenti delle tight

junctions. In particolare, si è cercato di raggiungere questo obiettivo per la claudina-19, che al momento risulta essere ancora poco studiata e per la quale si hanno informazioni solo teoriche circa l'effetto sulla funzione della proteina di mutazioni associate alla sindrome. Inoltre, l'analisi di un largo numero di pazienti FHHNC potrebbe permettere di identificare altre proteine coinvolte nell'insorgenza di questa malattia. Questo sarebbe molto importante, perché ci sono individui che presentano sintomi riconducibili a questa sindrome, ma per i quali ad oggi non è stata identificata alcuna mutazione nei due geni malattia candidati.

Infine, si è cercato di correlare l'appartenza di ciascun paziente a una determinata etnia con il tipo di mutazione identificata, per cercare di verificare se particolari mutazioni sono più diffuse di altre in pazienti aventi la stessa origine etnica. Il raggiungimento di questo obiettivo può essere molto importante per cercare di facilitare l'individuazione di mutazioni negli stessi gruppi etnici.

Poiché recenti studi hanno associato la sovraespressione di CLDN16 con una diminuzione dell'aggressività del carcinoma al seno, ci siamo anche chiesti come le mutazioni in CLDN16 identificate come causa dell'insorgenza della FHHNC possano influire sulle eventuali capacità antitumorali della proteina. Abbiamo quindi scelto mutazioni di cui era stata studiata in precedenza l'influenza sulla funzione della proteina nel rene per poter valutare se mutazioni che comportano una completa o parziale scomparsa della funzione di CLDN16 nel rene possano causare anche diminuzione o scomparsa della sua ipotetica capacità antitumorale nelle cellule di tumori del seno. Quest'ultima parte del lavoro è ancora in corso e verrà integrata in futuro da un'analisi volta ad accertare se pazienti FHHNC siano più soggetti di individui sani alla formazione e alla diffusione metastatica del cancro al seno.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Famiglie e pazienti

Lo studio relativo all'ipomagnesemia, ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare (FHHNC) ha coinvolto 27 famiglie, tra di loro non consanguinee, di diversa origine e con uno o più componenti affetti dalla patologia, per un totale di trentuno pazienti. Due delle famiglie analizzate hanno origine argentina; due famiglie sono francesi; sei famiglie sono originarie dell'Europa dell'est; una famiglia proviene da regioni medio-orientali; sette famiglie sono originarie della città di Valencia, in Spagna; due famiglie provengono dall'Australia; una famiglia è originaria dell'India; una famiglia è cinese; una famiglia proviene dall'Inghilterra; due famiglie sono di origine tedesca; due famiglie provengono dagli Stati Uniti e due famiglie hanno origini tedesche.

I pazienti inclusi nello studio sono stati reclutati presso diversi centri ospedalieri, generalmente nel paese d'origine o di residenza. In conformità al protocollo approvato dai comitati di etica competenti per istituzione locale, tutti i pazienti e i loro parenti che hanno partecipato allo studio hanno espresso il proprio consenso informato ad un prelievo di sangue.

### 2.2 Isolamento di acidi nucleici e proteine totali da sangue

#### 2.2.1 Estrazione di DNA genomico da sangue intero

Il DNA genomico utilizzato per l'analisi mutazionale dei pazienti e dei parenti sani è stato ottenuto da sangue intero. Le estrazioni sono state fatte utilizzando il kit per purificazione di DNA genomico "Genomic DNA Purification Kit" (Gentra Puregene, QIAGEN, USA)

#### 2.2.2 Isolamento di linfociti da sangue intero con Histopaque<sup>®</sup>-1077 ed estrazione di RNA con TRIzol<sup>®</sup> Reagent

Per estrarre RNA totale da linfociti a partire da sangue intero di pazienti e di soggetti di controllo, è stata inizialmente isolata la componente ematica mononucleata utilizzando il reagente Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma-Aldrich). Un campione di sangue pari a 3 ml viene diluito con 5 ml di DPBS in condizioni di sterilità. La soluzione di sangue e DPBS viene quindi versata con cautela in una falcon contenente 3 ml della soluzione Histopaque. Occorre fare attenzione affinché le due fasi, Histopaque e sangue diluito, non si miscelino, ma restino separate. La soluzione Histopaque<sup>®</sup>-1077

contiene polisaccarosio e sodio ditrizoato, corretti ad una densità di  $1,077 \pm 0,001$  g/ml; questa composizione determina la formazione di un gradiente, che viene sfruttato per la separazione delle componenti ematiche. La separazione del plasma dalle componenti mononucleari e dagli eritrociti avviene quindi mediante centrifugazione a 1480 rpm, per 30 minuti, a temperatura ambiente. Durante la centrifugazione il polisaccarosio favorisce l'aggregazione degli eritrociti e dei granulociti e la loro successiva sedimentazione rapida. Invece i linfociti e le altre cellule mononucleari sono trattenuti nell'interfaccia tra la soluzione Histopaque<sup>®</sup>-1077 e il plasma. La contaminazione ad opera degli eritrociti è trascurabile. La maggior parte delle piastrine estranee viene rimossa tramite centrifugazione a bassa velocità nelle fasi di lavaggio.

Dal pellet cellulare così ottenuto, l'RNA è stato estratto utilizzando TRIzol<sup>®</sup> Reagent secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Per questo protocollo è necessario aver preparato le seguenti soluzioni: sodio-citrato 0.1 M in etanolo al 10%; Guanidinio idrocloride 0.3 M in etanolo al 95%; HEPES 0.1 M in soluzione acquosa; NaOH 8 mM, cloroformio.

## 2.3 Quantificazione e stima della purezza degli acidi nucleici estratti

Il DNA e l'RNA estratti da cellule di pazienti e di soggetti di controllo sono stati quantificati misurandone l'assorbanza a 260 nm con uno spettrofotometro (GeneQuantpro; Amersham Biosciences, Cambridge, England). Dal valore di assorbanza ( $A_{260}$ ), lo strumento stesso calcola, in base ad un parametro presente in memoria, la concentrazione del campione. E' noto infatti che, in una cella con percorso ottico di 10mm, una soluzione di DNA o RNA con densità ottica pari a 1.0 ha una concentrazione di 50 o 40 µg/ml, rispettivamente. Perciò i coefficienti impostati di *default* nello strumento per DNA e RNA sono rispettivamente 50 e 40. Questo metodo di misurazione spettrofotometrica permette anche di valutare la purezza del campione, cioè l'eventuale presenza di contaminanti quali proteine e solventi. Nella quantificazione spettrofotometrica di campioni di RNA e DNA il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  fornisce una stima della contaminazione da molecole che assorbono nello spettro degli UV, come le proteine. Un campione di RNA o DNA puro ha un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  di 1.8-2.2. Anche un valore elevato di assorbanza misurato a 230 nm è un significativo indice di impurità, in quanto segnala eventuale contaminazione da tamponi (Tris, EDTA e altri sali). Per campioni di acidi nucleici puri il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  deve essere maggiore di 2.9.

I prodotti di PCR purificati, direttamente o previa excisione, sono stati quantificati mediante costruzione di una curva standard di calibrazione, con DNA di fago lambda ( $\lambda$ DNA). I campioni di cui si vuol conoscere la concentrazione vengono sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio

insieme a campioni di  $\lambda$ DNA a concentrazioni note. In questo modo è possibile stimare la concentrazione dei campioni, confrontando visivamente la quantità di fluorescenza emessa da ciascuna banda in seguito ad eccitazione con UV. E' possibile effettuare questa valutazione in modo meno approssimativo applicando il software *Quantity One* (Bio-Rad), che effettua un'analisi densitometrica quantificando la fluorescenza emessa da ogni singola banda.

## 2.4 PCR e RT-PCR

### 2.4.1 Reazioni di PCR

Tutte le reazioni di PCR sono state effettuate in 50  $\mu$ l di soluzione di reazione, contenenti 100 ng di DNA genomico o di cDNA e 2 unità dell'enzima Go-Taq DNA Polimerasi. Nella tabella 2 sono riportate le concentrazioni dei principali reagenti utilizzati nelle amplificazioni.

**Tabella 2** Reagenti di PCR

Reagente	Concentrazione finale
DNA	100 ng totali
dNTPs	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Go-Taq DNA polimerasi	2 U

Le reazioni di PCR sono state eseguite in termociclatori *Peltier Thermal Cycler-200* (MJ Research, Bio-Rad)

### 2.4.2 Retrotrascrizione di RNA totale estratto da linfociti e fibroblasti

Il cDNA dei pazienti e dei soggetti di controllo analizzati è stato ottenuto retrotrascrivendo l'mRNA totale estratto con l'enzima retrotrascrittasi M-MLV-RT. Le reazioni di retrotrascrizione sono state eseguite in un volume di 50  $\mu$ l con reagenti standard nelle quantità riportate in tabella 3.

**Tabella 3** Reagenti utilizzati per le retrotrascrizioni

Reagente	Concentrazione finale
RNA	1 $\mu$ g totale
dNTPs	0.4 mM
RANDOM PRIMERS	110 ng
RNasin	20 U
DTT	0.4 mM
M-MLV RT	400 U

Le condizioni di RT-PCR utilizzate sono 60 minuti a 37°C (in un bagno termostato TRM 740, ASAL s.r.l.), per la reazione di trascrizione inversa, e 5 minuti a 97°C (in Termo Blok 780, ASAL s.r.l.) per l'inattivazione dell'enzima retrotrascrittasi.

## 2.5 Amplificazione dei frammenti genomici e del cDNA

I primer utilizzati per l'analisi mutazionale dei geni CLDN16 e CLDN19 sono riportati in tabella 3. Tutte le coppie di primer sono state disegnate a partire dalle sequenze genomiche ENSG00000113946 e ENSG00000164007 (*Ensembl Human Gene View*), in modo tale da garantire l'amplificazione e il sequenziamento delle sequenze esoniche complete, dei siti di *splicing* e di alcuni nucleotidi a 3' e a 5' di ciascun introne (tabella 4).

Per l'analisi del trascritto CLDN16 (ENST00000264734) e la rilevazione di eventuali anomalie di *splicing*, sono state utilizzate tre coppie di primer, le cui sequenze sono riportate nella tabella 5. I frammenti prodotti utilizzando queste tre coppie di primer esonici si sovrappongono e coprono l'intera sequenza di CLDN16 (Figura 19).

Tutte le reazioni di PCR sono state effettuate in 50 µl di soluzione di reazione contenenti 100 ng di DNA genomico template e 2 unità dell'enzima Go-Taq DNA Polimerasi. Per il frammento 1 di più complessa amplificazione, è stata utilizzata la polimerasi DyNAzyme EXT (2 unità/reazione), ideale per templati *GC-rich*, e la reazione è stata effettuata in DMSO al 10%. Sono stati utilizzati diversi programmi di amplificazione le cui caratteristiche sono riassunte in tabella 6.

**Tabella 4** Elenco dei primer utilizzati per il sequenziamento dei geni CLDN16 e CLDN19

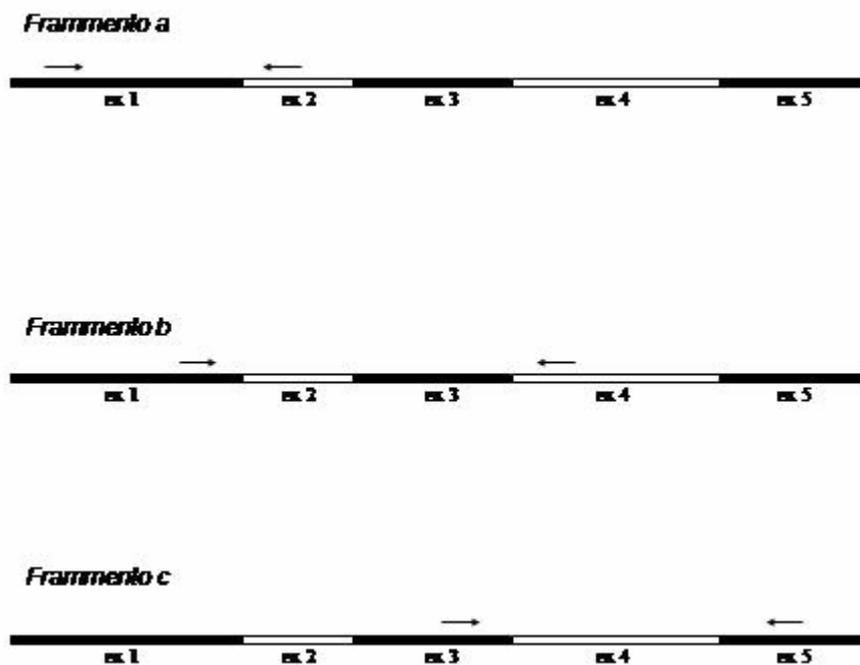
Sequenze amplificate	Primer per il sequenziamento di CLDN16 su DNA	Taglia (bp)	Pr.	°C
ex.1	CLDN16-1F CTGGCACTTGGTCTGGTGAC CLDN16-1R ATGGCAGTTGGGACTTAGCG	529	II	65°
ex.2	CLDN16-2F GGGGAAGTGAAGTGTGCCTG CLDN16-2R CCATTACAAACTGGACCGAACC	285	I	60°
ex.3	CLDN16-3F CGGAGGGGTGTGTTAATGTT CLDN16-3R GCAGGGCTGGTAGAAGTGAC	429	I	60°
ex.4	CLDN16-4F ACGCCAGCCATTTTGTGTAG CLDN16-4R ATTGGGAAAAACGATAGTGGAGG	339	I	60°
ex.5	CLDN16-5F ATAATTTTCCCAAGTTCAGTACTGAG CLDN16-5R AGGTTAGCAGAGAGAATGACG	389	II	65°

Sequenze amplificate	Primer per il sequenziamento di CLDN19 su DNA	Taglia (bp)	Pr.	°C
ex.1	CLDN19-1F CCGCACCACCTCTCCTTCTC CLDN19-1R CCTGGACCGTCAATGGGCAC	465	II	65°
ex.2-3	CLDN19-2F CTCTCAAGCTGGGCTCCTTC CLDN19-2R CGCCAGGTGATCCAGTGGAC	522	I	60°
ex.4	CLDN19-4F TGGAAGAGGTTGTGAGGCTC CLDN19-4R TCAGAGCACCTATGCCCATC	402	I	60°
ex.5	CLDN19-5F TCACTCCACTAACCAGCTCT CLDN19-5R GAGAGCTGGTTAGTGGAGTGAG	1516	II	65°

**Tabella 5** Elenco dei primer utilizzati per l'analisi del trascritto di CLDN16

Sequenze amplificate	Primer per l'analisi del trascritto CLDN16	Taglia (bp)	Pr.	°C
Frammento a	CLDN16-c1F GAAACACACTCAGCCCTTGC CLDN16-c1R GGTGCGAATCCCATCAAAAGC	450	III	55
Frammento b	CLDN16-c2F GGACTGACTGTTGGATGGTG CLDN16-c2R CACACAGAGCCAATGATTCC	337	III	55
Frammento c	CLDN16-c3F CTGATGAGCCGTACATTAAG CLDN16-c3R CTGTTCTGGATTGACTTAC	474	III	55

Pr.: Programma



**Figura 19:** Coppie di primers esonici disegnate per il gene CLDN16

**Tabella 6** Programmi di PCR**Programma I**

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	5'	95				
6	40"	94	30"	68	30"	72
30	40"	94	30"	60	30"	72
1					5'	72

**Programma II**

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	5'	95				
6	40"	94	30"	68	30"	72
30	40"	94	30"	65	30"	72
1					5'	72

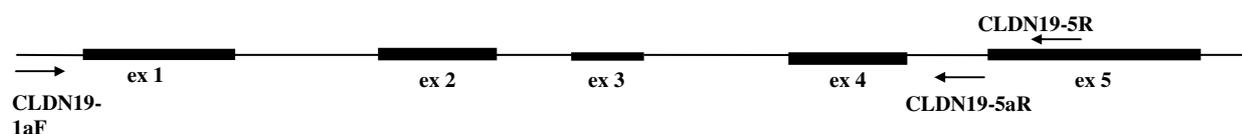
**Programma III**

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	5'	95				
6	40"	94	40"	68	1'	72
30	40"	94	40"	55	1'	72
1					20'	72

La caratterizzazione dei pazienti indiani ha richiesto la selezione di un nuovo primer forward che è stato utilizzato in reazioni di PCR unitamente al primer reverse CLDN19-5R e in altre reazioni di PCR con un nuovo primer reverse (tabella 7 e Figura 20). Per queste reazioni è stato utilizzato l'enzima PHUSION Taq che permette l'amplificazione di frammenti di dimensioni superiori alle 2 Kb. I programmi applicati per queste reazioni di amplificazione sono riassunti nella tabella 8.

**Tabella 7** Oligonucleotidi utilizzati per l'analisi della famiglia indiana

Primer per l'analisi della famiglia indiana		Taglia (bp)	Pr.	°C
Frammento a	CLDN19-1aF CTGGGCAGGCAGAATCGTTG CLDN19-5aR GAGAGCTGGTTAGTGGAGTGAG	7911	IV	57°
Frammento b	CLDN19-1aF CTGGGCAGGCAGAATCGTTG CLDN19-5R GAGAGCTGGTTAGTGGAGTGAG	8337	IV	57°



**Figura 20:** Coppie di primers utilizzate per l'analisi del gene CLDN19 in un paziente indiano

**Tabella 8** Programma di PCR relativi all'analisi della famiglia indiana

**Programma IV**

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	3'	98				
35	30"	98	40"	57	3'	72
1	30"	98	40"	57	10'	72

## 2.6 Digestione enzimatica

La mutazione G20D nel primo esone della claudina 19 è stata analizzata tramite digestione enzimatica. L'enzima utilizzato è Hpy166II. 5 µl di PCR sono stati aggiunti a una mix contenente 2 µl di BUFFER NEB 4 10X, 1 µl di Hpy166II, portata a un volume di 20 µl con acqua e incubata a 37°C per 4 ore. In presenza del nucleotide wild type (G) l'enzima non taglia il frammento di DNA che resta integro (565 bp). In presenza invece del nucleotide mutato (A) l'enzima taglia producendo due frammenti di 360 bp e 205 bp.

## 2.7 Analisi elettroforetica degli acidi nucleici

Per le analisi di tipo dimensionale e semi quantitativo e per la purificazione mediante excisione dei prodotti di PCR, è stata utilizzata la tecnica di separazione per elettroforesi su gel di agarosio, in concentrazioni pari al 2% in TBE, per frammenti di dimensioni inferiori a 3000 bp, all'1% in TBE, per frammenti di dimensioni superiori a 3000 bp, e all'1% in TBE per l'excisione di frammenti di PCR. Per la visualizzazione su gel dei prodotti di PCR è stato utilizzato Etidio Bromuro ultrapuro, addizionato al gel prima del processo di solidificazione, ad una concentrazione finale pari a 0,2 µg/ml. Prima del caricamento su gel, ai campioni da analizzare è stata aggiunta una specifica soluzione di EDTA 60mM contenente i coloranti Blu di Bromo fenolo (0,09%), Xylene Cyanol FF (0,09%) e glicerolo al 60%. La corsa elettroforetica è stata condotta in vaschette Mini Sub Cell GT Cell (Bio-Rad), a voltaggio costante di 80 V (alimentatore Power PAC 300, Bio-Rad) e con una durata variabile in relazione alle dimensioni dei frammenti, alla concentrazione del gel e alle esigenze sperimentali. Per la determinazione delle dimensioni dei frammenti di amplificazione sono state utilizzate due differenti miscele di DNA sintetico, per frammenti di dimensioni inferiori a 3000 bp (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus) e per frammenti di dimensioni superiori a 3000 bp (GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus). Al termine della corsa elettroforetica i gel sono stati analizzati utilizzando il transluminatore a raggi UV (312 nm) Gel Doc 2000 (*Bio-Rad*) dotato di fotocamera digitale per l'acquisizione delle immagini. Le immagini ottenute sono state analizzate e rielaborate applicando il software Quantity One 4.4.0 (*Bio-Rad*).

## 2.8 Purificazione degli amplificati e sequenziamento del DNA

Prima di essere sottoposti a sequenziamento, i frammenti ottenuti per amplificazione di DNA genomico o di cDNA sono stati purificati utilizzando il Kit NucleoSpin® Extract II (*Macherey and Nagel*). Nel caso di prodotti di amplificazione ricchi di bande aspecifiche si è proceduto excidendo, da gel d'agarosio all'1% in TBE, la banda di interesse, in seguito a corsa elettroforetica dell'intera mix di PCR. Le bande excise sono state sciolte a 50°C nel tampone, fornito dal kit, contenente un sale caotropico (denaturante). Quindi si è proceduto alla purificazione secondo il protocollo fornito dalla casa editrice. Questo prevede che le miscele di legame ottenute aggiungendo il tampone vengano caricate su colonnina. Il DNA, in presenza del sale denaturante, si

lega alla membrana di silice della colonnina. Quindi i sali e le componenti macromolecolari solubili contaminanti vengono rimossi con un unico lavaggio con tampone addizionato di etanolo. Il DNA puro viene infine eluito in condizioni di bassa forza ionica con un tampone alcalino (5 mM Tris-HCl, pH 8.5)

Le reazioni di sequenziamento sono state condotte presso i laboratori del gruppo Bio-Fab Research, che utilizzano, per questo tipo di analisi, sequenziatori 3730 DNA Analyzers (Applied Biosystems) e il kit di sequenziamento BigDye terminator V1.1 (Applied Biosystems).

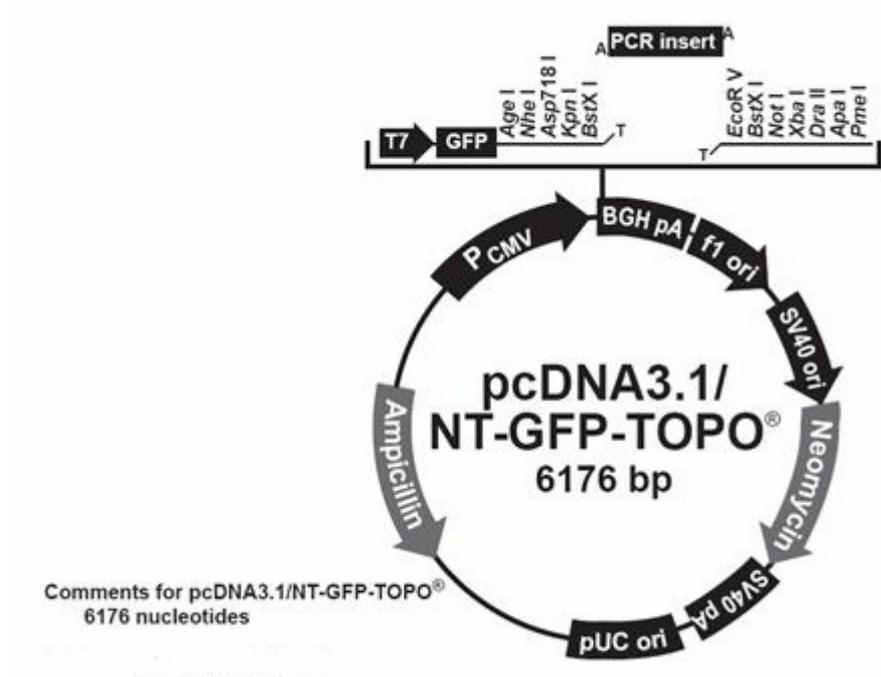
## 2.9 Clonaggio

Per effettuare il clonaggio è stato seguito il protocollo GFP Fusion TOPO® TA Expression Kits (*Invitrogen*). Dopo aver fatto una PCR utilizzando i primer forward e reverse (For: ATGACCTCCAGGACCCCACT e Rev: CACCCTTGTGTCTACAGCAT) per amplificare l'intero cDNA della claudina 16 seguendo il programma riportato in tabella 9, si è proceduto a clonarlo in cellule TOP10.

**Tabella 9** Programma di PCR per il clonaggio

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	5'	95				
6	40"	94	40"	68	30"	72
30	40"	94	40"	60	30"	72
1					30'	72

4 µl di PCR sono stati mixati con 1 µl di salt solution e 1 µl di plasmide (Figura 21) e sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente.



**Figura 21:** Plasmide utilizzato nella reazione di clonaggio

2  $\mu$ l di questa mix sono stati aggiunti in ciascuna vial contenente 50  $\mu$ l di cellule TOP10 e incubati in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente le vials sono state messe per 30 secondi a 42°C e poi sono state trasferite in ghiaccio. A questo punto si sono aggiunti 250  $\mu$ l di SOC preriscaldato a 37°C e si è incubato per 1 ora mantenendo un'agitazione di 200 rpm. Infine 100  $\mu$ l di cellule sono stati pilastrati in piastre fatte con LB-agar ampicillina e incubate overnight a 37°C.

Il giorno dopo si è proceduto a inoculare alcune colonie in falcon da 50 ml contenenti 6 ml di LB liquido e 6  $\mu$ l di ampicillina e a incubate overnight a 37°C.

## 2.10 Purificazione del plasmide

Per purificare il plasmide contenente il cDNA della claudina 16 si è seguito il protocollo della MINIPREP- JETquick Spin Column Technique.

3 ml di coltura batterica, trasferita in falcon da 15 ml, sono stati centrifugati a 2700 rpm per 5 minuti. Dopo aver tolto il surnatante sono stati aggiunti 250  $\mu$ l di soluzione G1 portata a temperatura ambiente per risospendere il pellet. 1 ml di sospensione batterica è stato poi trasferito in provette da 1,5 ml, si sono aggiunti 250  $\mu$ l di soluzione G2 e si è incubato a temperatura ambiente per 5 minuti. Si sono aggiunti 350  $\mu$ l di soluzione G3 e si è centrifugato a 16000 $\times$ g per 10 minuti a

temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito in una colonnina e si è centrifugato a 16000×g per 1 minuto. Dopo aver scartato l'eluato e aggiunto 500 µl di soluzione G4 si è centrifugato ancora a 16000×g per 1 minuto. Questo passaggio è stato ripetuto ancora una volta. Successivamente la colonnina è stata spostata in una provetta da 1,5 ml e si sono aggiunti 75 µl di acqua sterile (o buffer TE o 10mM Tris-HCl pH 8) direttamente al centro della membrana. Si è centrifugato infine a 16000×g per 2 minuti.

Il plasmide ottenuto è stato poi dosato su un gel d'agarosio al 2% in TBE (carico 1 µl del plasmide ottenuto), utilizzando il DNA del fago λ o un plasmide a concentrazione nota per ottenere la concentrazione.

## **2.11 Mutagenesi sito-diretta**

La mutagenesi sito-diretta è stata eseguita seguendo il protocollo QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol (*Stratagene*). Sono stati disegnati dei primer con una lunghezza compresa tra le 25 e le 45 basi e una temperatura uguale o superiore ai 78°C. Ognuno di questi oligonucleotidi porta più o meno a metà lunghezza una mutazione puntiforme fiancheggiata da sequenze nucleotidiche non modificate (Tabella 10).

**Tabella 10** Elenco dei primer utilizzati per la mutagenesi sito-diretta del gene CLDN16

EXON	NAME	FORWARD	T <sub>M</sub>	NAME	REVERSE
3	CLDN16-1F	5'-AGCATCCCTTGAAGCCGGTGGTAACTCGAGCGTT-3'	82 °C	CLDN16- 1R	5'-AACGCTCGAGTTACCACCGGCTTCAAGGGATGCT-3'
3	CLDN16 -2F	5'-TGAAGCTGGTGGTAACTCTAGCGTTGATGATTACTGC-3'	79 °C	CLDN16 -2R	5'-GCAGTAATCATCAACGCTAGAGTTACCACCAGCTTCA -3'
3	CLDN16- 3F	5'- GGTGGTAACTCGAGCGTTTATGATTACTGCAGATATTC-3'	78 °C	CLDN16 -3R	5'-GAATATCTGCAGTAATCATAAACGCTCGAGTTACCACC-3'
3	CLDN16 -4F	5'-CGCATCTGCTTTGTTGCTAGAGCCACGTTACTAATAGC -3'	80 °C	CLDN16 -4R	5'-GCTATTAGTAACGTGGCTCTAGCAACAAAGCAGATGCG -3'
4	CLDN16 -5F	5'-GGCTCTGTGTGGTATACTGTTGATGTGTATGTGGAACG-3'	81 °C	CLDN16 -5R	5'- CGTTCCACATACACATCAACAGTATACCACACAGAGCC-3'
4	CLDN16 -6F	5'- GGTATCCAATATAAATGTGGTTGGTCCTGTTGGCTCG-3'	79 °C	CLDN16 -6R	5'- CGAGCCAACAGGACCAACCACATTTATATTGGATACC -3'

Una volta sintetizzati i primer, è stata preparata la reazione di PCR necessaria per introdurre le mutazioni puntiformi nel gene della CLDN16 e una reazione di controllo per verificare la resa della reazione. Per la reazione di controllo è stata preparata la seguente mix:

- 5 µl di 10x reaction buffer
- 2 µl (10 ng) di plasmide di controllo pWhitescript (5 ng/µl)
- 1,25 µl (125 ng) di primer di controllo #1 [34-mer (100 ng/µl)]
- 1,25 µl (125 ng) di primer di controllo #2 [34-mer (100 ng/µl)]
- 1 µl di dNTP mix
- 3 µl di QuikSolution
- 36,5 µl di ddH2O fino a un volume finale di 50 µl
- 1 µl di *Pfu Turbo* DNA polimerasi (2,5 U/µl)

Per la reazione di mutagenesi è stata preparata la seguente mix:

- 5 µl di 10x reaction buffer
- 2 µl (10 ng) di dsDNA template
- 2 µl (125 ng) di primer oligonucleotide #1
- 2 µl (125 ng) di primer oligonucleotide #2
- 1 µl di dNTP mix
- 3 µl di QuikSolution
- 34 µl di ddH2O fino a un volume finale di 50 µl
- 1 µl di *Pfu Turbo* DNA polimerasi (2,5 U/µl)

La reazione di PCR è stata eseguita in un termociclatore *Peltier Thermal Cycler-200* (MJ Research, Bio-Rad) seguendo il programma riportato in tabella 11.

**Tabella 11** Programma di PCR per la mutagenesi sito-diretta

Cycle number	Denaturation		Annealing		Extension	
	time	°C	time	°C	time	°C
1	5'	95				
18	1'	95	1'	60	7'	68
1					7'	68

Dopo l'amplificazione i campioni sono stati posti in ghiaccio per 2 minuti per portare la reazione a o sotto 37°C e la resa dell'amplificazione è stata controllata caricandone 10 µl su un gel di agarosio 1% in TBE.

Successivamente è stato aggiunto un 1µl di *Dpn* (10 U/µl) ad ogni amplificazione e si è lasciato in incubazione a 37°C per 2 ore.

Per la trasformazione sono state utilizzate cellule ultracompetent XL10-Gold. A 45 µl di cellule sono stati aggiunti 2 µl di β-ME in falcon da 14 µl. Dopo un'incubazione di 10 minuti in ghiaccio sono stati aggiunti 5 µl di DNA trattato con *DpnI* di ogni controllo e campione in aliquote separate di cellule e si è incubato per 30 minuti in ghiaccio. Le falcon sono state poi messe in acqua

a 42°C per 30 secondi e trasferite subito dopo in ghiaccio per 2 minuti. A ciascuna falcon sono stati poi aggiunti 0,5 ml di NZY (preparato secondo la ricetta riportata in tabella 12) preriscaldato a 42°C e si è incubato per 1 ora in agitazione a 250 rpm. Infine le cellule sono state pilastrate in piastre fatte con LB-agar ampicillina contenente 80 µg/ml X-Gal e 20 mM IPTG (100 µl di cellule per piastra).

**Tabella 12** Ricetta per la preparazione dell' NZY broth

<b>NZY BROTH</b>	
NZ amine (casein hydrolysate)	1 gr
yeast extract	0,5 gr
NaCl	0,5 gr
Acqua	fino ad arrivare al volume di 100 ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M	1,25 ml
MgSO <sub>4</sub> 1 M	1,25 ml
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2 M	1 ml
Aggiustare il pH a 7.5 usando NaOH	
Autoclavare	
Filtrare	

## 2.12 Banche dati elettroniche

- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
- Ensembl Genome Server, <http://www.ensembl.org>
- NCBI Entrez PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- HighWire Press, Stanford University, <http://highwire.stanford.edu/>
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>
- SOSUI, [http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv\\_sosui.cg](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cg)

## 3 RISULTATI

### 3.1 Raccolta di materiale genetico da pazienti affetti da FHHNC

L'ipomagnesemia, ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare (FHHNC) è una tubulopatia renale rara, che si trasmette come un carattere autosomico recessivo. Essa è caratterizzata da perdita della funzione di riassorbimento del magnesio, ipercalciuria, nefrocalcinosi, formazione di calcoli renali e progressiva insufficienza renale (Weber et al, 2000; Webber et al, 2001) .

La prima proteina identificata implicata nell'insorgenza di questa malattia è la claudina-16. Questa proteina viene espressa nelle tight junctions a livello del tratto ascendente dell'ansa di Henle ed è coinvolta nel riassorbimento di magnesio e calcio. Finora sono state identificate circa 40 mutazioni nel gene CLDN16 che provocano l'insorgenza della FHHNC.

Recentemente sono state identificate tre mutazioni associabili all'insorgenza della malattia in un altro gene, il gene CLDN19. Esso codifica un'altra proteina della famiglia delle claudine, la claudina-19, espressa nelle tight junctions del tratto ascendente dell'ansa di Henle. La claudina-19 interagisce con la claudina-16 per formare un canale per il riassorbimento di magnesio e calcio.

Lo scopo iniziale di questo lavoro di tesi è stato quello identificare mutazioni nei geni CLDN16 e CLDN19 associabili all'insorgenza della FHHNC. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo cercato di raccogliere campioni di materiale genetico dal maggior numero possibile di individui affetti da questa malattia. L'analisi genetica è iniziata per tutti i pazienti a partire dal gene CLDN16 poiché l'insorgenza della FHHNC risulta più frequentemente associata a mutazioni in CLDN16 che a mutazioni in CLDN19. Successivamente, i campioni dei pazienti per i quali non sono state identificate mutazioni in questo gene, sono stati analizzati per il gene CLDN19. L'identificazione del maggior numero possibile di mutazioni in questi due geni associate all'insorgenza della FHHNC aveva anche lo scopo di cercare di stabilire una correlazione fenotipo-genotipo nei pazienti affetti da questa tubulopatia e contribuire all'analisi della relazione struttura-funzione delle claudine-16 e 19. Si è cercato, infine, di correlare l'appartenenza di ciascun paziente a una determinata etnia con il tipo di mutazione identificata, per cercare di verificare se particolari mutazioni siano più diffuse di altre in pazienti aventi la stessa origine etnica.

Lo studio iniziato nel nostro laboratorio è stato finora condotto su 27 famiglie, per ciascuna delle quali almeno un membro era affetto da FHHNC (Tabella 13). In alcune famiglie esaminate più di un individuo presentava la malattia, portando così a 33 il numero totale dei pazienti sottoposti ad analisi genetica.

Dai campioni di sangue di ciascun paziente e dei parenti sani studiati sono stati estratti il DNA genomico, l'RNA totale e le proteine totali.

**Tabella 13:** Elenco delle famiglie, con indicati per ciascuna i componenti di cui è disponibile almeno un campione biologico, coinvolte nello studio dell'FHHNC e loro provenienza. I pazienti sono evidenziati in giallo

<b>Famiglie</b>	<b>Componenti</b>	<b>Provenienza</b>
1	FHHNC_03 (paziente) FHHNC_02 (madre) FHHNC_01 (fratello)	Argentina
2	FHHNC_04 (paziente) FHHNC_05 (padre) FHHNC_06 (madre)	Francia
3	FHHNC_07 (paziente) FHHNC_23 (paziente) FHHNC_08 (padre) FHHNC_09 (madre) FHHNC_24 (paziente)	Repubblica ceca
4	FHHNC_10 (paziente)	Francia
5	FHHNC_11 (paziente)	Emirati Arabi
6	FHHNC_12 (paziente)	Romania
7	FHHNC_13 (paziente) FHHNC_14 (madre)	Romania
8	FHHNC_15 (paziente) FHHNC_16 (padre) FHHNC_17 (madre)	Slovacchia
9	FHHNC_18 (paziente) FHHNC_19 (sorella) FHHNC_20 (sorella) FHHNC_21 (padre)	Slovacchia

	FHHNC_22 (madre)	
10	FHHNC_25 (paziente) FHHNC_26 (madre) FHHNC_27 (padre) FHHNC_28 (sorella)	Spagna
11	FHHNC_29 (paziente)	Australia
12	FHHNC_30 (paziente) FHHNC_31 (madre) FHHNC_32 (padre)	India
13	FHHNC_33 (paziente) FHHNC_34 (paziente) } (sorelle) FHHNC_35 (padre) FHHNC_36 (madre)	Cina
14	FHHNC_37 (paziente) FHHNC_38 (paziente) } (sorelle)	Spagna
15	FHHNC_39 (paziente)	Spagna
16	FHHNC_40 (paziente)	Spagna
17	FHHNC_41 (paziente)	Spagna
18	FHHNC_42 (paziente) FHHNC_43 (paziente) } (fratello e sorella)	Spagna
19	FHHNC_44 (paziente)	Spagna
20	FHHNC_45 (paziente)	Australia
21	FHHNC_46 (paziente)	Inghilterra
22	FHHNC_47 (paziente)	USA
23	FHHNC_48 (paziente) FHHNC_49 (paziente) } (fratelli) FHHNC_50 (madre)	Argentina

	FHHNC_51 (padre) FHHNC_52 (nonna) FHHNC_53 (nonna)	
24	FHHNC_54 (paziente)	Germania
25	FHHNC_55 (paziente)	Germania
26	FHHNC_56 (paziente)	USA
27	FHHNC_58 (paziente) FHHNC_57 (padre)	Polonia

## 3.2 Quadro clinico dei pazienti studiati

Tutti i soggetti studiati presentavano i tratti caratteristici della FHHNC: perdita della funzione di riassorbimento del magnesio, ipercalciuria, nefrocalcinosi, formazione di calcoli renali, progressiva insufficienza renale, ricorrenti infezioni renali, spasmi muscolari, convulsioni e anomalie oculari. Per alcuni di essi ci sono stati forniti dati clinici particolareggiati che ci hanno permesso di osservare come ciascun caso raccolto risultasse fenotipicamente singolare per la progressione del quadro clinico complessivo.

Solitamente la FHHNC ha un decorso clinico progressivo. E' dunque possibile che per i casi di non recente diagnosi il quadro clinico possa aver subito un'evoluzione: alcuni dei soggetti descritti potrebbero aver manifestato o potranno manifestare nel corso della loro vita nuovi tratti clinici di cui erano o sono attualmente privi oppure vedranno aggravarsi alcuni segni e sintomi del proprio quadro patologico.

Il paziente FHHNC\_04 è nato il 15/6/1999 e la malattia è stata diagnosticata a 28 mesi dalla nascita. La crescita è finora normale. La filtrazione glomerulare era di 80 ml/min per 1.73 m<sup>2</sup> nell'aprile 2007. Dalla diagnosi al 2006 la presenza di calcio nelle urine era molto alta. Dopo essere stato sottoposto a diversi trattamenti la concentrazione di calcio nelle urine si è abbassata sensibilmente. La sorella, nata il 16/3/2001 e indicata dalla sigla FHHNC\_07, presentava un quadro clinico più grave. Soffriva infatti di acidosi tubulare distale, nefrocalcinosi e sordità bilaterale. La filtrazione glomerulare era di 133 ml/min per 1.73 m<sup>2</sup> nell'aprile 2007. I genitori, consanguinei tra loro, non presentavano sintomi caratteristici della malattia.

La paziente FHHNC\_10 è nata il 18/11/1983. Presentava nefrocalcinosi, litiasi e ritardo nella crescita associata a obesità. Inizialmente ha sofferto di ipocalcemia associata ad acidosi, ipocalcemia, ipomagnesemia, ipercalciuria e ipofosfatemia. Nel 2003 la filtrazione glomerulare era di 33 ml/min per 1.73 m<sup>2</sup>. Il rene sinistro non era funzionante a causa della litiasi. È stata trattata con calcio, alfacalcidolo, magnesio, bicarbonato di sodio e colicalciferolo. La paziente ha due fratelli e due sorelle. Tre di essi erano asintomatici mentre una sorella soffriva della stessa patologia renale, sebbene non presentasse litiasi e ritardo nella crescita. I genitori erano anch'essi asintomatici.

La paziente FHHNC\_12 è nata il 14/09/1996. Ha subito un primo ricovero all'età di 2 anni durante il quale fu riscontrata ipomagnesemia. Furono eseguiti numerosi accertamenti per escludere una tubulopatia renale, al termine dei quali si escluse una tubulopatia inquadrabile tra quelle note sulla base del riscontro di ipomagnesemia isolata in assenza di altre anomalie degli elettroliti sierici, dell'equilibrio acido-base e degli elettroliti urinari. In particolare fu esclusa l'ipercalciuria ed

ecograficamente i reni risultarono normali, in assenza di segni di nefrocalcinosi. Negli anni successivi la paziente fu sottoposta a supplementazione con sali di magnesio, risultò del tutto asintomatica e non vennero più eseguiti controlli nefrologici. Nel 2007 è stata ricoverata nuovamente per un'insufficienza renale in seguito ad una gastroenterite. Sottoposta a esami presentava una creatininemia intorno all'1.5-1.7 mg/dl, corrispondente a un valore di filtrazione glomerulare pari a 48 ml/min. Per quanto riguarda la funzione urinaria si osservava una ipostenuria, in assenza di altre significative anomalie. L'equilibrio acido-base era nella norma e anche gli elettroliti sierici erano normali, compresa la magnesemia. L'insieme dei dati orientava quindi verso una possibile forma di insufficienza renale cronica di verosimile origine interstiziale. Pertanto, anche in considerazione del dato anamnestico di familiarità per insufficienza renale cronica terminale in linea materna, è stato eseguito un accertamento istologico. Questa analisi ha mostrato un assottigliamento della componente corticale ed una sclerosi glomerulare globale interessante circa il 50% dei glomeruli presenti nel frammento. Gli altri glomeruli non presentavano segni di tipo infiammatorio. L'interstizio si presentava danneggiato in particolare nella zona corticale dove i tubuli erano diradati e con epitelio appiattito, e lo spazio peritubulare era infiltrato da linfociti. Nella zona interstiziale sono stati inoltre rilevati depositi di sali di calcio con reazione infiammatoria di tipo granulomatoso gigantocellulare che potrebbero riferirsi ad iniziale nefrocalcinosi. Depositi di sali di calcio sono stati rilevati anche in sede intratubulare. Il dato istologico ha consentito di escludere un processo infiammatorio glomerulare e ha indirizzato la diagnosi verso la FHHNC. In ecografia non era ancora visualizzabile una nefrocalcinosi. Non è stata inoltre dimostrata una significativa ipercalciuria e ciò ha suggerito un suo andamento alternante. La magnesemia è risultata normale a causa dell'insufficienza renale che determina sempre una ritenzione del magnesio compensando così l'ipomagnesemia provocata dalla FHHNC. La paziente al momento viene trattata con somministrazione di magnesio e citrato di potassio e con un adeguato apporto idrico.

Il paziente FHHNC\_15 è un bambino di 5 anni che dall'età di 2 anni è soggetto a coliche renali. Presenta una grave ipomagnesemia, ipercalciuria, ipocalemia associata ad acidosi e una grave nefrocalcinosi bilaterale. La filtrazione glomerulare è risultata di 59 ml/min. I genitori sono asintomatici e non consanguinei ma sia una sorella del padre sia il nonno paterno sono stati soggetti a frequenti coliche renali.

Il paziente FHHNC\_18 è un bambino di 10 anni che presenta ipomagnesemia, ipercalciuria, iperuricemia e un astigmatismo ipermetropico. La filtrazione glomerulare è di 86 ml/min. I raggi X addominali hanno evidenziato una nefrolitiasi e nefrocalcinosi bilaterali con una riduzione del parenchima renale. I genitori non sono consanguinei ma presentano entrambi nefrolitiasi.

Il paziente FHHNC\_30 è nato il 25/12/1997. Presenta ipomagneemia, ipercalciuria, acidosi tubulare renale, tubulopatia congenita, iperparatiroidismo, iperoxaluria e nefrocalcosi bilaterale. I genitori sono asintomatici e consanguinei. Su questo paziente in passato era già stata fatta un'analisi genetica per la claudina-16 senza identificare alcuna mutazione correlabile all'insorgenza della malattia.

### 3.3 Analisi mutazionale del gene CLDN16

Fino ad anni recenti l'insorgenza della FHHNC è stata imputata a mutazioni di un solo gene, CLDN16. Gli studi condotti in passato su individui affetti da questa tubulopatia hanno portato all'identificazione nel gene CLDN16 di mutazioni, negli esoni e nelle regioni introniche che li fiancheggiano, correlate all'insorgenza della patologia (Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002; Kang et al, 2005; Tajima et al, 2005; Tasic et al, 2005; Sanjad et al, 2006; Turkem et al, 2006; Staiger et al, 2007; Peru et al, 2008; Al-Haggar et al, 2009). Per questo motivo, la caratterizzazione genetica-molecolare dei pazienti FHHNC da noi raccolti è consistita, inizialmente, nell'analisi della sequenza codificante del gene CLDN16, che si compone di 5 esoni, e delle regioni di splicing.

Per questo tipo di analisi sono state disegnate 5 coppie di oligonucleotidi, utilizzate per l'amplificazione e il successivo sequenziamento di ciascun esone. Ciascuna coppia è stata posizionata sul gene CLDN16 in modo che la reazione di sequenziamento coprisse, oltre all'intera sequenza esonica, anche circa 50 bp a monte e a valle delle giunzioni introne-esone alle estremità 5' e 3'. Sono state inoltre preparate alcune coppie di oligonucleotidi a localizzazione esonica per l'analisi dei trascritti CLDN16 dei pazienti che mostravano mutazioni in siti regolatori di splicing.

L'analisi genotipica è stata effettuata su tutti i soggetti malati raccolti e su alcuni parenti sani, portatori obbligati o potenziali di una mutazione. I risultati dei sequenziamenti sono stati confrontati con la sequenza di riferimento riportata in banca dati Ensembl (Gene ID: ENSG00000113946).

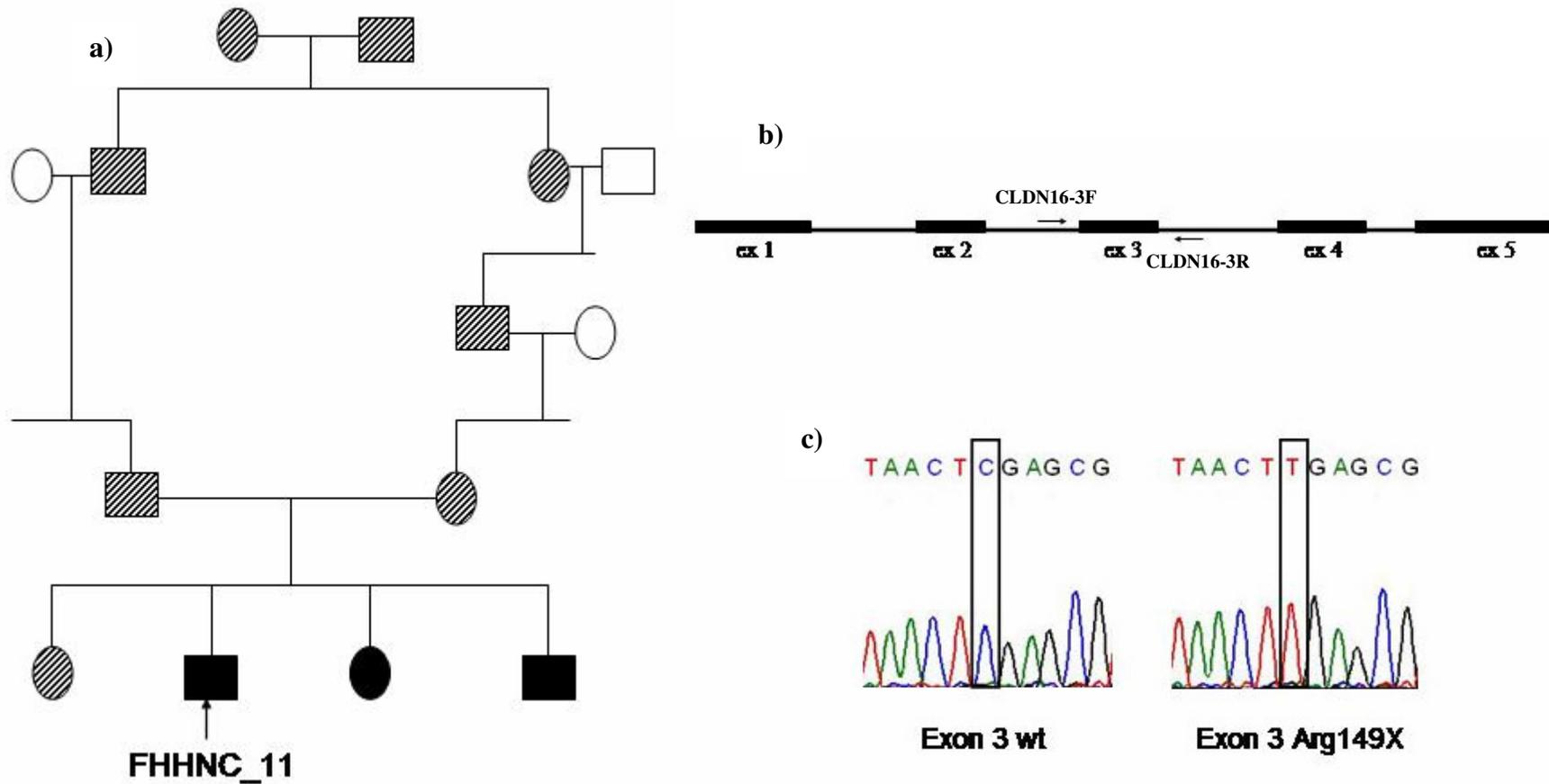
In 12 pazienti FHHNC su 33 sono state identificate mutazioni del gene CLDN16 legate alla patologia. Complessivamente sono state individuate 5 differenti mutazioni già note in letteratura, tre nuove mutazioni non senso e quattro nuove variazioni genomiche, che coinvolgono sequenze codificanti il gene CLDN16. La numerazione dei nucleotidi utilizzata per l'identificazione genomica delle mutazioni è riferita all'adenosina della tripletta ATG di inizio lettura del trascritto.

#### 3.3.1 Mutazione Arg149X

La mutazione del codone 149, che porta alla formazione di una tripletta di terminazione precoce, è una mutazione non senso già riportata in letteratura (Simon et al, 1999). La formazione di un codone di terminazione prematuro comporta la perdita di 156 amminoacidi della proteina nativa.

Questa mutazione è stata individuata nel paziente FHHNC\_11, di origine araba, in omozigosi. Come si può vedere in Figura 22, i genitori di questo paziente sono consanguinei e tre

dei loro figli, compreso il paziente da noi analizzato, sono affetti da FHHNC. Poiché in questo paziente la mutazione individuata è in omozigosi, si può ragionevolmente affermare che essa sia portata in eterozigosi dai genitori sani e in omozigosi da tutti i figli malati.



**Figura 22: Caratterizzazione genetica del paziente FHHNC\_11**

(a) L'immagine mostra il pedigree del paziente. Gli elementi dell'albero colorati in nero rappresentano i soggetti malati; gli elementi tratteggiati i soggetti sani ma portatori di una mutazione patogenetica in eterozigosi; gli elementi bianchi rappresentano gli individui sani e non portatori di mutazioni patogenetiche (b) Le frecce identificano la coppia di oligonucleotidi utilizzata per l'amplificazione del frammento contenente l'esone 3. (c) Elettroferogrammi relativi al sequenziamento del frammento. A sinistra è riportato il l'elettroferogramma di un frammento di controllo che non presenta la mutazione mentre a destra è riportato quello del paziente nel quale si può osservare il cambiamento di una C con una T in omozigosi.

### 3.3.2 Mutazione Leu151Phe

La mutazione del codone 151, che porta a un cambiamento amminoacidico da leucina a fenilalanina, è una mutazione già riportata in letteratura (Weber et al, 2000). La leucina 151 si trova nel primo loop extracellulare. La proteina così mutata si localizza ancora nelle tight junctions ma si ha una parziale scomparsa della funzione della claudina-16. Questa particolare mutazione è molto diffusa tra i malati di FHHNC originari dell'Europa dell'est. In effetti, essa è stata individuata in alcuni dei nostri pazienti di tale provenienza. Nel paziente FHHNC\_13, originario della Romania, si trova in omozigosi; nei pazienti FHHNC\_15 e FHHNC\_18, entrambi originari della Slovacchia, si trova in eterozigosi (Figura 23); nel paziente FHHNC\_47, proveniente dagli USA ma la cui famiglia è di origini polacche, si trova in eterozigosi; e nel paziente FHHNC\_58, originario della Polonia, si trova in omozigosi.

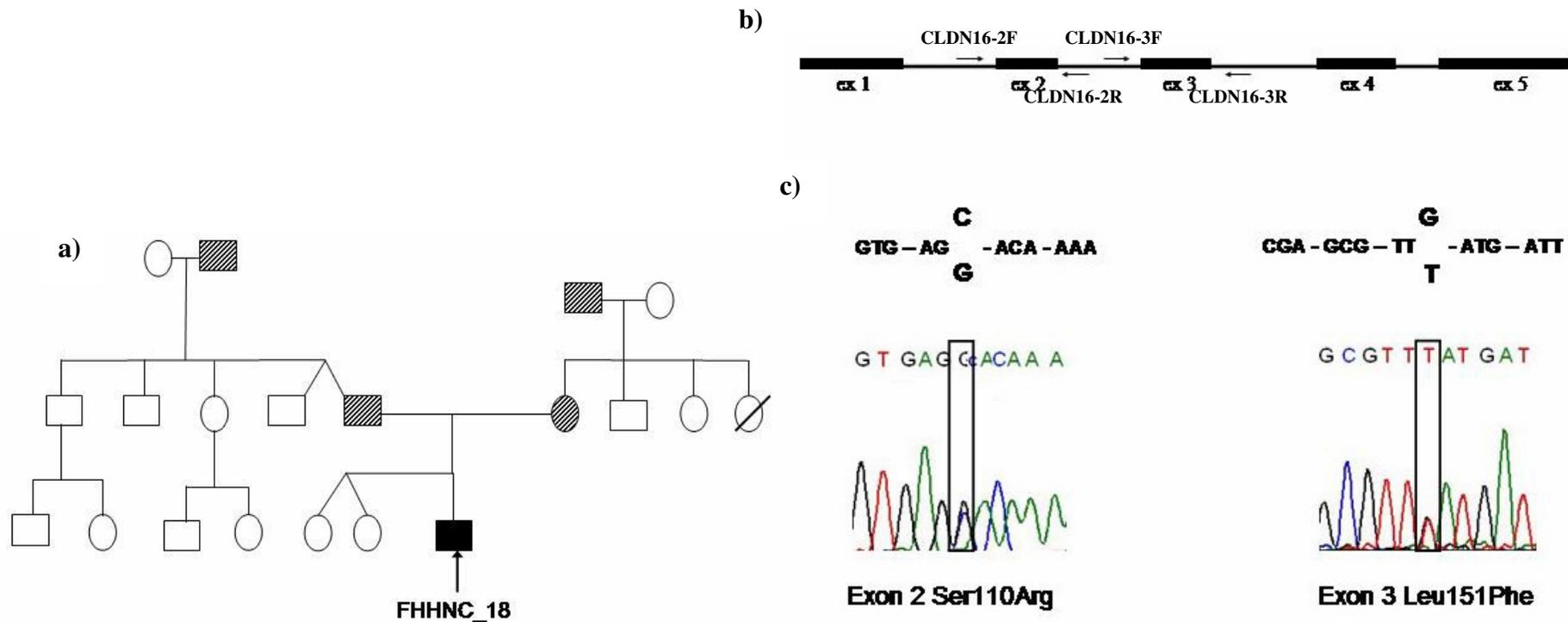
### 3.3.3 Mutazione Ser110Arg

La mutazione del codone 110, che porta a un cambiamento amminoacidico da serina a arginina, è una mutazione già riportata in letteratura (Konrad et al, 2008). La serina 110 si trova nel primo loop extracellulare. Questa mutazione è stata individuata in eterozigosi nel paziente FHHNC\_18 (Figura 23).

### 3.3.4 Mutazione Asn123fs

La mutazione del codone 123 è una mutazione già nota in letteratura (Weber et al, 2001). La delezione di un'adenina nel codone 123 provoca un frameshift che porta alla formazione di una tripletta di stop prematuro nel codone 143. Si genera così una proteina tronca che perde 162 amminoacidi rispetto alla proteina nativa.

Nei nostri pazienti è stata individuata in eterozigosi nei fratelli FHHNC\_23 e FHHNC\_24, originari della Repubblica ceca.



**Figura 23: Caratterizzazione genetica del paziente FHHNC\_18.**

(a) L'immagine mostra il pedigree del paziente. Gli elementi dell'albero colorati in nero rappresentano i soggetti malati; gli elementi tratteggiati i soggetti sani ma portatori di una mutazione patogenetica in eterozigosi; gli elementi bianchi rappresentano gli individui sani e non portatori di mutazioni patogenetiche; gli elementi sbarrati gli individui morti.

(b) Le frecce identificano le coppie di oligonucleotidi utilizzata per l'amplificazione dei frammenti. La prima coppia è stata disegnata in modo che il frammento contenesse l'esone 2 e le sequenze introniche fiancheggianti; la seconda coppia è stata disegnata per un frammento contenente l'esone 3 e le sequenze introniche fiancheggianti.

(c) Elettroferogrammi relativi al sequenziamento dei frammenti. A sinistra è riportato l'elettroferogramma del paziente relativo al frammento contenente l'esone 2 che presenta la mutazione in eterozigosi del nucleotide C in G, mentre a destra è riportato quello del paziente relativo al frammento contenente l'esone 3 nel quale si può osservare la mutazione in eterozigosi di una G con una T. Sopra a ciascun elettroferogramma è riportata una parte di sequenza con evidenziata la presenza sui 2 alleli di basi diverse in corrispondenza delle mutazioni identificate.

### 3.3.5 Mutazione Leu145Pro

La mutazione del codone 145, che porta a un cambiamento amminoacidico da leucina a prolina, è una mutazione già riportata in letteratura (Weber et al, 2000). La leucina 145 si trova nel primo loop extracellulare. La proteina così mutata si localizzava ancora nelle tight junctions ma si aveva la perdita completa della sua funzione.

Questa particolare mutazione è stata individuata in eterozigosi nei pazienti FHHNC\_23 e FHHNC\_24, originari della Repubblica ceca.

### 3.3.6 Nuove mutazioni e nuove variazioni identificate

Nel corso delle analisi sui pazienti sono state individuate delle nuove variazioni. Tre di esse possono essere classificate come mutazioni patogenetiche in quanto danno origine a codoni di stop prematuri e quindi la proteina tradotta risulta tronca.

La prima nuova mutazione non senso identificata è stata trovata nell'esone 4 in eterozigosi nella paziente FHHNC\_03 di origine argentina. La mutazione si trova nel codone 213 e comporta il cambiamento di una tirosina in un codone di terminazione. Questo comporta la perdita di 92 amminoacidi della proteina nativa.

La seconda mutazione non senso è stata individuata in omozigosi nel paziente FHHNC\_46, proveniente dall'Inghilterra. Essa si trova nell'esone 2, codone 117 e provoca il cambiamento di un triptofano in una tripletta di terminazione, determinando la perdita di 188 amminoacidi della claudina-16 nativa.

L'ultima mutazione non senso è stata identificata nell'esone 2 in eterozigosi nel paziente FHHNC\_56, originario degli USA. È una mutazione del codone 114 che porta alla formazione di una tripletta di terminazione precoce in sostituzione di un'arginina. Essa comporta la perdita di 191 amminoacidi della proteina nativa.

Sono state anche identificate quattro nuove variazioni che causano cambiamenti amminoacidici.

La prima di queste nuove variazioni è stata individuata nell'esone 4 in eterozigosi nella paziente FHHNC\_03 di origine argentina e comporta il cambiamento della glicina 239 in valina. La stessa variazione, sempre in eterozigosi, è stata trovata anche nella madre e nel fratello.

La seconda nuova variazione è stata trovata nell'esone 5 in eterozigosi nella paziente FHHNC\_12, originaria della Romania. Questa si trova nel codone 294 e provoca il cambiamento di un glutammato in una lisina.

La terza variazione si trova nell'esone 2, codone 116, in eterozigosi, del paziente FHHNC\_15, originario della Slovacchia. Essa provoca il cambiamento di una leucina in una fenilalanina.

L'ultima variazione trovata in eterozigosi è localizzata anch'essa nell'esone 2, codone 120 del paziente FHHNC\_56, originario degli USA, e comporta il cambiamento di una cisteina in una tirosina.

Per cercare di verificare quanto siano evolutivamente conservati gli amminoacidi per i quali sono state individuate le nuove variazioni, è stato fatto un confronto della sequenza proteica della claudina-16 umana con quella di altre specie di vertebrati. I risultati ottenuti sono riportati in figura 24. Per quanto riguarda gli amminoacidi coinvolti nelle nuove variazioni nell'esone 2, la prima nel codone 116 con il cambiamento da CTC a TTC e la conseguente sostituzione di una leucina con una fenilalanina, e l'altra nel codone 120 con il cambiamento da TGC a TAC a la conseguente sostituzione di una cisteina con una tirosina, si osservava una totale conservazione tra le proteine tra le diverse specie. Anche per l'amminoacido che presenta una nuova variazione nell'esone 4, cioè il cambiamento da GGA a GTA che comporta la sostituzione di una glicina con una valina, si ha conservazione tra le diverse specie. Per quanto riguarda infine la variazione nell'esone 5, cioè il cambiamento nel codone 294 da GAG a AAG e quindi la sostituzione di un acido glutammico con una lisina, si può notare una quasi totale conservazione tra le diverse specie. Infatti solo in *Gallus gallus* si trova un amminoacido diverso.

Per le tre nuove mutazioni non senso identificate si può osservare che i codoni coinvolti sono conservati in quasi tutte le specie considerate. L'unica eccezione è rappresentata da *Danio rerio*, che appartiene alla classe dei pesci, nel quale tutti e tre gli amminoacidi considerati sono variati rispetto a quelli delle proteine degli altri vertebrati.

## CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

cldn16_Human          -----MTSRTPLLVTACLYYSYCNSRHLQQGVRK 29
cldn16_Pan_troglodytes -----MTSRTPLLVTACLYYSYCNSRHLQQGVRK 29
cldn16_Mouse          -----
cldn16_Monodelphis_domestica -----
cldn16_Gallus_gallus  -----
cldn16_Xenopus_tropicalis -----
cldn16_Danio_rerio   -----

cldn16_Human          SKRPVFSHCQVPETQKTDTRHLSGARAGVCPCHPDGLLATMRDLLQYIA 79
cldn16_Pan_troglodytes SKRPVFSHCQVPETQKTDTRHLSGARAGVCPCHLDGLLATMRDLLQYIA 79
cldn16_Mouse          -----MKDLLQYAA 9
cldn16_Monodelphis_domestica -----MRDLLQYVA 9
cldn16_Gallus_gallus  -----MPLDVPTP-----AGMRFFLQYAG 19
cldn16_Xenopus_tropicalis -----MRTLLEYTG 9
cldn16_Danio_rerio   -----MDPIIEAVA 9
                        *   :::  .

cldn16_Human          CFFAFFSAGFLIVATWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNAFDG 127
cldn16_Pan_troglodytes CFFAFFSAGFLIVATWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNAFDG 127
cldn16_Mouse          CFLAIFSTGFLIVATWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNAFDG 57
cldn16_Monodelphis_domestica CCLAFFSAGFLIVATWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNAFDG 57
cldn16_Gallus_gallus  CFFAFFSTGFLIASTWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNVFDG 67
cldn16_Xenopus_tropicalis FFLAFVSAGFLIAATWTDWVNADD--SLEVSTKCRGLWNECVTNVFDG 57
cldn16_Danio_rerio   LFLGFVSWTMVGITIPNRYKVVSSLDGTVITSTLYENLWNSCATDSTG- 58
                        :...*  ::  :  .  *  ..*  :  .**  ..**  .*.*:  .

cldn16_Human          IRTCDEYDSILAEHPLKLVVTRALMITADILAGFGFLTLLGLDCVKFLP 177
cldn16_Pan_troglodytes IRTCDEYDSILAEHPLKLVVTRALMITADILAGFGFLTLLGLDCVKFLP 177
cldn16_Mouse          IRTCDEYDSIYAEHPLKLVVTRALMITADILAGFGFITLLGLDCVKFLP 107
cldn16_Monodelphis_domestica IRTCDEYDSILAEHPLKLVVTRALMITANILAALGFSLLLGLHCVKFLP 107
cldn16_Gallus_gallus  IQTCDEYDSIFAHPVPLVTRAMMITADILAGFGFLFVLGLDCVKFLP 117
cldn16_Xenopus_tropicalis IRTCDEYDSIYAEHPMKLVATRGLMITADILAGFGFIIFLLGLDCVKFLP 107
cldn16_Danio_rerio   VHQCREFPSLLALS-GYIQASRALMIAAVVSGTFGVVATLIGMQCSKAGG 107
                        ::  *  *:  *  *  :  :  *  .**:*  :  .  .*:  :  :  .*. *

cldn16_Human          DEPYIKVRCFVAGATLLIAGTPGIIGSVWYAVDVYVERSTLVLHNIFLG 227
cldn16_Pan_troglodytes DEPYIKVRCFVAGATLLIAGTPGIIGSVWYAVDVYVERSTLVLHNVFLG 227
cldn16_Mouse          DDPQIKVRLCFVAGATLLIAGTPGIIGSVWYAVDVYVERSSLVLHNIFLG 157
cldn16_Monodelphis_domestica NEPLIKVRCFVAGILLVIAGVPGIVGSVWYVIDVYVERSTLVLHNIFLG 157
cldn16_Gallus_gallus  DEPLIKLRIICLVSGVTLLIAGLPGITGSVWYVIDVYVERSSLVLHNIFLG 167
cldn16_Xenopus_tropicalis DESDVKLKICYVAGITLLIGVPGIIGSVWYVIDVYVERSTLVIHNVFLG 157
cldn16_Danio_rerio   ENYVLKGRVAGTGGVFFLLQGLCTMISVSWYAANITQEFFNPLYP---G 153
                        ::  :*  :..  ..*  :..  *  :  .  ***  :  *  .  :  *

cldn16_Human          IQYKFGWSCWLG MAGSLGCF LAGAVLTCCLYL F KDVG P-ERNYPYSLRKA 276
cldn16_Pan_troglodytes IQYKFGWSCWLG MAGSLGCF LAGAVLTCCLYL F KDVG P-ERNYPYSLRKA 276
cldn16_Mouse          IQYKFGWSCWLG MAGSLGCF LAGALLTCCLYL F KDVG P-ERNYPYAMRKP 206
cldn16_Monodelphis_domestica IQYKFGWSCWLG MAGALGCF LAGAVLTCCLYL F KD LG P-ERSYAYSLRKT 206
cldn16_Gallus_gallus  IQYKFGWSCWLG MAGSLGCF LSGSLLTCCMYL FRETSSGRLHSAYSLRKG 217
cldn16_Xenopus_tropicalis IQYKFGWSCWLG MIGSLGCF LCGGILILCHYL FKENGY--GRNHFSRKT 205
cldn16_Danio_rerio   QKYEIGEALYIG WASAVLAICGGVCLMF SCKLGTEKKT-----A 192
                        :***:  :  :  *  .:  .:  *  *  .  *  :

cldn16_Human          YSAAGVSMAKSYSAP-RTETAKMYAVDTRV 305
cldn16_Pan_troglodytes YSAAGVSMAKSYSAP-RTETAKMYAVDTRV 305
cldn16_Mouse          YSTAGVSMAKSYKAP-RTETAKMYAVDTRV 235
cldn16_Monodelphis_domestica YSHAGMSMAKSYVPP-RTETAKMYAVDTRV 235
cldn16_Gallus_gallus  YSSAGTIVTNVHLPSSQTETAKMYAVDTRV 247
cldn16_Xenopus_tropicalis YLRSGGSAAKFDSHP-RTETAKMYAVDTIV 234
cldn16_Danio_rerio   YSYHPTRETIVYSASASRRETQSTYGNAYV 222
                        *  :  .  :  *  .  *  .:  *

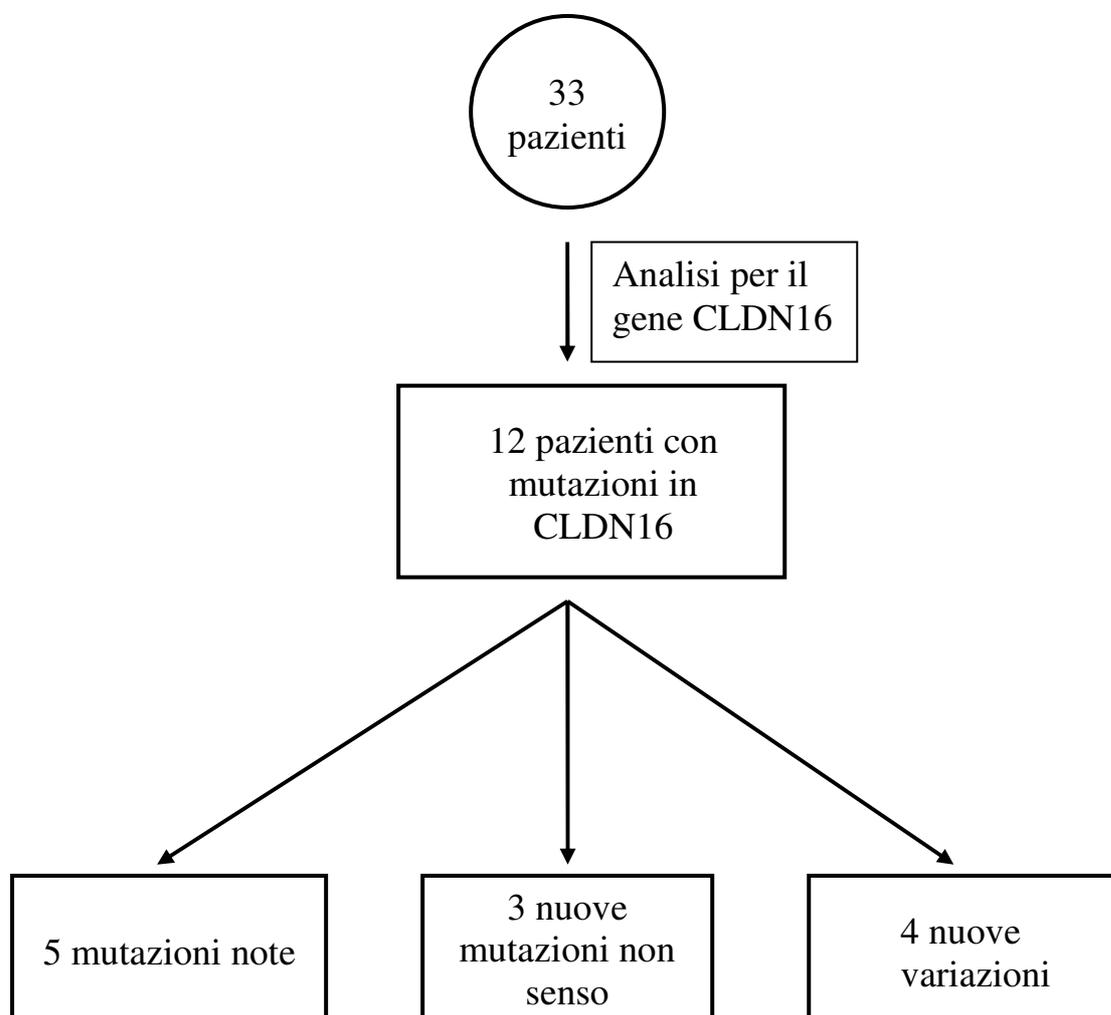
```

**Figura 24: Allineamento della sequenza proteica della claudina 16 di diverse specie di vertebrati.**

In giallo sono evidenziati gli amminoacidi coinvolti nelle nuove variazioni identificate e conservati tra le specie; in verde sono evidenziati gli amminoacidi conservati nelle diverse specie e implicati nelle nuove mutazioni non senso scoperte; in rosso gli amminoacidi che variano tra le specie.

Al termine delle analisi condotte sul gene CLDN16 sono state individuate cinque mutazioni già note, tre nuove mutazioni non senso e quattro nuove variazioni in 12 pazienti appartenenti a 11 diverse famiglie (Figura 25).

Per i restanti 21 pazienti per i quali non è stata identificata nessuna mutazione nel gene CLDN16 si è deciso di analizzare il gene che codifica per la claudina-19.



**Figura 25:** Schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'analisi genomica del gene CLDN16 condotta su campioni di 33 pazienti pervenuti nel nostro laboratorio

### 3.4 Analisi mutazionale del gene CLDN19

Recentemente è stato identificato un nuovo gene responsabile dell'insorgenza del FHHNC, CLDN19. Gli studi condotti negli ultimi anni su tre famiglie FHHNC con origini diverse (spagnola, svizzera e turca) hanno portato all'identificazione anche in questo gene di mutazioni negli esoni e che cosegregano con la sindrome FHHNC (Konrad et al, 2006).

Per questo motivo, la caratterizzazione genetico-molecolare dei 21 pazienti FHHNC risultati negativi per mutazioni nel gene CLDN16 è proseguita con l'analisi della sequenza codificante del gene CLDN19, che si compone di cinque esoni.

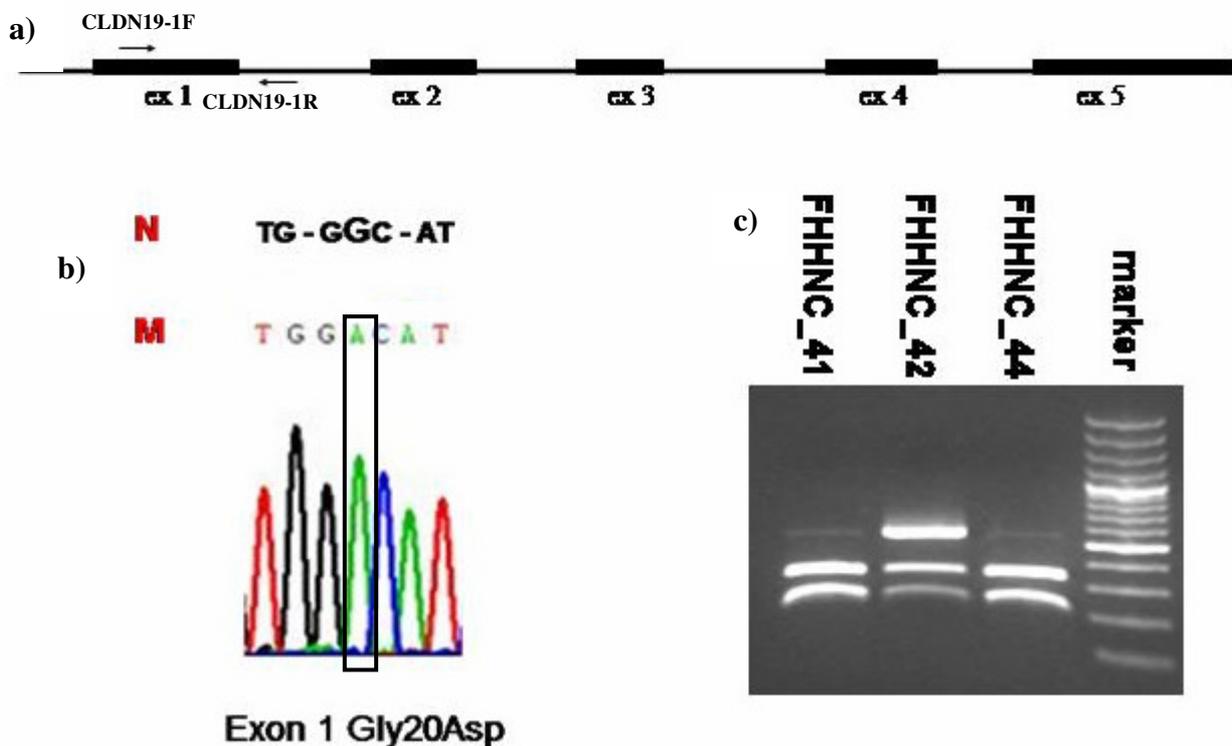
Anche per questo tipo di analisi sono state disegnate cinque coppie di oligonucleotidi, utilizzate per l'amplificazione e il successivo sequenziamento di ciascun esone. Ciascuna coppia è stata posizionata sul gene CLDN19 in modo che la reazione di sequenziamento coprisse, oltre all'intera sequenza esonica, anche circa 50 bp a monte e a valle delle giunzioni introne-esone alle estremità 5' e 3'. È stato inoltre individuato un enzima di restrizione, Hpy166II, che taglia il frammento contenente l'esone 1 della claudina 19 in presenza della mutazione Gly20Asp. I risultati dei sequenziamenti sono stati confrontati con la sequenza di riferimento riportata in banca dati Ensembl (Gene ID: ENSG00000164007).

In 15 dei 21 pazienti FHHNC analizzati per questo gene sono state identificate mutazioni del gene CLDN19 già riportate come responsabili della patologia. Complessivamente sono state rilevate: una mutazione già nota in letteratura, una delezione quasi totale del gene e una nuova variazione genomica, che coinvolge sequenze codificanti del gene CLDN19.

#### 3.4.1 Mutazione Gly20Asp

La mutazione del codone 20, che causa una sostituzione amminoacidica, è una mutazione già riportata in letteratura (Konrad et al, 2006). Essa comporta la sostituzione di una glicina con un acido aspartico. La glicina 20 si trova nel primo dominio transmembrana. La proteina così mutata non si localizza più nelle tight junctions ma nel reticolo endoplasmatico dove viene degradata. In questo modo si ha la perdita completa della funzione della claudina-19. Questa particolare mutazione è stata finora identificata solo in famiglie originarie di Valencia e ha portato a ipotizzare che la mutazione abbia qui avuto origine e sia rimasta delimitata a un gruppo particolarmente ristretto di individui, presumibilmente tutti discendenti da uno stesso antenato.

Anche nei pazienti analizzati nel nostro laboratorio la mutazione Gly20Asp è stata identificata in tutti gli individui provenienti da Valencia o in famiglie originarie di questa città. Nello specifico, i pazienti FHHNC\_25, FHHNC\_37, FHHNC\_38, FHHNC\_39, FHHNC\_40, FHHNC\_41, FHHNC\_44, tutti provenienti da Valencia, portavano la mutazione in omozigosi; i pazienti FHHNC\_42 e FHHNC\_43, anch'essi provenienti da Valencia, portavano la mutazione in eterozigosi; i pazienti FHHNC\_48 e FHHNC\_49, provenienti dall'Argentina ma la cui famiglia è originaria di Valencia, portavano la mutazione in omozigosi (Figura 26).



**Figura 26: Caratterizzazione genetica dei pazienti FHHNC\_41, FHHNC\_42 e FHHNC\_44**

(a) Le frecce rappresentano la coppia di oligonucleotidi utilizzata per l'amplificazione del frammento. (b) Elettroferogramma relativo al sequenziamento del frammento del paziente FHHNC\_41. Si può osservare il cambiamento in omozigosi di G in A. Sopra l'elettroferogramma è riportata una parte di sequenza con evidenziata la G nella forma nativa non mutata. (c) Il gel mostra la corsa elettroforetica dei prodotti della digestione enzimatica ottenuta utilizzando l'enzima HpyI66II ed effettuata dopo PCR, utilizzando i primer riportati nello schema (a). Le bande di 205 bp e 360 bp si generano a causa del taglio del frammento operato dall'enzima in presenza della base mutata A, mentre la banda di 565 bp non viene tagliata dall'enzima. Il gel mostra che i frammenti dei pazienti FHHNC\_41 e FHHNC\_44 sono totalmente tagliati, mentre il frammento del paziente FHHNC\_42 viene tagliato solo al 50% circa. Nella parte destra del gel si trova il marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. Le due bande più intense corrispondono a 500 bp e 1000 bp.

### 3.4.2 Delezione del gene CLDN19

Delezioni totali o parziali del gene CLDN19 non sono state per ora riportate in letteratura. Analizzando però un paziente di origini indiane per questo gene abbiamo identificato una delezione quasi totale di CLDN19 in omozigosi. Questa delezione interessa gli esoni 1, 2, 3 e 4 compresi gli introni che si trovano tra questi esoni e la maggior parte dell'introne 4-5.

Per l'analisi del gene CLDN19 in questo paziente sono stati disegnati due nuovi primer. La necessità di avere a disposizione dei nuovi primer è sorta perché le amplificazioni fatte utilizzando i primer già in uso non avevano dato nessun risultato, eccettuata la coppia posta alle estremità dell'esone 5. Dopo aver testato l'integrità del DNA genomico del paziente effettuando una corsa elettroforetica su un gel di agarosio allo 0.8% in TBE di 1 µl del DNA totale del paziente FHHNC\_30, abbiamo disegnato primer più esterni rispetto al gene. Il primo nuovo primer è un forward collocato a circa 3000 bp a monte dell'esone 1. È stata fatta un'amplificazione utilizzando come reverse il primer a valle del codone di stop nell'esone 5. Abbiamo ottenuto la banda attesa ma l'amplificato conteneva anche molte bande aspecifiche. Per cercare di ottenere un miglior risultato è stato disegnato un nuovo primer reverse, collocato alla fine dell'introne 4-5. Con i due nuovi primer disegnati è stato amplificato un controllo, il DNA del paziente FHHNC\_30 e il DNA della madre del paziente, FHHNC\_31. Il prodotto di questa amplificazione è stato caricato su un gel di agarosio all'1% in TBE e, come marker, è stato utilizzato il GeneRuler 1 kb DNA Ladder. La corsa elettroforetica è stata fatta a 80 V per circa 1 ora. Il risultato ottenuto è stata una banda di 7911 bp per il controllo, una di circa 3500 bp per il paziente e una doppia banda, una di 7911 bp e una di circa 3500 bp, per la madre. La presenza di questa doppia banda nel DNA del campione FHHNC\_31 indica che la madre del paziente porta la delezione del gene in eterozigosi (Figura 27). Un'amplificazione effettuata sul DNA del padre del paziente, FHHNC\_32, ha mostrato che anch'esso portava la delezione in eterozigosi. Il fatto che entrambi i genitori del paziente portassero una delezione così rara in eterozigosi è probabilmente dovuto alla loro consanguineità.

La banda di circa 3500 bp è stata sequenziata e la sequenza è stata allineata con la sequenza genomica del gene CLDN19. In questo modo è stato possibile individuare il punto di giunzione tra la parte non deleta a monte dell'esone 1 e quella dell'introne 4-5.

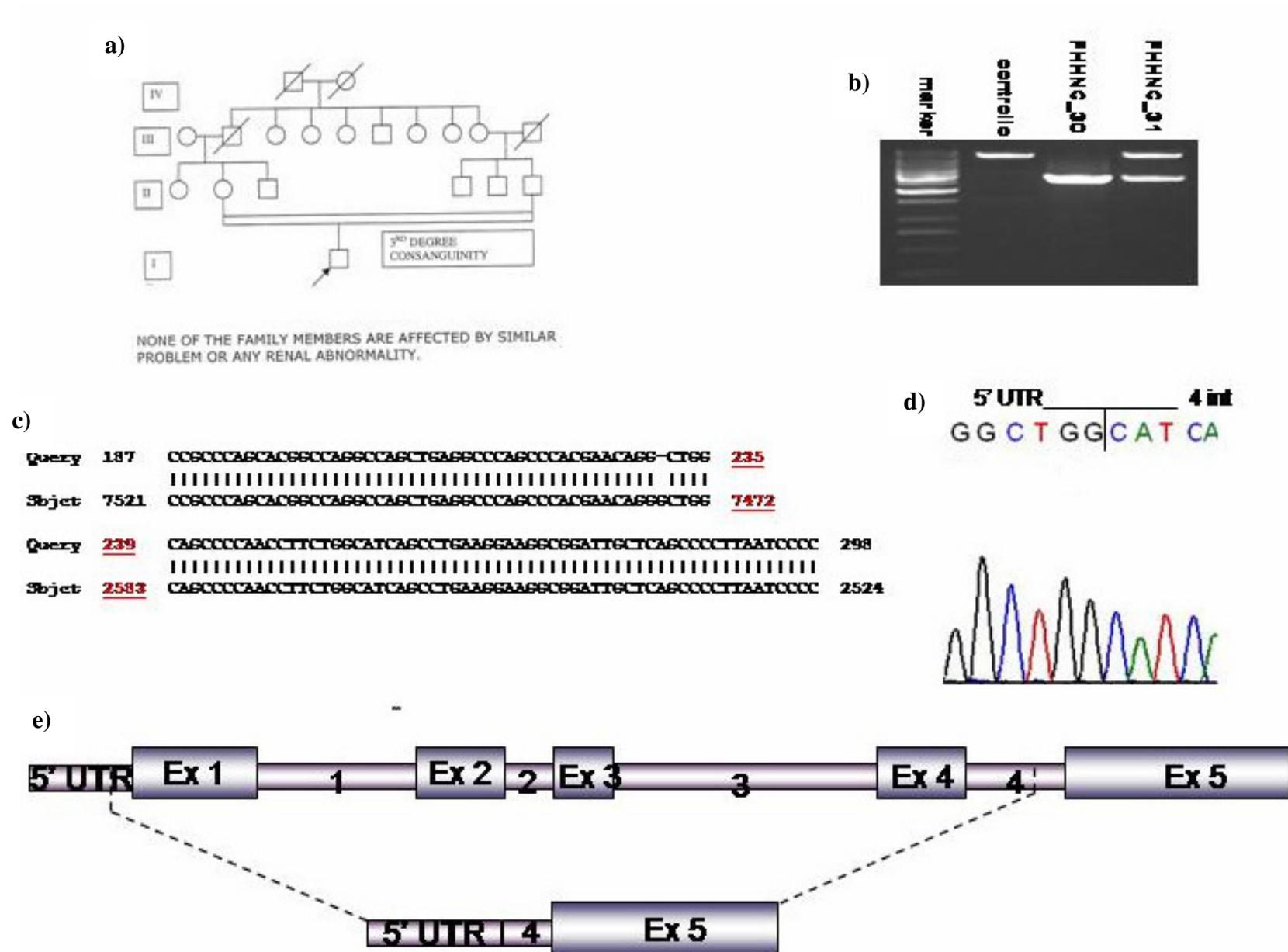


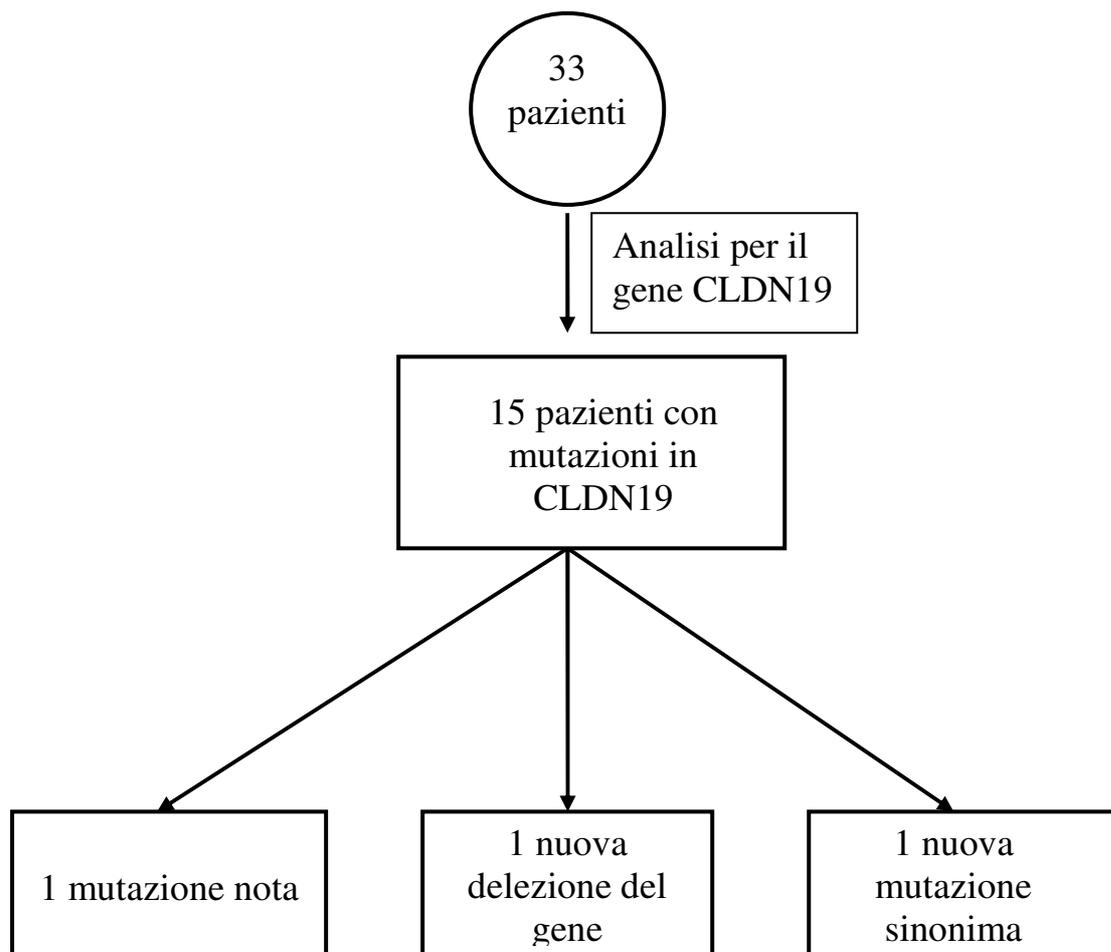
Figura 27: Caratterizzazione genetica del paziente FHHNC\_30

(a) L'immagine mostra il pedigree del paziente. Gli elementi dell'albero sono colorati in bianco perché nessuno dei parenti del paziente presenta la malattia. Il paziente è indicato dalla freccia. (b) Il gel mostra la corsa elettroforetica dei prodotti dell'amplificazione di un DNA di controllo, del DNA del paziente e di quello della madre. Per il controllo si ottiene un'unica banda a 7911 bp; per il paziente, FHHNC\_30, si ottiene un'unica banda a 3500 bp; per la madre, FHHNC\_31, si ottiene una doppia banda a 7911 bp e a 3500 bp. (c) Allineamento tra la sequenza genomica del gene CLDN19 del paziente e quella del gene CLDN19 riportata nelle banca dati ENSEMBL. In rosso è stato evidenziato il punto di delezione. (d) Elettroferogramma relativo al sequenziamento del frammento di 3500 bp del paziente FHHNC\_30. Si può osservare il punto di giunzione tra il 5' UTR e l'introne 4-5. (e) Schema del gene CLDN19 e della parte di gene che rimane dopo la delezione nel paziente.

### 3.4.3 Una nuova variazione del gene CLDN19

Nel corso delle analisi sui pazienti è stata individuata una nuova variazione nell'esone 1 in omozigosi nel paziente FHHNC\_10, di origine francese, e nei pazienti FHHNC\_33 e FHHNC\_34, di origine cinese. Essa consiste nel cambiamento del codone 28 del terzo nucleotide, da A a G. Esso però non causa un cambiamento amminoacidico. Infatti l'amminoacido codificato è sempre la glutammina. La variazione si può quindi classificare come mutazione sinonima e non rientra tra le mutazioni associate all'insorgenza della malattia.

Nel complesso le analisi condotte sul gene CLDN19 hanno permesso di individuare una mutazione già nota, una delezione mai riportata in letteratura e una nuova mutazione sinonima in 15 pazienti appartenenti a 10 diverse famiglie (Figura 28).



**Figura 28:** Schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'analisi genomica condotta sui 33 pazienti pervenuti nel nostro laboratorio del gene CLDN19

Al termine delle analisi condotte sui pazienti e su alcuni dei loro familiari per i geni CLDN16 e CLDN19 abbiamo ottenuto i seguenti risultati (Tabella 14):

- in 12 pazienti appartenenti a 11 diverse famiglie sono state individuate mutazioni nel gene CLDN16, responsabili dell'insorgenza della malattia
- in 12 pazienti appartenenti a 10 diverse famiglie sono state individuate mutazioni nel gene CLDN19, responsabili dell'insorgenza della malattia
- in 9 pazienti non sono state individuate mutazioni responsabili dell'insorgenza della malattia nei geni CLDN16 e CLDN19

**Tabella 14:** Elenco delle mutazioni dei geni CLDN16 e CLDN19 individuate nei pazienti. In giallo sono evidenziate le nuove mutazioni patogenetiche scoperte, in marrone chiaro le nuove variazioni e in azzurro le nuove mutazioni sinonime.

Famiglie	Pazienti	Mutazioni CLDN16	Mutazioni CLDN19
1	FHHNC_03	Esone 4- <b>Tyr213X</b> in eterozigosi	
		Esone 4- <b>Gly239Val</b> in eterozigosi	
2	FHHNC_04	Nessuna mutazione	
	FHHNC_07		
3	FHHNC_10	Nessuna mutazione	Esone 1-Codone 28-terzo nucleotide <b>A/G</b> in omozigosi
4	FHHNC_11	Esone 3- <b>Arg149X</b> in omozigosi	
5	FHHNC_12	Esone 5- <b>Glu294Lys</b> in eterozigosi	Nessuna mutazione
6	FHHNC_13	Esone 3- <b>Leu151Phe</b> in omozigosi	
7	FHHNC_15	Esone 2- <b>Leu116Phe</b> in eterozigosi	
		Esone 3- <b>Leu151Phe</b> in eterozigosi	
8	FHHNC_18	Esone 2- <b>Ser110Arg</b> in eterozigosi	
		Esone 3- <b>Leu151Phe</b> in eterozigosi	
9	FHHNC_23	Esone 2- <b>Asnfs123</b> in eterozigosi	
	FHHNC_24	Esone 3- <b>Leu145Pro</b> in eterozigosi	
10	FHHNC_25	Nessuna mutazione	Esone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
11	FHHNC_29	Nessuna mutazione	Nessuna mutazione
12	FHHNC_30	Nessuna mutazione	<b>Delezione</b> del gene
13	FHHNC_33	Nessuna mutazione	Esone 1-Codone 28-terzo nucleotide <b>A/G</b> in omozigosi
	FHHNC_34		

14	FHHNC_37 FHHNC_38	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
15	FHHNC_39	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
16	FHHNC_40	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
17	FHHNC_41	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
18	FHHNC_42 FHHNC_43	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in eterozigosi
19	FHHNC_44	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
20	FHHNC_45	Nessuna mutazione	Nessuna mutazione
21	FHHNC_46	Estone 2- <b>Trp117X</b> in omozigosi	
22	FHHNC_47	Estone 3- <b>Leu151Phe</b> in eterozigosi	Nessuna mutazione
23	FHHNC_48 FHHNC_49	Nessuna mutazione	Estone 1- <b>Gly20Asp</b> in omozigosi
24	FHHNC_54	Nessuna mutazione	Nessuna mutazione
25	FHHNC_55	Nessuna mutazione	Nessuna mutazione
26	FHHNC_56	Estone 2- <b>Arg114X</b> in eterozigosi	Nessuna mutazione
		Estone 2- <b>Cys120Tyr</b> in eterozigosi	
27	FHHNC_58	Estone 3- <b>Leu151Phe</b> in omozigosi	

### 3.5 Predizione dei tratti transmembrana di claudina-16 e claudina-19

Dopo aver completato l'analisi per la ricerca di mutazioni in tutti i campioni pervenuti in laboratorio, abbiamo cercato di verificare se gli amminoacidi mutati nelle due proteine fossero localizzati in tratti transmembrana. Ad oggi infatti non sono note le strutture della claudina-16 e della claudina-19. A tale scopo abbiamo utilizzato un programma di predizione di struttura disponibile nel sito *Sosui* ([http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv\\_sosui.cg](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cg)). Inserendo la sequenza amminoacidica della claudina-16 il programma ha identificato 5 possibili regioni transmembrana, organizzati ad  $\alpha$  elica (Tabella 15 e Figura 29). Tuttavia sulla base di modelli preesistenti e proposti da diversi autori (Weber et al, 2001; Muller et al, 2003; Konrad et al, 2006), sembra che la prima regione predetta come transmembrana e contenente l'N- terminale sia in realtà citosolica.

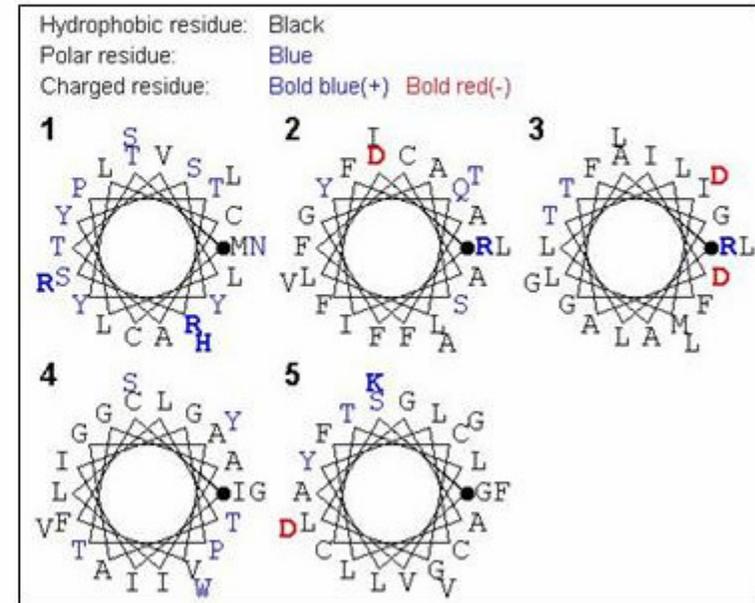
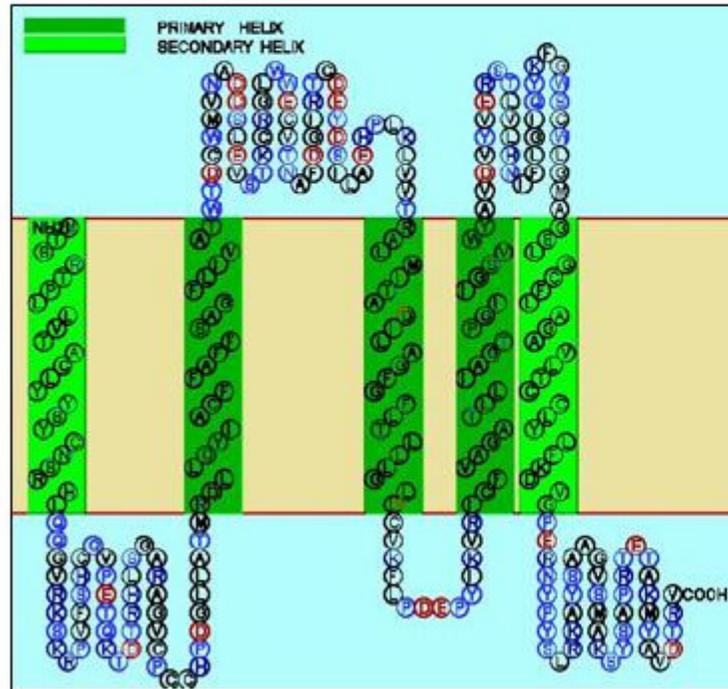
Considerando le mutazioni identificate nei nostri pazienti si può osservare che le mutazioni Ser110Arg, Asn123fs e Leu145Pro si trovano nel primo loop extracellulare ritenuto importante perché direttamente coinvolto nel trasporto del magnesio. Le mutazioni Arg149X e Leu151Phe si trovano invece nell'ipotetico secondo dominio transmembrana.

Analizzando invece le nuove variazioni da noi identificate si nota che le variazioni Leu116Phe e Cys120Tyr si trovano nel primo loop extracellulare. Sono quindi in una zona della proteina molto importante per il trasporto del magnesio e spesso soggetta a mutazioni patogenetiche. La variazione Gly239Val si trova nell'ipotetico secondo loop extracellulare e l'ultima variazione, Glu294Val, si trova nella regione citosolica, implicata nell'interazione con ZO-1.

**Tabella 15:** Sequenze amminoacidiche nelle regioni predette transmembrana della claudina 16

No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	1	MTSRTPLLVTACLYYSYCNSRHL	23	SECONDARY	23
2	72	RDLLQYIACFFAFFSAGFLIVAT	94	PRIMARY	23
3	149	RALMITADILAGFGFLTLLLGLD	171	PRIMARY	23
4	186	ICFVAGATLLIAGTPGIIGSVWY	208	PRIMARY	23
5	242	GSLGCFLAGAVLTCCLYLFKDVG	264	SECONDARY	23

# Claudina 16



**Figura 29: Regioni transmembrana predette della claudina 16**

Nel pannello di destra le eliche prodotte sono mostrate secondo la rappresentazione “helical wheel” (Lehnert et al, 2004), che dimostra che non sono eliche anfipatiche

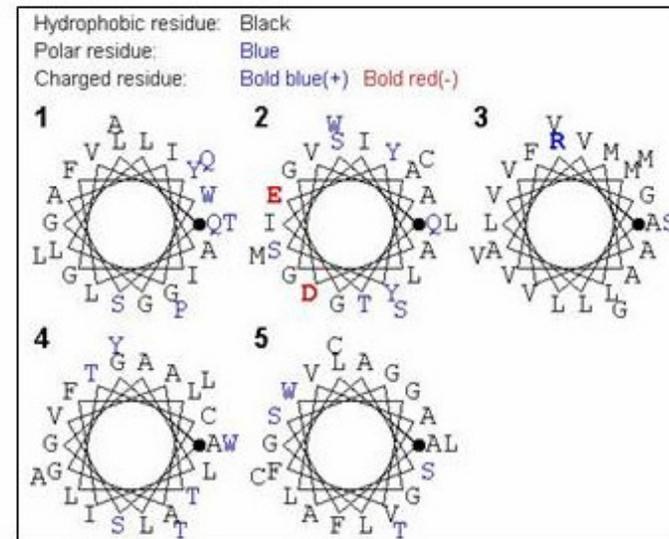
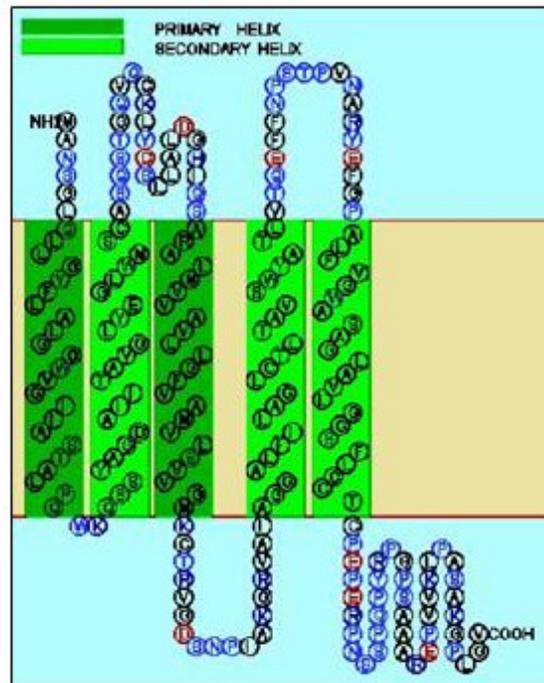
Anche analizzando la sequenza amminoacidica della claudina-19 il programma ha identificato 5 possibili regioni transmembrana, organizzati ad  $\alpha$ -elica (Tabella 16 e Figura 30). L’N-terminale che, come per la claudina-16, è generalmente considerato citosolico (Lee et al, 2006), viene predetto come tratto extracellulare.

Considerando la mutazione identificata nei nostri pazienti, Gly20Asp, si può osservare che essa si trova nel primo dominio transmembrana.

**Tabella 16:** Amminoacidi contenuti nelle teoriche regioni transmembrana della claudina 19

No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	7	QLLG YFLALGGWVGIIASTALPQ	29	PRIMARY	23
2	32	QSSYAGDAIITAVGLYEGLWMSC	54	SECONDARY	23
3	80	ARALMVVAVLLGFVAMVLSVVG M	102	PRIMARY	23
4	121	AGGALFILAGLCTLTA VSWYATL	143	SECONDARY	23
5	164	ALFVGWASAGLAVLGG SFLCCT	185	SECONDARY	22

## Claudina 19



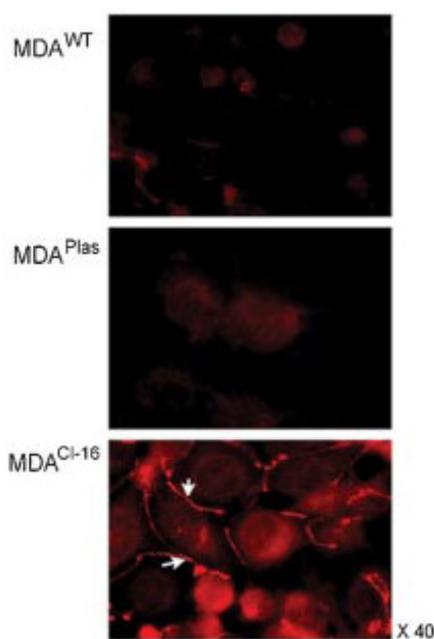
**Figura 30: Regioni transmembrana predette della claudina 19**

Nel pannello di destra le eliche prodotte sono mostrate secondo la rappresentazione “helical wheel” (Lehnert et al, 2004), che dimostra che non sono eliche anfipatiche

### 3.6 Espressione della claudina-16 in cellule tumorali del seno

Recentemente sono stati esaminati gli effetti di una sovraespressione della claudina-16 in cellule umane di carcinoma del seno e l'espressione e la distribuzione della proteina in queste cellule (Martin et al, 2008). Gli studi in vitro hanno mostrato che la sovraespressione della claudina-16 diminuisce l'aggressività tumorale, aumenta la funzionalità delle tight junctions e riduce la crescita tumorale in vivo. Inoltre si è osservato che l'espressione della claudina-16 è sensibilmente ridotta nei pazienti con tumori. Questo ha fatto pensare che la proteina possa avere un ruolo di inibitore tumorale, quando mantenga la corretta struttura delle tight junctions.

Linee cellulari umane di carcinoma al seno sono state trasfettate con vettori contenenti il gene CLDN16. L'espressione del gene è stata confermata dalla presenza di mRNA e, tramite esperimenti di immunofluorescenza, si è osservato che la proteina si localizzava nelle giunzioni cellulari (Figura 31).



**Figura 31:** Microscopia a immunofluorescenza della claudina-16 in linee cellulari del cancro al seno (MDA). Nel riquadro in basso, cellule trasfettate con la claudina-16 (MDA<sup>Cl-16</sup>) mostrano la formazione delle giunzioni cellulari (indicate dalle frecce) a differenza delle cellule wild type (MDA<sup>WT</sup>) o di quelle trasfettate con un plasmide di controllo (MDA<sup>Plas</sup>) (Martin et al, 2008). Per marcare la claudina-16 è stata utilizzata la fluorescina isotiocianata.

La presenza di un vettore contenente il gene CLDN16 ha portato a un aumento dell'espressione di questa proteina nelle cellule tumorali e ha permesso il riformarsi delle giunzioni

tra le cellule. Questo rappresenta un ostacolo alla crescita metastatica tumorale e alla sua diffusione nell'organismo.

Sulla base di questi risultati ci siamo chiesti come le mutazioni trovate in CLDN16, causa dell'insorgenza della FHHNC, possano influire sulla capacità antitumorale della proteina. Inoltre sarebbe interessante anche valutare se pazienti FHHNC siano più soggetti di individui sani alla formazione e alla diffusione metastatica del cancro al seno.

Per valutare se mutazioni che causano l'insorgenza della FHHNC possono influenzare la capacità antitumorale della claudina-16, sono state scelte mutazioni nel gene CLDN16 già riportate in letteratura e delle quali erano stati studiati gli effetti sulla funzione della proteina nel rene (Tabella 17) (Konrad et al, 2008).

**Tabella 17:** Elenco delle mutazioni selezionate per l'esperimento di mutagenesi sito diretta. In tabella sono riportate le mutazioni, la localizzazione della mutazione nella struttura della proteina, la localizzazione cellulare della proteina mutata e il mantenimento o la scomparsa della funzione della proteina in conseguenza della mutazione (Konrad et al, 2008)

Mutazione	Posizione della mutazione	Localizzazione della proteina mutata	Effetti sulla funzione di CLDN16
<u>CLDN16</u> : L145P	primo loop extracellulare	Tight junction	Completa scomparsa
<u>CLDN16</u> : R149L	primo loop extracellulare	Reticolo endoplasmatico	Completa scomparsa
<u>CLDN16</u> : L151F	primo loop extracellulare	Tight junction	Parziale scomparsa
<u>CLDN16</u> : G191R	primo dominio transmembrana	Tight junction	Parziale scomparsa
<u>CLDN16</u> : A209T	secondo dominio transmembrana	Tight junction	Parziale scomparsa
<u>CLDN16</u> : F232C	secondo dominio transmembrana	Tight junction	Mantenimento

Le prime due mutazioni comportano entrambe la perdita completa della funzione della proteina ma mentre con la prima mutazione la proteina continua a localizzarsi nelle tight junction, con la seconda mutazione la proteina si localizza nel reticolo endoplasmatico dove viene degradata. Ci sono poi tre mutazioni che provocano una parziale scomparsa della funzione della proteina. Ognuna di esse si trova in una regione diversa della proteina. L'ultima mutazione sembra non influire sulla funzione della proteina.

Successivamente, abbiamo disegnato dei primer per la reazione di mutagenesi sito-diretta. Ciascun primer di ogni coppia portava a circa metà lunghezza una delle mutazioni selezionate; ogni coppia portava la stessa mutazione sul primer forward e sul reverse.

Con queste coppie di oligonucleotidi sono state fatte reazioni di amplificazione con un plasmide contenente il gene CLDN16. Lo scopo di queste reazioni è stato quello di inserire nella sequenza selvatica del gene una delle mutazioni da noi selezionate. Il prodotto di amplificazione è stato poi usato per trasformare cellule competenti XL10-Gold.

Una volta ottenute delle colonie, è stato purificato il plasmide ed è stato sequenziato. Questa operazione è servita per avere la sicurezza di aver ottenuto un gene CLDN16 portante un'unica mutazione da noi scelta.

Il plasmide è stato utilizzato per trasfettare tramite elettroporazione linee di cellule del cancro al seno umano. Una volta cresciute, le cellule verranno analizzate per verificare la localizzazione della claudina-16 mutata e successivamente si verificheranno gli effetti di ciascuna di queste mutazioni associate all'insorgenza della FHHNC sulla ipotetica capacità della proteina di diminuire l'aggressività tumorale.

## 4 DISCUSSIONE

Il tubulo renale è un lungo canale, suddivisibile in quattro porzioni successive diverse per struttura microscopica e funzione riassorbente (Agnati, 2001).

A livello del tubulo contorto prossimale vengono riassorbiti attivamente glucosio, proteine, acqua, sodio e cloro (questi ultimi componenti attraverso pompe ioniche). Nell'ansa di Henle l'urina si concentra poiché vengono riassorbiti più soluti che acqua. Il tubulo contorto distale svolge funzione di riassorbimento di acqua e sodio. Le ultime modificazioni dell'urina, ormai definitiva, avvengono nel tratto reuniente che manda l'urina nel tubulo collettore.

Alterazioni di questi meccanismi provocano l'insorgenza di importanti anomalie, chiamate tubulopatie, che riguardano soprattutto l'equilibrio idrico, degli oligoelementi e l'equilibrio acido – base (Agnati, 2001). Un importante sottogruppo sono le tubulopatie congenite che possono essere causate da difetti molecolari di carrier o canali tubulari (in questo caso vengono chiamate tubulopatie primarie) o da difetti di recettori, enzimi o malattie metaboliche con alterato funzionamento cellulare, denominate tubulopatie secondarie (Rumballe et al, 2010).

Fino a pochi anni fa lo studio delle tubulopatie primarie era trascurato a favore di studi approfonditi delle tubulopatie provocate da alterazioni metaboliche, anche per il fatto che nelle tubulopatie primitive sono comprese molte sindromi definite rare e quindi difficili da studiare per il basso numero di pazienti. Inoltre, non c'era una chiara classificazione anatomica e funzionale di questo gruppo, e quindi la diagnosi era formulata solo in base ai sintomi. Recentemente è stata fatta una classificazione più rigorosa di questo gruppo di tubulopatie e sono aumentati i progetti di studio atti a identificare i geni causativi di queste anomalie.

Il nostro studio si inserisce in questo ambito. Abbiamo infatti cercato di approfondire la conoscenza delle cause genetiche che provocano l'insorgenza di una tubulopatia primaria che interessa un canale per il riassorbimento di magnesio e potassio nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle, l'ipomagnesemia ipercalciuria e nefrocalcinosi familiare (FHHNC).

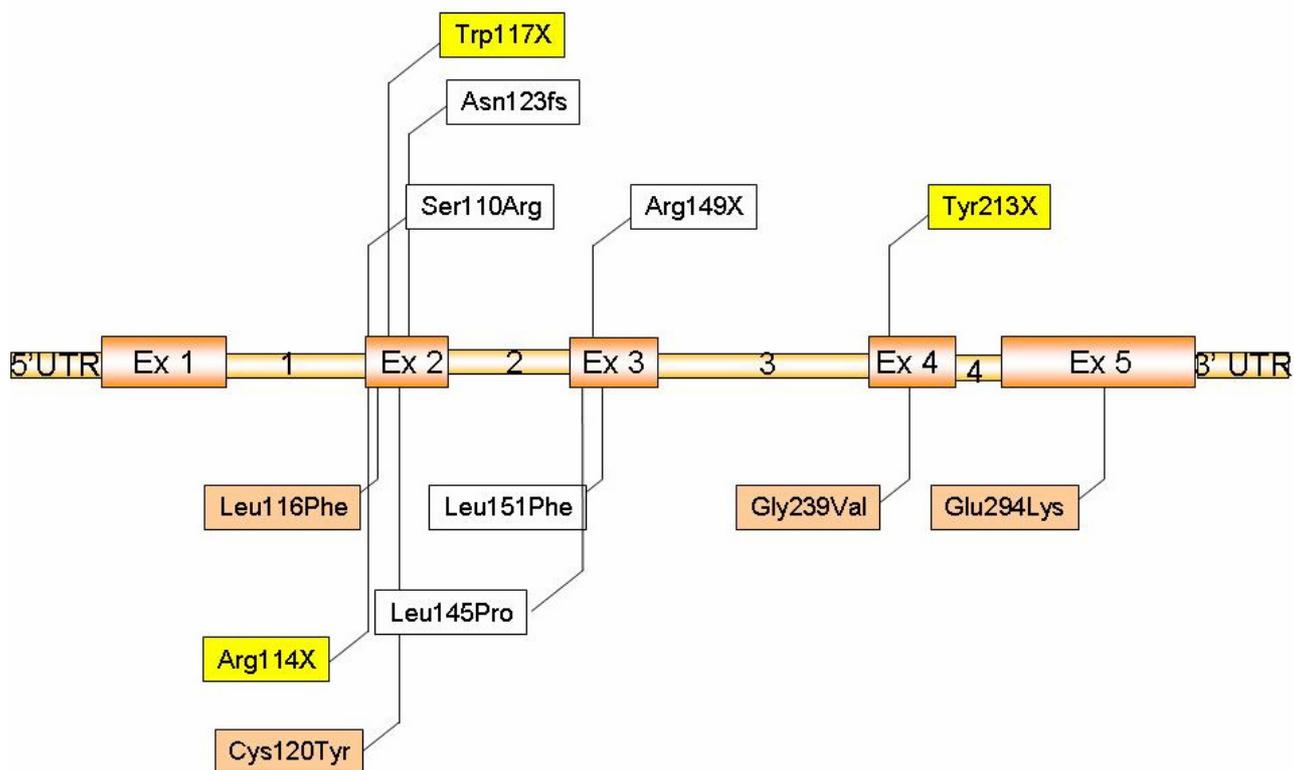
La FHHNC è una tubulopatia rara che si trasmette come un carattere autosomico recessivo e che, ad oggi, è stata diagnostica in circa 200 individui in tutto il mondo. Questa patologia è causata dall'insorgenza di mutazioni in due geni, CLDN16 e CLDN19, che codificano due proteine appartenenti alla famiglia delle claudine e espresse nelle tight junctions: la claudina-16 e la claudina-19. In letteratura finora sono state riportate circa 40 mutazioni nel gene CLDN16 e 3 mutazioni nel gene CLDN19 associate all'insorgenza della malattia (Weber et al., 2001; Wolf et al.,

2002; Kang et al, 2005; Tajima et al, 2005; Tasic et al, 2005; Sanjad et al, 2006; Turkem et al, 2006; Staiger et al, 2007; Peru et al, 2008; Konrad et al, 2008; Al-Haggar et al, 2009).

Grazie a una collaborazione internazionale con medici che hanno in cura presso la loro struttura individui affetti da questa malattia, siamo riusciti a raccogliere campioni biologici di 33 pazienti appartenenti a 27 famiglie. Data l'estrema rarità di questa malattia, il nostro è stato uno degli studi più ampi condotti finora. Inoltre, poiché i campioni biologici da noi sottoposti ad analisi provengono da diverse parti del mondo, la popolazione dalla quale sono stati ricavati è caratterizzata da una grande eterogeneità etnica. Questo è un punto molto importante poiché la FHHNC non sembra presumibilmente diffusa in una particolare etnia, sebbene alcune mutazioni dei geni CLDN16 e CLDN19 siano più frequenti in certe popolazioni. È il caso, per esempio, della mutazione Leu151Phe della claudina-16 che sembra la più diffusa nelle popolazioni originarie dell'Europa dell'est. Questo effetto "fondatore", cioè una mutazione che ha un'altissima percentuale di diffusione in un ristretto gruppo della popolazione, è dovuto al fatto che i matrimoni tra le famiglie FHHNC avvengono nella maggior parte dei casi tra consanguinei. Le mutazioni quindi restano confinate in piccoli gruppi nei quali si manifestano con sempre maggior incidenza.

Dopo aver analizzato tutti i campioni biologici ottenuti siamo riusciti a individuare in 12 pazienti mutazioni nel gene CLDN16 e in 12 pazienti mutazioni nel gene CLDN19. Inoltre, in altri 3 pazienti è stato individuato un nuovo SNP di CLDN19.

Delle mutazioni nel gene CLDN16 individuate, 5 mutazioni sono risultate già note, 3 mutazioni non senso non sono ancora state riportate in letteratura, come anche 4 variazioni che provocano cambiamenti amminoacidici nella claudina-16 (Figura 32).



**Figura 32:** Schema del gene CLDN16 con indicate le mutazioni individuate nel corso del lavoro di dottorato. In bianco sono indicate le mutazioni già note in letteratura; in giallo le nuove mutazioni non senso; in marrone chiaro le nuove variazioni.

La maggior parte delle mutazioni e delle nuove variazioni individuate si trovano nel secondo e terzo esone.

Gli amminoacidi codificati dai codoni che appartengono al secondo esone costituiscono, secondo i modelli di predizione teorica della struttura della proteina, il secondo e il terzo dominio transmembrana. Svolgono quindi un ruolo importante per l'ancoraggio della claudina-16 alla membrana e potrebbero svolgere qualche ruolo anche nel formare eterodimeri con la claudina-19. È noto che la mutazione Ser110Arg provoca una parziale perdita della funzione della proteina (Konrad et al, 2008). La mutazione Asn123fs genera una proteina trunca che viene presumibilmente degradata. Le due nuove mutazioni non senso, Arg114X e Trp117X, generano anch'esse una proteina trunca che potrebbe andare incontro a degradazione. In questo esone sono state individuate anche due nuove variazioni, Leu116Phe e Cys120Tyr. Per riuscire a classificarle come mutazioni patogenetiche sarebbe necessario eseguire delle verifiche su campioni di DNA di individui di controllo. Ciò consentirebbe di escludere che queste variazioni siano normalmente diffuse tra la popolazione senza rappresentare mutazioni responsabili dell'insorgere della FHHNC. Sebbene questa verifica sia ancora da effettuare, sono state fatte delle osservazioni teoriche sulla possibilità che le nuove variazioni trovate possano essere associate all'insorgenza della malattia. Nella prima variazione la leucina, che è un amminoacido apolare, viene sostituito da una fenilalanina, anch'essa

apolare. Non si ha quindi un cambiamento di carica dell'amminoacido in posizione 116. Ma, mentre la catena laterale della leucina è alifatica, quella della fenilalanina è aromatica e molto più ingombrante, e ciò potrebbe condizionare la formazione di interazioni con gli altri amminoacidi. Inoltre, mettendo a confronto la sequenza proteica della claudina-16 umana con quella di altri vertebrati, si osserva che la Leu116 è molto conservata. Ciò potrebbe indicare la sua importanza per la struttura e funzione della proteina e un suo cambiamento potrebbe causare perdita della funzione proteica. La seconda variazione determina la sostituzione di una cisteina con una tirosina. Confrontando la sequenza amminoacidica della claudina-16 umana con quella di altri vertebrati si nota, anche in questo caso, una totale conservazione della cisteina. Come per la Leu116, anche la conservazione evolutiva della Cys120 potrebbe avvalorare l'importanza di questo amminoacido per la struttura e funzione della proteina.

Il terzo esone codifica il secondo loop extracellulare e il quarto dominio transmembrana. La mutazione Leu145Pro provoca la perdita completa della funzione della proteina (Konrad et al, 2008). Questo dato indica che la Leu145 è indispensabile per il meccanismo di riassorbimento del magnesio e del calcio. La mutazione Leu151Phe determina invece una parziale abolizione della funzione della claudina-16 (Konrad et al, 2008). Come già detto, questa è la mutazione più diffusa tra i pazienti originari dell'Europa dell'est. L'elevata diffusione di questa mutazione è stata osservata anche nei nostri pazienti. Infatti, su dieci pazienti di origine germanica o dell'Europa dell'est, cinque presentano questa mutazione in omozigosi o in eterozigosi. Va precisato che non esistono legami di parentela tra questi pazienti.

Una nuova mutazione non senso è stata individuata nell'esone 4, Tyr213X. Essa potrebbe provocare una completa scomparsa della funzione della proteina e la localizzazione della claudina-16 non solo nelle tight junctions ma anche su tutta la membrana cellulare. Infatti la formazione di un codone di stop prematuro fa in modo che gli ultimi amminoacidi della proteina nativa non vengano tradotti. Questo implica l'assenza della Ser217, la cui fosforilazione è ritenuta importante, oltre che per la corretta localizzazione della proteina nelle tight junctions, anche nel meccanismo di passaggio degli ioni. Questa serina è costitutivamente fosforilata per opera della PKA. Utilizzando infatti un inibitore di questa chinasi si è osservata una diminuzione della fosforilazione della Ser217 (Ikari et al, 2006) e di conseguenza una diminuzione nel livello di riassorbimento del magnesio e una distribuzione citoplasmatica della claudina-16 (Ikari et al, 2006). Sempre a seguito della mutazione Tyr213X, non verrebbero nemmeno tradotti gli amminoacidi Thr225 e Thr233, la cui fosforilazione è necessaria per l'ancoraggio della claudina-16 alle tight junctions (Ikari et al, 2010). Inoltre la Thr233 è essenziale affinché avvenga il legame tra la claudina-16 e ZO-1, un'altra componente proteica delle tight junctions. Esperimenti condotti utilizzando mutanti della claudina-

16 che interessano due treonine nel C-terminale, T225A e T233A, hanno mostrato che entrambe le proteine mutanti vengono espresse, ma la loro associazione con ZO-1 è minore di quella della proteina selvatica. Infatti le due proteine mutanti si localizzano a livello delle membrane apicali e laterali, mentre ZO-1 si localizza solo a livello delle membrane apicali (Ikari et al, 2010).

Sempre nell'esone 4 è stata individuata anche una nuova variazione, Gly239Val. Poiché la glicina è situata in un loop citosolico e la valina è un amminoacido idrofobico, ciò potrebbe influenzare la struttura e la flessibilità del loop e quindi la struttura complessiva della proteina. Confrontando la sequenza della claudina-16 di vari vertebrati si può osservare che questo amminoacido è molto conservato. Ciò potrebbe indicare la sua importanza per la stabilità della struttura della proteina e, quindi, la sua sostituzione con un altro amminoacido potrebbe provocare l'insorgenza della FHHNC.

Infine, un'ultima variazione è stata individuata nell'esone 5 in prossimità del C-terminale, Glu294Lys. Finora in questo esone sono state individuate solo 3 mutazioni patogenetiche. È quindi l'esone meno implicato nell'insorgenza della malattia. Sebbene il Glu294 risulti conservato in quasi tutte le specie di vertebrati, ad esclusione di *G. gallus*, esso si trova in una regione che mostra una significativa variabilità. Ciò sembrerebbe avvalorare l'ipotesi che la variazione Glu294Lys sia una mutazione associabile all'insorgenza della malattia.

Per quanto riguarda la claudina-19, la mutazione che è stata trovata nel maggior numero di pazienti è la Gly20Asp. Questo tipo di mutazione è stato identificato in tutti i soggetti affetti da FHHNC originari di Valencia (Konrad et al, 2006). Questa è finora la mutazione patogenetica del gene CLDN19 più diffusa nei pazienti FHHNC. Per quanto riguarda i campioni da noi analizzati, essa è stata trovata in omozigosi o in eterozigosi in tutti i pazienti con origini valenciane. Questa è un'ulteriore prova del fatto che questa mutazione è stata trasmessa a questo gruppo di individui da un antenato comune. Il fatto che la mutazione sia rimasta all'interno di un gruppo così piccolo della popolazione è probabilmente dovuto al fatto che i matrimoni avvengono tutti tra consanguinei.

Nel gene CLDN19 abbiamo anche trovato una delezione in omozigosi dei primi 4 esoni in un paziente di origini indiane. Questa osservazione è interessante perché finora in letteratura non sono stati riportati casi di delezioni riguardanti i geni CLDN16 e CLDN19. I genitori del paziente, che tra loro sono cugini primi, portano la delezione del gene in eterozigosi (come abbiamo verificato analizzando un loro campione di DNA) ma sono asintomatici e non presentano alcun problema di riassorbimento renale. Inoltre nessuno dei parenti più stretti del paziente ha o ha avuto problemi renali. Il paziente, al contrario, presenta gravi sintomi di ipomagnesemia, ipercalciuria e nefroclinosi che interessano entrambi i reni. La malattia inoltre si è manifestata quando il paziente era molto piccolo e i sintomi stanno progredendo molto rapidamente. Ciò indica che la delezione

quasi totale del gene CLDN19, e quindi l'impossibilità di tradurre una proteina anche solo parzialmente funzionante, ha un effetto determinante nel compromettere la funzionalità renale.

Al termine delle analisi, per 9 dei 33 pazienti non sono state identificate mutazioni in nessuna delle due proteine: per 2 pazienti è stata identificata solo una mutazione in eterozigosi in CLDN19, e per un paziente una nuova variazione in eterozigosi in CLDN16. Questo risultato ha suggerito due possibili sviluppi del presente lavoro di analisi genetica. Si potrebbe, prima di tutto, analizzare il promotore dei geni CLDN16 e CLDN19 alla ricerca di possibili mutazioni in questa regione. Per quanto riguarda la claudina-16, è stata identificata una regione di 70 bp tra le posizioni -1633 e -1703 rispetto al gene CLDN16 che potrebbe giocare un ruolo chiave nell'attività del promotore (Efrati et al, 2005) tramite l'interazione tra un regolatore positivo presente in questa regione e un regolatore negativo situato più lontano nella regione 5'. Questa interazione determinerebbe l'espressione specifica nelle cellule renali di questo gene. Si potrebbe analizzare questa regione per verificare la presenza di possibili mutazioni che potrebbero impedire l'espressione della proteina nelle cellule renali. Per quanto riguarda la claudina-19 invece, non si hanno informazioni sulla regione del suo promotore. Bisognerebbe quindi identificare prima di tutto dove si trova questa regione.

In secondo luogo, i nostri risultati suggeriscono il coinvolgimento di un altro gene o di altri geni nell'insorgenza della malattia. Dato che la FHHNC è causata da mutazioni in proteine espresse nelle tight junctions dell'ansa di Henle, si potrebbero individuare altre proteine espresse insieme alle claudine 16 e 19, che potrebbero influenzare la loro interazione o che potrebbero essere coinvolte direttamente a loro volta nel trasporto del magnesio e del calcio.

Dopo aver verificato che le nuove variazioni individuate nel gene CLDN16 sono realmente associabili all'insorgenza della malattia, potrebbero essere condotti esperimenti per determinare quali effetti hanno sulla funzione e sulla localizzazione nelle tight junctions della proteina. Ad esempio, il gene CLDN16, in fusione con la GFP, potrebbe essere mutagenizzato così da inserirvi ciascuna di queste nuove mutazioni. Plasmidi contenenti tali costrutti potrebbero essere utilizzati per trasfettare cellule umane renali. In questo modo, si potrebbe osservare dove la proteina mutata viene espressa. In seguito, tramite esperimenti di coimmunolocalizzazione, si potrebbe verificare se la claudina-16 mutata continua a colocalizzarsi con la claudina-19 e con ZO-1.

Recenti studi hanno associato la sovraespressione della claudina-16 con una diminuzione dell'aggressività del carcinoma al seno (Martin et al, 2008). Studi in vitro condotti su linee cellulari umane di tumore al seno (MDA-MB-231) hanno mostrato che la sovraespressione della claudina-16 diminuisce l'aggressività tumorale, aumenta la funzionalità delle tight junctions e riduce la crescita tumorale in vivo. Sulla base di questi risultati ci siamo chiesti come le mutazioni nel gene CLDN16

identificate come causa dell'insorgenza della FHHNC possano influire sulle eventuali capacità antitumorali della proteina. Abbiamo quindi scelto mutazioni di cui era stata studiata in precedenza l'influenza sulla funzione della proteina nel rene, per poter valutare se mutazioni che comportano completa o parziale perdita della funzione della claudina-16 nel rene possano causare anche diminuzione o scomparsa della sua ipotetica capacità antitumorale nelle cellule di tumori del seno. Tramite esperimenti di mutagenesi sito diretta abbiamo inserito nella sequenza selvatica del gene una delle mutazioni da noi selezionate. Il plasmide contenente il gene così mutagenizzato è stato trasfettato tramite elettroporazione in cellule MDA-MB-231 e le cellule sono state poste in coltura. Quest'ultima parte del lavoro è ancora in corso e verrà integrata in futuro da un'analisi volta ad accertare se pazienti FHHNC siano più soggetti di individui sani alla formazione e alla diffusione metastatica del cancro al seno.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Chiba H., Osanai M., Murata M., Kojima T., Sawada N.(2008) Transmembrane proteins of tight junctions *Biochim Biophys Acta* **1778**, 588–600
- Förster C.(2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease *Histochem Cell Biol* **130**, 55–70
- Lal-Nag M. and Morin P. J. (2009) The claudins *Genome Biol.* **10**, 235
- Oliveira S. S. and Morgado-Díaz J. A. (2007) Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 17–28
- Angelowa S. and Yu A. S.L. (2007) Claudins and paracellular transport: an update *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16**, 459–464
- Cremaschi D. (1987) Fisiologia generale principi, pp. 222-232, edi-emers, Milano
- Will C., Fromm M., and Müller D.(2008) Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport *Perit Dial Int.* **28**, 577–584
- Kiuchi-Saishin Y., Gotoh S., Furuse M., Takasuga A., Tano Y.,Tsukita S. (2002) Differential expression patterns of claudins,tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments *J Am Soc Nephrol* **13**, 875–86
- Carpi-Medina P., Whittembury G. (1988) Comparison of transcellular and transepithelial water osmotic permeabilities (Pos) in the isolated proximal straight tubule (PST) of the rabbit kidney *Pflugers Arch* **412**, 66–74
- Yu A.S., Enck A.H., Lencer W.I., Schneeberger E.E. (2003) Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation *J Biol Chem* **278**, 17350–9

- Balkovetz D. F. (2008) Tight junction claudins and the kidney in sickness and in health *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 858-63
- Lee D. B. N., Huang E. and Ward H. J. (2006) Tight junction biology and kidney dysfunction *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, 20–34
- Konrad M. and Weber S. (2003) Recent Advances in Molecular Genetics of Hereditary Magnesium-Losing Disorders *J Am Soc Nephrol* **14**, 249–260,
- Wagner C. A. (2007) Disorders of renal magnesium handling explain renal magnesium transport *J Nephrol* **20**, 507-510
- Alexander R. T. ,Hoenderop J. G., and Bindels R.J. (2008) Molecular Determinants of Magnesium Homeostasis: Insights from Human Disease *J Am Soc Nephrol* **19**, 1451-8
- Simon D. B., Lu Y., Choate K. A., Velazquez H., Al-Sabban E., Praga M., Casari G., Bettinelli A., Colussi G., Rodriguez-Soriano J., McCredie D., Milford D., Sanjad S., Lifton R.P. (1999) Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg<sup>2+</sup> Resorption *Science* **285**, 103-6
- Efrati E., Arsentiev-Rozenfeld J., and Zelikovic I. (2005) The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell-specific expression and regulation *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, 272-283
- Guan Y. and Breyer M.D. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease *Kidney Int* **60**, 14–30
- Berger J. and Moller D.E. (2002) The mechanisms of action of PPARs *Annu Rev Med* **53**, 409–435
- Hou J., Paul D. L. and Goodenough D. A. (2005) Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions *J Cell Sci* **118**, 5109-5118

- Konrad M. and Weber S. (2003) Recent Advances in Molecular Genetics of Hereditary Magnesium-Losing Disorders *J Am Soc Nephrol* **14**, 249–260
- Ikari A., Hirai N., Shiroma M., Harada H., Sakai H., Hayashi H., Suzuki Y., Degawa M. , and Takagi K. (2004) Association of Paracellin-1 with ZO-1 Augments the Reabsorption of Divalent Cations in Renal Epithelial Cells *J Biol Chem* **279**, 54826–54832
- Ohba Y., Kitagawa H., Kitoh K., Sasaki Y., Takami M., Shinkai Y., and Kunieda T. (2000) A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle *Genomics* **68**, 229–236
- Bachmann C., Fischer L., Walter U., Reinhard M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilatorstimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation *J Biol Chem* **274**, 23549–23557
- Lawrence D.W., Comerford K.M., Colgan S.P. (2002) Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca<sup>2+</sup> switch *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, 1235–1245
- Ikari A., Ito M., Okude C., Sawada H., Harada H., Degawa M., Sakai H., Takahashi T., Sugatani J., and Miwa M. (2008) Claudin-16 Is Directly Phosphorylated by Protein Kinase A Independently of a Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein-Mediated Pathway *J. Cell. Physiol.* **214**, 221–229
- Ikari A., Kinjo K., Atomi K., Sasaki Y., Yamazaki Y., Sugatani J. (2010) Extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation *Biochim Biophys Acta* **1798**, 415–421
- Whelton P.K., Klag M.J. (1989) Magnesium and blood pressure: review of the epidemiologic and clinical trial experience *Am. J. Cardiol* **63**, 26–30

- Touyz R.M., Milne F.J. (1999) Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, development of hypertension in spontaneously hypertensive rats *Am. J. Hypertens* **12**, 757–765
- Ikari A., Matsumoto S., Harada H., Takagi K., Degawa M., Takahashi T., Sugatani J., Miwa M. (2006) Dysfunction of paracellin-1 by dephosphorylation in Dahl salt-sensitive hypertensive rats *J. Physiol. Sci.* **56**, 379–383
- Ikari A., Okude C., Sawada H., Sasaki Y., Yamazaki Y., Sugatani J., Degawa M., Miwa M. (2008) Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16 *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 283–290
- Fujibe M., Chiba H., Kojima T., Soma T., Wada T., Yamashita T., Sawada N. (2004) Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions *Exp. Cell Res* **295**, 36–47
- Hou J., Renigunta A., Konrad M., Gomes A. S., Schneeberger E. E., Paul D. L., Waldegger S., and Goodenough D. A. (2008) Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex *J Clin Invest* **118**, 619–28
- Leea N. P.Y., Tonga M. K., Leunga P. P., Chana V.W., Leunga S., Tama P., Chanb K., Leec K., Yeungc W.S.B., Luka J. M. (2006) Kidney claudin-19: Localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease *FEBS Lett* **580**, 923–931
- Angelow S., El-Husseini R., Kanzawa S. A., and Yu A. S. L. (2007) Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19 *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, 166–177
- Hou J., Reniguntac A., Gomesa A. S., Houd M., Pauld D. L., Waldeggerc S. and Goodenougha D. A. (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium *PNAS* **106**, 15350–15355

- Agnati L. F. (2001) *Fisiologia dell'apparato renale - con elementi di fisiopatologia*, Athena editore
- Lee DB, Drinkard JP, Rosen VJ, Gonick HC. (1972) The adult Fanconi Syndrome: observations on etiology, morphology, renal function and mineral metabolism in three patients *Medicine (Baltimore)* **51**, 107-38
- Houston IB, Boichis H, Edelmann CM Jr. (1968) Fanconi syndrome with renal sodium wasting and metabolism alkalosis *Am J Med.* **44**, 638-46
- Hebert S.C. (2003) Bartter syndrome *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 527-32
- Naesens M., Steels P., Verberckmoes R., Vanrenterghem Y., Kuypers D. (2004) Bartter's and Gitelman's Syndromes: from genetic to clinic *Nephron Physiol* **96**, 65-78
- Lemmink H.H., van der Heuvel L. P., van Dijk H.A., Merckx G.F., Smilde T.J., Taschner P.E., Monnens L.A., Herbert S.C., Knoers N.V. (1996) Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families *Pediatr Nephrol* **10**, 403-7
- Mastroianni N., Bettinelli A., Bianchetti M., Colussi G., De Fusco M., Sereni F., Ballabio A. and Cesari G. (1996) Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* **59**, 1019-26
- Michelis M.F., Drash A.L., Linarelli L.G., De Rubertis F.R., Davis B.B. (1972) Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone). *Metabolism* **21**, 905-920
- Praga M., Vara J., Gonzalez-Parra E., Andres A., Alamo C., Araque A., Ortiz A., Rodicio J.L. (1995) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int* **47**, 1419-1425

- Weber S., Hoffmann K., Jeck N., Saar K., Boeswald M., Kuwertz-Broeking E., Meij I. I.C., van Knoers N., Cochat P., Šul'akov'a T., Bonzel K.E., Soergel M., Manz F., Schaerer K., Seyberth H.W, Reis A. and Konrad M. (2000) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene *Eur J Hum Genet* **8**, 414–422
- Weber S., Schneider L., Peters M., Misselwitz J., Ronnefath G., Bonzel K.E., Seeman T., Šul'akov'a T., Kuwertz-Broeking E., Gregoric A., Palcoux J.B., Tasic V., Manz F., Schaerer K., Seyberth H.W. and Konrad M. ( 2001) Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* . **12**, 1872-81
- Kalausya P.J., Amasheh S., Gunzel D., Wurps H., Muller D., Fromm M., Hunziker W.(2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16 *J Clin Invest* **116**, 878-91
- Konrad M., Hou J., Weber S., Dotsch J., Kari J.A., Seeman T., Kuwertz-Broeking E., Peco-Antic A., Tasic V., Dittrich K., Alshaya H.O., von Vigier R.O., Gallatia S., Goodnough D.A. and Schaller A. (2008) CLDN16 Genotype Predicts Renal Decline in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis *J Am Soc Nephrol* **19**, 171–181
- Wolf M.T., Dotsch J., Konrad M., Boswald M., Rascher W. (2002) Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene *Pediatr Nephrol* **17**, 602–608
- Kang J.H., Choi H.J., Cho H.Y., Lee J.H., Ha I.S., Cheong H.I., Choi Y. (2005) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations *Pediatr Nephrol* **20**, 1490–1493
- Tajima T., Nakae J., Fujieda K. (2003) Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC *Pediatr Nephrol* **18**,1280–1282

- Tasic V., Dervisov D., Koceva S., Weber S., Konrad M. (2005) Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study *Pediatr Nephrol* **20**,1003–1006
- Sanjad S.A., Hariri A., Habbal Z.M., Lifton R.P. (2007) A novel PCLN-1 gene mutation in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and atypical phenotype *Pediatr Nephrol* **22**, 503–508
- Turkem M., Kasap B., Soylu A., Bober E., Konrad M., Kavukcu S. (2006) Paracellin-1 gene mutation with multiple congenital Abnormalities *Pediatr Nephrol* **21**, 1776–1778
- Staiger K., Staiger H., Haas C., Thamer C., Risler T., Machicao F., Häring H.U.(2007) Hypomagnesemia and nephrocalcinosis in a patient with two heterozygous mutations in the CLDN16 gene *J Nephrol.* **20**, 107-110
- Peru H., Akin F., Elmas S., Elmaci A.M., Konrad M. (2008) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: report of three Turkish siblings *Pediatr Nephrol* **23**, 1009–1012
- Al-Haggag M., Bakr A., Tajima T., Fujieda K., Hammad A., Soliman O., Darwish A., Al-Said A., Yahia S., Abdel-Hady D. (2009) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: unusual clinical associations and novel claudin16 mutation in an Egyptian family *Clin Exp Nephrol* **13**, 288-94
- Peco-Antić A., Konrad M., Milosevski-Lomić G., Dimitrijević N. (2010) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nefrocalcinosis: the first four patients in Serbia *Srp Arh Celok Lek.* **138**, 351-5

- Muller D., Kausalya P.J., Claverie-Martin F., Meij I.C., Eggert P., Garcia-Nieto V., Hunziker W. (2003) A Novel Claudin 16 Mutation Associated with Childhood Hypercalciuria Abolishes Binding to ZO-1 and Results in Lysosomal Mistargeting *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1293–1301
- Lehnert U., Xia Y., Royce T.E., Goh C.S., Liu Y., Senes A., Yu H., Zhang Z.L., Engelman D.M., Gerstein M. (2004) Computational analysis of membrane proteins: genomic occurrence, structure prediction and helix interactions. *Q Rev Biophys.* **37**, 121-46
- Martin T.A., Harrison G.M., Watking G., Jiang W.G. (2008) Claudin-16 Reduces the Aggressive Behavior of Human Breast Cancer Cells *J Cell Biochem.* **105**, 41–52
- Ikari A., Matsumoto S., Harada H., Takagi K., Hayashi H., Suzuki Y., Degawa M., Miwa M. (2006) Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci* **119**, 1781–1789