

SAGGIO FLUORIMETRICO CON YFP PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DELLA CFTR

Luis J.V. Galiotta, Lab. di Genetica Molecolare, Ist. Giannina Gaslini, Genova
Tel. 010-5636801 FAX: 010-3779797 E-mail: galiotta@unige.it

Nozioni di base sulle proteine YFP

La sensibilità agli anioni della proteina fluorescente gialla (yellow fluorescent protein, YFP) può essere sfruttata per effettuare saggi cellulari per la valutazione funzionale di canali e trasportatori anionici. La YFP, derivata per mutagenesi dalla GFP, ha una tasca, posizionata in vicinanza del cromoforo, che è capace di legare anioni quali cloruro, ioduro, tiocianato, nitrato e bromuro. Il legame dell'anione rende il cromoforo non fluorescente spegnendo quindi in pratica la YFP. Bisogna considerare che gli anioni non legano la YFP con uguale affinità: in particolare lo ioduro è un ligando migliore del cloruro. Questa caratteristica è alla base di saggi cellulari in cui lo scambio tra cloruro e ioduro attraverso canali e trasportatori anionici viene visualizzato attraverso variazioni di fluorescenza. Per questo tipo di saggi non si usa la YFP originaria ma dei mutanti generati successivamente per migliorarne la sensibilità allo ioduro (1,2). Il primo mutante contiene la mutazione della istidina 148 a glutammina (H148Q). La proteina YFP-H148Q ha una costante di affinità per lo ioduro e il cloruro rispettivamente di circa 20 mM e 100 mM (1). Un mutante generato successivamente YFP-H148Q/I152L ha un'affinità ulteriormente migliorata: 2 mM per lo ioduro e 20 mM per il cloruro (2). La versione YFP-H148Q/I152L ha quindi caratteristiche più idonee per la valutazione di mutanti di CFTR con bassa attività (3,4).

Principio del saggio

Cellule che esprimono la proteina YFP (H148Q o H148Q/I152L) equilibrate in una soluzione salina fisiologica vengono esposte ad un'alta concentrazione di ioduro (generalmente 100 mM). Appena aggiunto, lo ioduro inizia ad entrare nella cellula attraverso canali ionici o trasportatori ad esso permeabili. L'influsso di ioduro determina uno spegnimento (quenching) progressivo della fluorescenza dovuto al legame con la proteina YFP. Tanto maggiore sarà il trasporto di ioduro (quindi l'attività del canale o del trasportatore in esame), tanto più veloce sarà lo spegnimento della fluorescenza.

Il saggio basato su YFP è quindi un saggio in cinetica in cui la fluorescenza cellulare deve essere misurata senza interruzione prima e dopo l'aggiunta di ioduro. Non è necessario acquisire il segnale fino alla fine perchè il dato richiesto è la velocità iniziale di spegnimento. Il campionamento dei primi 15-30 secondi dopo l'aggiunta di ioduro sono sufficienti per valutare il trasporto.

Espressione della proteina YFP

A differenza di altre sonde fluorescenti per anioni come MQAE e SPQ, la YFP non può entrare nelle cellule per "caricamento" ma deve essere introdotta mediante transfezione stabile o transiente. Il canale o trasportatore da valutare (es. CFTR) può essere già presente nelle cellule bersaglio oppure può essere introdotto nelle stesse cellule per transfezione insieme alla YFP.

Apparecchiature richieste

Un microscopio a fluorescenza rovesciato fornito di filtri ottici per YFP (eccitazione: 505 nm; emissione: 535 nm; dicroico: 515 nm). Un corredo di filtri per GFP (circa 485 per eccitazione e 520 per emissione) può andare bene anche se la luminosità sarà minore. Il microscopio deve essere corredato di un sistema di registrazione della fluorescenza: un tubo fotomoltiplicatore accoppiato ad un sistema di acquisizione dati oppure una videocamera con acquisizione veloce (almeno 2-4 immagini al secondo). Nel caso di acquisizione con videocamera bisogna avere un programma per l'analisi dell'immagine per valutare le variazioni di intensità della fluorescenza. Questo è più laborioso del sistema con fotomoltiplicatore dove il segnale è unico e rappresenta la media di più cellule presenti nello stesso campo. Il sistema con videocamera e analisi dell'immagine offre però il vantaggio di determinare l'attività in ogni singola cellula. Questo può essere utile se vogliamo valutare l'omogeneità di espressione di un canale/trasportatore in una popolazione cellulare.

In alternativa al microscopio si può utilizzare un lettore di micropiastre in fluorescenza dotato degli opportuni filtri ottici per eccitazione ed emissione della YFP. Il lettore deve avere pompe e iniettori per l'aggiunta programmata di liquido nei pozzetti. Questo è necessario per aggiungere la soluzione con ioduro durante la lettura.

Il paragrafo seguente descrive la procedura utilizzata nel nostro laboratorio per determinare l'attività della CFTR mediante transfezione transiente su micropiastre da 96 pozzetti (5,6).

Saggio per CFTR con microscopio (transfezione transiente)

Per questo tipo di saggio vengono comunemente utilizzate cellule con alta efficienza di transfezione come le HEK-293. Le cellule vengono seminate in micropiastre da 96 pozzetti alla densità di 25.000 cellule per pozzetto in 100 µl di terreno di coltura (DMEM/F12) privo di antibiotici. Dopo 6 ore le cellule vengono co-transfettate con plasmidi codificanti per CFTR (normale o mutata) e per la YFP sensibile agli anioni.

La miscela di transfezione per ogni pozzetto contiene 0.2 µg di DNA plasmidico e 0.5 µl di Lipofectamina 2000 (Invitrogen) in 50 µl di OPTI-MEM (Invitrogen). La miscela viene incubata per 1 ora a temperatura ambiente per aiutare la formazione dei complessi DNA/Lipofectamina prima di essere aggiunta alle cellule.

Dopo 24 ore i complessi vengono rimossi sostituendo la miscela in ogni pozzetto con terreno di coltura fresco. Il saggio funzionale viene poi effettuato dopo aver aspettato altre 24 ore. Al momento del saggio le cellule vengono lavate delicatamente con soluzione salina (PBS) completa di ioni divalenti (in mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 0.7 CaCl₂, 1.1 MgCl₂, 1.5 KH₂PO₄, 8.1 Na₂HPO₄ (pH 7.4). Dopo lavaggio le cellule vengono incubate per 30 minuti con 60 µl di PBS per pozzetto contenenti le eventuali sostanze utilizzate per attivare/inibire/potenziare CFTR (es. 20 µM forskolina o 100 µM CPT-cAMP per stimolazione massima della proteina normale; aggiunta di genisteina 50-200 µM o di altri potenziatori per stimolare la proteina CFTR mutata). Al momento del saggio la micropiastre viene trasferita sul tavolino di un

microscopio a fluorescenza rovesciato. L'esecuzione del saggio procede un pozzetto alla volta: si inquadra un campo, si fa partire l'acquisizione del segnale fluorescente (fotomoltiplicatore, 5 campionamenti per secondo) o di una serie di immagini (videocamera, almeno 2-4 immagini al secondo). Durante l'acquisizione si aggiunge nel pozzetto (mediante micropipetta) la soluzione contenente ioduro per far partire lo spegnimento della YFP (165 μ l di una soluzione PBS modificata in cui tutto il NaCl è stato sostituito con 137 mM NaI).

Per l'analisi successiva dei dati si procede in questo modo:

1) sottrazione del "background" (pozzetto vuoto senza cellule) dall'intero tracciato ottenuto dalle cellule;

2) normalizzazione del tracciato ottenuto da ogni pozzetto rispetto alla fluorescenza iniziale corrispondente;

3) interpolazione del tracciato (nella fase successiva all'aggiunta di ioduro) con una funzione opportuna (singolo o doppio esponenziale a seconda dei casi);

4) determinazione della massima pendenza della curva così ottenuta. La sottrazione e la normalizzazione del segnale possono essere facilmente effettuate con un foglio Excel mentre l'interpolazione con funzione esponenziale e successivo calcolo della derivata massima della funzione così ottenuta richiedono un programma di calcolo tipo Igor (Wavemetrics).

La Figura mostra un esempio di tracciato ottenuto da cellule con co-espressione di CFTR mutata e proteina fluorescente. L'aggiunta di ioduro determina lo spegnimento della fluorescenza che viene quindi analizzato per determinare la pendenza massima e quindi il tasso di trasporto di ioduro che dipende dal livello di attività della proteina CFTR.

Questo tipo di saggio può essere applicato in teoria anche a cellule con espressione endogena di CFTR. In questo caso si effettua la transfezione transiente della sola proteina YFP. E' opportuno però considerare che, per quanto sensibile, il saggio potrebbe non rivelare attività in cellule con bassa espressione della proteina CFTR.

1) Jayaraman *et al.* (2001) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J. Biol. Chem.* 275:6047-6050.

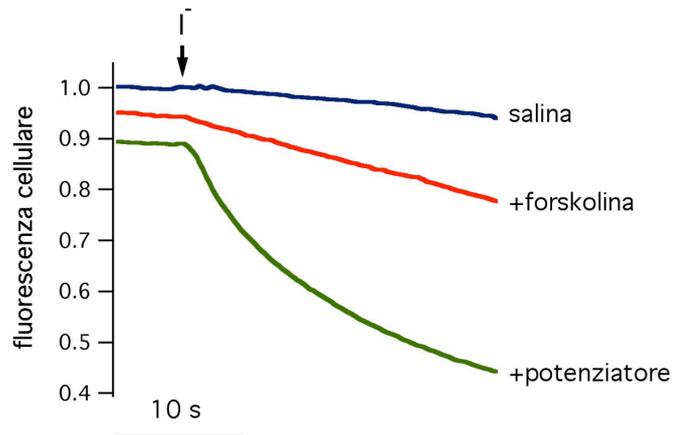
2) Galletta *et al.* (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett.* 499:220-224.

3) Yang *et al.* (2003) Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Δ F508-CFTR chloride channel gating. *J. Biol. Chem.* 278:35079-35085.

4) Pedemonte *et al.* (2005) Small-molecule correctors of defective Δ F508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* 115:2564-2571.

5) Caci *et al.* (2008) Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR_{inh}-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochem J.* 413:135-142.

6) Caputo *et al.* (2009) Mutation-specific potency and efficacy of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel potentiators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330:783-791.



Valutazione dell'attività di CFTR mediante saggio con YFP. La figura rappresenta un esempio di tracciati ottenuti da cellule HEK-293 co-transfettate con YFP-H148Q/152L e il mutante CFTR-E193K. La mutazione E193K appartiene alla classe 3 e quindi provoca un difetto di attività che può essere corretto con un *potenziatore*. La freccia mostra il momento dell'aggiunta della soluzione extracellulare ricca in ioduro che inizia a causare lo spegnimento della fluorescenza cellulare a causa del trasporto dello ioduro stesso attraverso la proteina CFTR. Senza stimolazione (soluzione salina da sola) il trasporto di anioni è molto basso e quindi lo spegnimento (*quenching*) è lento. Con forskolina (20 μ M), che stimola la produzione di cAMP intracellulare, l'attività di CFTR è aumentata, anche se non di molto a causa della mutazione. La presenza del potenziatore (PG-01, 0.5 μ M), in aggiunta alla forskolina, provoca un forte aumento di attività della proteina CFTR mutata con conseguente accelerazione del *quenching*.

MATERIALI

I reagenti (sali, forskolina, CPT-cAMP ecc.) sono acquistabili da Sigma-Aldrich. Il set di filtri ottici e dicroico ottimizzati per la YFP è fornito da Chroma Technology (www.chroma.com/). Le micropiastre da 96 pozzetti da noi utilizzate sono Corning Costar 3603. Il fotomoltiplicatore e relativo alimentatore sono della Hamamatsu. Il sistema di conversione analogico/digitale e acquisizione del segnale in fluorescenza è un PowerLab 2/25 (ADInstruments). Il sistema di acquisizione e analisi di immagini è basato su una camera CoolSNAP cf (Photometrics) e sul programma MetaMorph (Molecular Devices). Il plasmide per la YFP sensibile agli alogenuri può essere richiesto a: galietta@unige.it.