

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA**

**E MEDICINA SPERIMENTALE**

BORSA PON-"Ricerca e Innovazione 2014-2020"-

Dottorati innovativi con caratterizzazione industriale, XXXII Ciclo

**Settore scientifico disciplinare: Fisiologia BIO-09**

## *Ruolo fisiopatologico del trasporto ionico di membrana*

**Dottoranda: Dott.ssa Alessia G. D. Remigante**

**Tutor: Prof.ssa Angela Marino**, Dipartimento di Scienze Biologiche, Chimiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina.

**FIRMA**



**Tutor estero: PRIV. -DOZ. Silvia Dossena** PhD, Institute of Pharmacology and Toxicology Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Salzburg, (Austria).

**Coordinatore: Prof.ssa Maria Assunta Lo Gullo**, Dipartimento di Scienze Biologiche, Chimiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina.

**Anno Accademico 2018/2019**



# Indice

<b>Lista delle abbreviazioni</b>	6
<b>Abstract</b>	8
<b>1. Introduzione</b>	10
<i>1.1 Diabete e disturbi dell'umore (ansia e depressione)</i>	10
<i>1.2 Ruolo dei canali VRAC (volume-regulated anion channels) nel cervello</i>	14
<i>1.2.1 Ruolo dei canali VRAC nel controllo della neurogenesi</i>	14
<i>1.2.2 Ipotetico ruolo dei canali VRAC nel controllo dell'eccitabilità neuronale</i>	15
<i>1.3 Glicosilazione</i>	16
<i>1.3.1 O-GlcNAc modification</i>	17
<i>1.3.2 Hexosamine biosynthetic pathway (HBP)</i>	18
<i>1.3.3. O-GlcNAc nei processi fisiopatologici</i>	20
<i>1.4 RVD: Regolazione del volume cellulare</i>	20
<i>1.4.1 La corrente <math>ICl_{swell}</math></i>	22
<i>1.4.2 <math>ICln</math></i>	24
<i>1.4.3 <math>ICln</math> è O-GlcNAc modificata.</i>	26
<b>2. Ipotesi</b>	28
<i>2.1 Ipotesi generali e ipotesi dello studio</i>	28
<i>2.1.1 Ipotesi di lavoro.</i>	28
<b>3. Materiali e metodi</b>	29

3.1	<i>Colture cellulari</i>	29
3.2	<i>Plasmidi</i>	30
3.2.1	<i>Transfezione transiente</i>	30
3.3	<i>Patch-clamp in configurazione whole-cell</i>	31
3.3.1	<i>Protocolli di stimolazione</i>	32
3.3.2	<i>Esperimenti di patch-clamp</i>	33
3.3.3	<i>Soluzioni sperimentali</i>	33
3.3.4	<i>Analisi statistica</i>	34
3.4	<i>Manipolazione dei livelli globali di O-GlcNAc</i>	34
3.5	<i>Western Blotting.</i>	35
3.5.1	<i>Analisi densitometrica e statistica.</i>	36
3.6	<i>Vitalità cellulare determinata con MTS</i>	36
3.6.1	<i>Analisi statistica</i>	36
3.7	<i>Vitalità cellulare determinata con DAPI</i>	37
3.7.1	<i>Analisi statistica</i>	38
<b>4.</b>	<b>Risultati</b>	39
4.1	<i>Determinazione dei livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule SH-5Y5Y</i>	39
4.1.2	<i>Determinazione dei livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule HEK 293 Phoenix.</i>	40
4.2	<i>Vitalità cellulare tramite MTS in cellule HEK 293 Phoenix e in SH-SY5Y</i>	41
4.2.1	<i>Valutazione della vitalità cellulare tramite colorazione DAPI in cellule HEK 293 Phoenix e in cellule SH-5Y5Y</i>	42
4.3	<i>Effetto dell'incremento dei livelli di O-GlcNAc sulla corrente <math>ICl_{swell}</math> in cellule SH-5Y5Y</i>	43
4.4	<i>Determinazione dei livelli di espressione di ICln e delle sue forme mutanti in cellule HEK 293 Phoenix</i>	43
4.5	<i>Effetto dell'incremento dei livelli di O-GlcNAc sulla corrente <math>ICl_{swell}</math> in cellule HEK 293 Phoenix</i>	45

<i>4.5.1 Incremento dei livelli globali di O-GlcNAc tramite incubazione con 100 <math>\mu</math>M PUGNAc + 5 mM Glucosamina in HEK 293 Phoenix</i>	46
<b>5. Discussione</b>	56
<b>6. Conclusioni</b>	62
<b>7. Bibliografia</b>	64

## **Lista delle abbreviazioni:**

**ATP**, adenosine triphosphate

**BSA**, bovine serum albumin

**CLC**, chloride channels

**CLNS**, chloride channel nucleotide sensitive

**CoA**, acetyl-coenzyme A

**DAPI**, 4',6-diamidino-2- phenylindole

**DCPIB**, 4-[(2-Butyl-6, 7-dichloro-2-cyclopentyl-2, 3-dihydro-1-oxo-1*H*-inden-5-yl) oxy] butanoic acid

**DIDS**, 4, 4'-Diisothiocyano-2, 2'-stilbenedisulfonic acid

**DMEM/F12**, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

**DMSO**, dimethyl sulfoxide

**EDTA**, ethylene diamine tetraacetic acid

**EGFP**, enhanced green fluorescent protein

**FBS**, fetal bovine serum

**FRET**, fluorescence resonance energy transfer

**GABA**, gamma-aminobutyric acid

**GFAT**, glutamine: fructose aminotransferase

**GlcNAc**, N-acetylglucosamine

**GlcNAc-6-P**, N-Acetyl-glucosamine-6-phosphate

**HBP**, hexosamine biosynthesis pathway

**HEK**, human embryonic kidney

**HEPES**, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

**IC<sub>ln</sub>**, nucleotide-sensitive chloride current protein

**IC<sub>swell</sub>**, swelling-dependent chloride current

**IC<sub>vol</sub>**, volume-dependent chloride current

**IRES**, internal ribosome entry site

**IV**, current to voltage

**LRRC8**, leucine-rich repeat containing protein 8

**LRRC8A**, leucine-rich repeat containing protein 8A

**MDCK**, madin-darby canine kidney cells

**MEM**, minimum essential eagle medium

**MTS**, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium  
**NPPB**, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid  
**OGA**, O-GlcNAcase  
**O-GlcNAc**, O-linked-N-acetylglucosamine  
**OGT**, O-linked N-acetylglucosamine transferase  
**ORF**, open reading frame  
**PBS**, phosphate buffered saline  
**PFA**, paraformaldehyde  
**Pgp**, p-glycoprotein  
**PTMs**, posttranslational modifications  
**PUGNAc**, *O*- (2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate  
**PVDF**, poly (vinylidene fluoride)  
**RVD**, regulatory volume decrease  
**RVI**, regulatory volume increase  
**SH-SY5Y**, human neuroblastoma cell line  
**SDS**, sodium dodecyl sulphate  
**SDS-PAGE**, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis  
**SUMO**, small ubiquitin-like modifier  
**T1D**, type 1 Diabetes Mellitus  
**T2D**, type 2 Diabetes Mellitus  
**TBS**, tris-buffered saline  
**TBST**, tris-buffered saline with Tween 20  
**TEMED**, tetramethylethylenediamine  
**UDP-GlcNAc**, uridine diphosphate- $\beta$ -*N*-acetylglucosamine  
**VRAC**, volume-regulated anion channels  
**WHO**, world health organization

## Abstract

Diabetes leads to a number of complications involving brain function, including cognitive decline and depression. It is widely accepted that depression is the consequence of an impaired adult neurogenesis in the *gyrus dentatus* of hippocampus, but the molecular mechanisms leading to this phenomenon are still poorly understood. The process of neurogenesis consists of the proliferation of neural progenitors and differentiation of new neurons, and volume-regulated anion channels (VRAC), responsible for the activation of a chloride conductance ( $ICl_{swell}$ ) after anisosmotic cell swelling during cell volume regulation, are also essential in cell proliferation. In diabetes, an increased O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) of cellular proteins is often seen. O-GlcNAc is a reversible post-translational conjugation of N-acetylglucosamine to Serine or Threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins, regulated by two enzymes called O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA), respectively. Recently, the protein ICl<sub>n</sub>, which is crucial in the activation of the chloride conductance  $ICl_{swell}$ , has been found to be O-GlcNAcylated. Mass spectrometry and bioinformatics analysis of ICl<sub>n</sub> amino acid sequence indicate several O-GlcNAc modification regions, including a putative Yin O Yang site on Serine 67, *i.e.* a site that could be either phosphorylated or O-GlcNAc modified in a mutually exclusive manner.

In the present study, we investigated the behaviour of the swelling-activated chloride current  $ICl_{swell}$  following O-GlcNAc elevation, with focus on the role of ICl<sub>n</sub> protein in neuronal-like SH-SY5Y and in HEK 293 Phoenix cells. O-GlcNAc elevation was obtained by incubation of cells with PUGNAc (a pharmacological inhibitor of OGA) and Glucosamine (an O-GlcNAc precursor). Basal or swelling-activated  $ICl_{swell}$  was measured by patch-clamp in whole-cell configuration in native cells or cells overexpressing either the wild type ICl<sub>n</sub> or non-glycosilable forms of ICl<sub>n</sub> (ICl<sub>n</sub>T223A, ICl<sub>n</sub>S193X and ICl<sub>n</sub>S67A).

The results show that exposure of SH-SY5Y or HEK 293 Phoenix cells to PUGNAc and Glucosamine increases the global O-GlcNAc levels and, in parallel, significantly reduces cell viability. In SH-SY5Y cells, O-GlcNAc elevation significantly suppresses the basally activated  $ICl_{swell}$  current. In HEK 293 Phoenix cells, O-GlcNAc elevation inhibits the swelling-activated  $ICl_{swell}$  current following ICl<sub>n</sub> overexpression, with no effect on the endogenous swelling-activated current, thus indicating that O-GlcNAc modification can impair ICl<sub>n</sub> function. The ICl<sub>n</sub>T223A-induced current is similar to the wild type ICl<sub>n</sub>-induced current and is similarly suppressed after O-GlcNAc elevation. The ICl<sub>n</sub>S193X loses most of its activity, though the residual current is sensitive to O-GlcNAc elevation. Finally, the ICl<sub>n</sub>S67A-induced current is similar to the wild type ICl<sub>n</sub>-induced current, but insensitive to O-



GlcNAc elevation. Therefore, Threonine 223 is not involved in the suppression of ICln function following O-GlcNAc modification, and the O-GlcNAc modification site responsible for the suppression of ICln-induced current must be located upstream residue 193. Serine 67 is a strong candidate for O-GlcNAc modification.

These results underscore the essential role of O-GlcNAc modification in governing the chloride current  $ICl_{swell}$  through VRAC channels. We conclude that O-GlcNAcylation of the VRAC channels activator ICln in the context of hyperglycaemic conditions may lead to VRAC inhibition in brain, thus resulting in reduced neurogenesis, eventually leading to the depression disorder. The protein ICln may represent a novel therapeutic target in the prevention or treatment of pathological states characterized by chronically elevated O-GlcNAcylation of cellular proteins, including mood disorders linked to uncontrolled or poorly controlled hyperglycaemia.

# 1. Introduzione

## *1.1 Diabete e disturbi dell'umore (ansia e depressione)*

I disturbi dell'umore rappresentano quella classe di disturbi psicopatologici che consistono in alterazioni o anomalie del tono dell'umore dell'individuo, tali da causare alla persona colpita disadattamento con ripercussioni di varia entità nella vita inter-relazionale e/o lavorativa. Tra i disturbi dell'umore, la depressione è quella più frequente ed è caratterizzata da episodi in cui l'umore del soggetto appare depresso e accompagnato principalmente da bassa autostima e perdita di interesse in attività normalmente piacevoli. Tale condizione, considerata invalidante, coinvolge spesso sia la sfera affettiva che cognitiva della persona influenzando negativamente sulla vita familiare, lavorativa, sullo studio, sulle abitudini alimentari, ma anche sulla capacità di riposare, quindi sul generale stato di salute. Essa si manifesta attraverso una vasta serie di sintomi, variabili da paziente a paziente, fra cui si segnalano:

- umore depresso per la maggior parte del giorno;
- marcata diminuzione o perdita di interesse o piacere per tutte, o quasi tutte, le attività un tempo ritenute piacevoli (anedonia o apatia);
- agitazione o rallentamento psicomotorio;
- perdita o mancanza di energia, prostrazione fisica (astenia);
- disturbi d'ansia (attacchi di panico o preoccupazioni eccessive e persistenti);
- insonnia o ipersonnia;
- significativa perdita di peso in assenza di una dieta, o significativo aumento di peso, oppure diminuzione o aumento dell'appetito (iperfagia);
- diminuzione o perdita di motivazioni personali, capacità di pensare, concentrarsi, risolvere problemi, prendere iniziative o decisioni, agire e pianificare il proprio futuro;
- tendenza all'isolamento, alla solitudine, alla sedentarietà, scarsa cura di sé e emarginazione con diminuzione dei rapporti sociali e affettivi;
- sentimenti di inquietudine, impotenza, diminuzione di autostima, inutilità, sfiducia, delusione costante, pessimismo sul futuro, negativismo sul presente, perdita di senso di vivere, senso di vuoto, tendenza al pianto, fino a senso di fallimento, sconforto o disperazione oppure sentimenti eccessivi o inappropriati di colpa, recriminazione, risentimento ed emarginazione.

I sintomi non sono necessariamente tutti presenti, essi possono variare da paziente a paziente e in genere la patologia ha un decorso lento, insidioso e tendente ad aggravarsi nel tempo se non trattata tempestivamente [*Sanavio E. et al., 2010*].

Dal punto di vista epidemiologico, secondo l'organizzazione mondiale della sanità (WHO), la depressione si trova al momento al quarto posto nella classifica mondiale delle malattie più gravi e, secondo le previsioni, potrebbe arrivare al secondo posto nel 2030. Essa colpisce circa il 15% della popolazione, prevalentemente donne rispetto agli uomini, in un rapporto di 2:1. Il periodo di insorgenza più comune è tra i 20 e i 30 anni con un picco tra i 30 e i 40 anni [*Bromet E. et al., 2011*]. Esiste una correlazione tra ansia e depressione. Spesso i due disturbi si presentano in modo indipendente, ma in alcuni casi persone che per molto tempo soffrono di ansia e di attacchi di panico sviluppano nel tempo un senso di angoscia verso la propria vita che può sconfinare in una vera e propria depressione. Allo stesso modo, persone a lungo depresse sviluppano una percezione di pericolo verso la propria vita che può portare in un secondo momento a stati ansiosi e ad attacchi di panico. Molti psichiatri, in caso di depressione, di ansia e di attacchi di panico, suggeriscono cure farmacologiche che sono una combinazione di ansiolitici e antidepressivi.

Ad oggi, due sono le teorie che spiegano la fisiopatologia della depressione [*De Battista C. Chapter 30, 2012*]. La teoria classica (ipotesi delle monoamine) prevede che un deficit della funzione o concentrazione di neurotrasmettitori (dopamina, serotonina e noradrenalina) nelle regioni corticali e limbiche causi depressione. Una teoria più recente (ipotesi neurotrofica) propone che la depressione possa essere associata a perdita di fattori neurotrofici che regolano la plasticità neurale e la neurogenesi. Parecchie sono le evidenze a supporto dell'ipotesi neurotrofica:

1. Studi in modelli animali e pazienti sottoposti a stress e dolore cronici denotano una riduzione della concentrazione di fattori neurotrofici e conseguente atrofia dell'ippocampo;
2. Numerosi studi morfologici nei pazienti depressi indicano che la depressione è associata a una perdita di volume dell'ippocampo;
3. In modelli animali, l'infusione di fattori neurotrofici ha un effetto antidepressivo;
4. In modelli animali, il trattamento con antidepressivi aumenta i livelli di fattori neurotrofici, che si associa ad un aumento della neurogenesi nell'ippocampo;
5. In pazienti depressi, la concentrazione di fattori neurotrofici nel siero e nel liquido cerebrospinale è ridotta, e viene incrementata dal trattamento con antidepressivi.

È importante sottolineare che l'ansia e la depressione sono spesso viste nel contesto di altre condizioni patologiche croniche, tra cui:

- Diabete di tipo 1 (T1D) [*Korczak DJ. et al., 2011*] [*Roy T. et al., 2012*];
- Diabete di tipo 2 (T2D) [*Ho N. et al., 2013*] [*Hussain S. et al., 2018*];
- Sindrome di Cushing [*Pivonello R. et al., 2010*];
- Malattie infiammatorie croniche che richiedono l'uso a lungo termine di corticosteroidi [*Schorr S.G. et al., 2016*];
- Stress cronico [*De Celis M.F. et al., 2016*].

La prevalenza della depressione nelle coorti di pazienti diabetici è significativamente aumentata rispetto alla popolazione generale. In altre parole, avere il diabete aumenta il rischio di sviluppare disturbi dell'umore [*Hussain S. et al., 2018*] [*Ho N. et al., 2013*] [*Roy T. et al., 2012*]. Lo stesso vale per i trattamenti farmacologici a lungo termine con corticosteroidi negli esseri umani così come per i modelli animali [*Crupi R. et al., 2011*] o le condizioni di ipercortisolemia, che alla fine culminano nello sviluppo di insulino-resistenza e sindrome metabolica [*Wellen K.E. et al., 2005*]. Secondo queste evidenze, Mansur e collaboratori hanno coniato il termine "Metabolic Mood Syndrome" [*Mansur R.B. et al., 2015*] per sottolineare che la relazione tra depressione e sindrome metabolica (insulino-resistenza, obesità addominale e iperglicemia) è bidirezionale e reciproca. Non a caso, dunque, le persone che soffrono di depressione vivono in una condizione di costante malumore, di rallentamento psicomotorio, di sedentarietà, e di conseguenza tendono ad avere un incremento del peso corporeo. Inoltre, l'anedonia, ovvero l'incapacità di trarre piacere da un'attività o un evento, è uno dei sintomi principali della depressione e impedisce ai pazienti di partecipare all'attività fisica e avere uno stile di vita sano [*Renn B.N. et al., 2011*]. La depressione inficia l'aderenza alle cure e predispone alle complicanze, mentre il diabete, soprattutto se presenta difficoltà di controllo, costituisce un fattore di rischio per l'insorgenza della depressione. Sebbene i meccanismi responsabili che legano le due patologie non siano del tutto noti, la combinazione di fattori fisiologici e non fisiologici, probabilmente, potrebbe spiegare la patogenesi della loro comorbidità [*Ismail K. et al., 2010*].

Il diabete è una malattia metabolica di tipo cronico, caratterizzata da elevati livelli di glucosio plasmatico, condizione nota anche come iperglicemia. Secondo l'organizzazione mondiale della sanità, nel 2019 oltre 422 milioni di persone in tutto il mondo hanno il diabete. Attualmente si stima che circa l'8% della popolazione adulta in Europa abbia il diabete e questa percentuale dovrebbe aumentare al 9,2% nel 2030. A lungo termine, i pazienti diabetici sono a rischio di complicanze che possono interessare più organi del corpo, inclusi gli occhi, i reni, il cuore e il cervello, con significativi tassi di morbilità e mortalità [*Ho N. et al., 2013*].

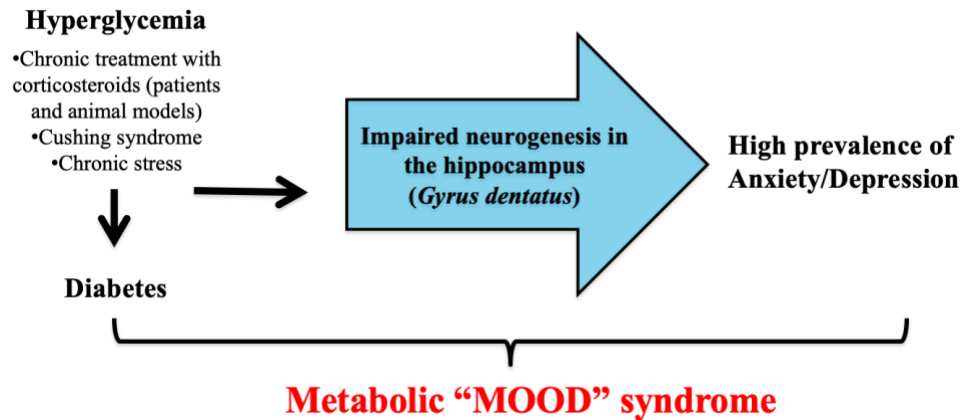
Esistono due principali forme di diabete mellito: diabete mellito di tipo 1 (T1D) e diabete mellito di tipo 2 (T2D). Il T1D è una malattia autoimmune caratterizzata dalla carenza di insulina. Il sistema immunitario, identificando le cellule beta del pancreas, responsabili della produzione di insulina, come estranee e dannose tende ad attaccarle e distruggerle. Il T2D, d'altra parte, è caratterizzato da una diminuzione della sensibilità all'insulina nei tessuti periferici e da una conseguente alterazione della secrezione di insulina. Questo squilibrio è comunemente associato ad altre alterazioni metaboliche come ipercolesterolemia, ipertensione e obesità.

La chiave per comprendere il legame tra i disturbi dell'umore e il diabete potrebbe risiedere nel processo di neuroplasticità sopra citato, ossia il rimodellamento strutturale del cervello dopo esposizione a lungo termine ad una terapia farmacologica con glucocorticoidi oppure in seguito all'insorgenza di patologie in cui i livelli di glucosio in circolo risultano rimanere per lungo tempo sopra-soglia. È stato dimostrato che anche uno stress prolungato porta a una serie di cambiamenti in determinate regioni del cervello. Nello specifico, una delle regioni maggiormente coinvolte in tali rimodellamenti è l'ippocampo (*gyrus dentatus*) [Ho N. et al., 2013]. Nel cervello adulto, il giro dentato svolge un'importante funzione, ovvero consente il meccanismo della neurogenesi. Il processo di neurogenesi si verifica infatti solo in due regioni nel cervello adulto, di cui una è il giro dentato dell'ippocampo. Questo fenomeno consiste nella proliferazione di cellule progenitrici neurali adulte e nella produzione di nuovi neuroni partendo da cellule staminali neurali o da cellule progenitrici, e nel differenziamento, migrazione e integrazione funzionale dei nuovi neuroni nelle reti neurali.

Gli effetti del diabete sul cervello sono stati studiati in modelli sperimentali di T1D e T2D, con particolare attenzione alla compromissione della neurogenesi dell'ippocampo, al rimodellamento dendritico e all'aumento dell'apoptosi [Reus G.Z. et al., 2017] [Zunszain P.A. et al., 2011]. A tal proposito, è stato condotto uno studio in cui sono stati considerati due modelli animali differenti: i ratti "Zucker Diabetic" con iperglicemia e diminuzione della neurogenesi, e i ratti "non-diabetic Zucker Lean Control", utilizzati invece come controllo e quindi non patologici. Lo studio era indirizzato a valutare gli effetti dell'esercizio fisico in animali affetti da iperglicemia. Infatti i dati finali hanno confermato che l'esercizio fisico ha aumentato significativamente la neurogenesi dell'ippocampo e ridotto i livelli di glicemia plasmatica nei ratti "Zucker Diabetic" [Yi X.J. et al., 2009].

Immagini fornite da risonanza magnetica hanno mostrato una riduzione complessiva delle dimensioni del cervello, che va dallo 0.5% al 2%, in individui affetti da T2D [Gonul A.S. et al., 2011]. Ciò ha fornito ulteriori prove a supporto del potenziale link tra il diabete e compromissione della neurogenesi [McIntyre R.S. et al., 2010]. Purtroppo, lunghi periodi di esposizione allo stress iperglicemico

inducono riduzione del numero delle spine dendritiche, decremento delle proteine sinaptiche e aumento dei marker legati all'apoptosi a livello ippocampale. Secondo questi dati, è possibile dunque ipotizzare un potenziale legame tra il diabete e i disturbi dell'umore, i quali originerebbero dalla compromissione della neurogenesi nell'ippocampo di un cervello adulto (*Fig. 1*).



*Fig. 1 Potenziale link tra il diabete e i disturbi dell'umore*

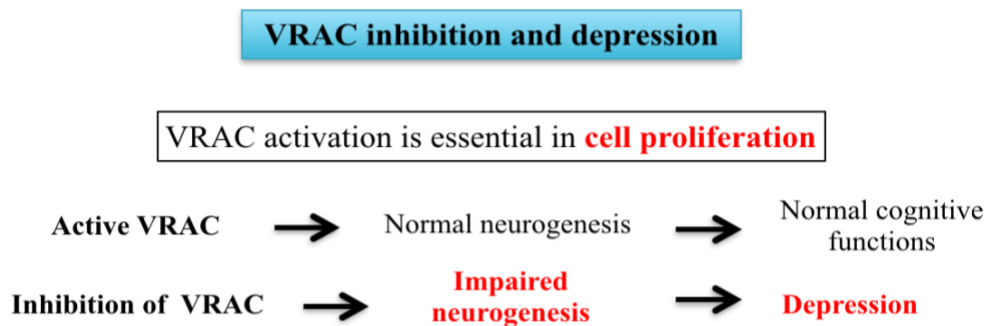
## ***1.2 Ruolo dei canali VRAC (volume-regulated anion channels) nel cervello***

Studi di elettrofisiologia hanno identificato una conduttanza anionica, indotta dai volume-regulated anion channels (VRAC), in tutti i citotipi neuronali (neuroni, astrociti e microglia) [Elorza-Vidal X. et al., 2019] [Mongin A.A. 2016] [Nagelhus E.A. 2013]. I canali VRAC sono responsabili dell'attivazione di una conduttanza di cloruro ( $ICl_{swell}$ ) in seguito a rigonfiamento cellulare dovuto a cambiamenti nel contenuto extracellulare o intracellulare da parte di molecole osmoticamente attive, svolgendo una funzione chiave nella regolazione del volume cellulare, in particolare durante l'attivazione del meccanismo di RVD (regulatory volume decrease). Tali canali però possiedono funzioni pleiotropiche, sono essenziali nella proliferazione cellulare e possono controllare l'eccitabilità neuronale.

### ***1.2.1 Ruolo dei canali VRAC nel controllo della neurogenesi***

È ampiamente documentato che i VRAC sono essenziali nella proliferazione cellulare. Nelle cellule di glioblastoma, la proliferazione cellulare era ridotta in seguito a trattamento con DCPIB [Wong R. et al., 2018], un potente antagonista dei VRAC, indicando così che la corrente di cloruro attivata da rigonfiamento era coinvolta nella proliferazione cellulare. Inoltre, l'aumento del volume cellulare

dovuto all'accumulo di Taurina ha portato alla proliferazione di cellule staminali/progenitrici in colture di topo adulto [*Hernandez-Benitez R. et al., 2014*]. Sebbene sia ampiamente accettato che la depressione è la conseguenza di una compromissione della neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo [*De Battista C. Chapter 30*] non è ancora chiaro quali siano le cause principali. E' possibile ipotizzare che un'inibizione dei canali VRAC possa comportare un'alterata neurogenesi con diminuzione della proliferazione cellulare nell'ippocampo (*Fig. 2*).

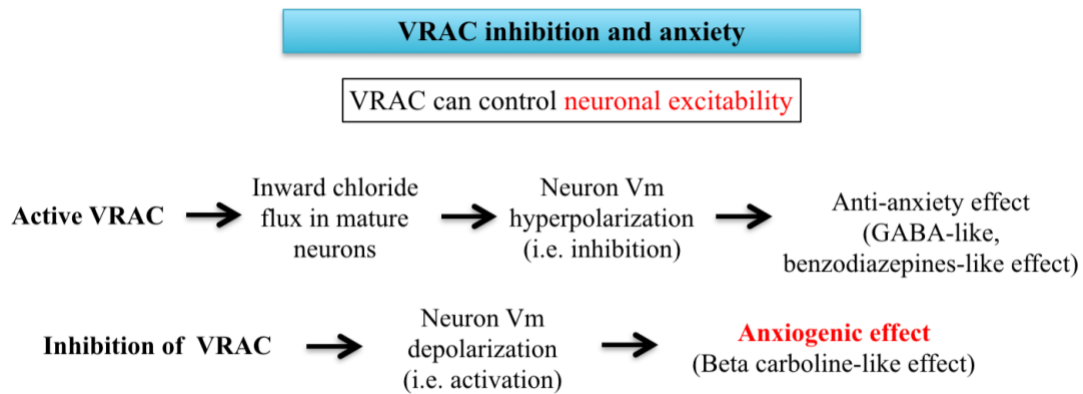


*Fig. 2 Possibile link tra i VRAC e la depressione*

### ***1.2.2 Ipotetico ruolo dei canali VRAC nel controllo dell'eccitabilità neuronale***

La maggior parte dei neuroni maturi nel cervello adulto ha una concentrazione intracellulare di ioni Cl<sup>-</sup> molto bassa [*Untiet V. et al., 2017*], il che consente ai neuroni di regolare la loro eccitabilità tramite l'azione di neurotrasmettitori inibitori, come l'acido gamma amino butirrico (GABA) o la Glicina. I recettori GABA-A mediano appunto l'azione inibitoria e vengono attivati ogni volta che due molecole di GABA interagiscono sui loro siti specifici. Con l'apertura del poro-canale si ha l'entrata di Cl<sup>-</sup> che iperpolarizza la membrana cellulare con conseguente aumento della soglia di eccitabilità neuronale, quindi riduzione della probabilità che un potenziale d'azione possa avere inizio. In seguito a rigonfiamento neuronale, oppure in caso di attivazione basale dei VRAC in assenza di stress ipotonico, è facile immaginare che l'apertura dei canali VRAC possa causare l'inibizione dell'attività neuronale, in quanto tali canali, favorendo l'entrata di ioni Cl<sup>-</sup>, possono agire come equivalenti dei recettori sensibili al GABA, conducendo quindi ad un effetto ansiolitico (anti-anxiety effect, GABA-like, benzodiazepines-like effect). Notoriamente infatti, le benzodiazepine, che sono farmaci ansiolitici, agiscono come attivatori dei recettori GABA-A [*De Battisti C. Chapter 30, 2012*]. Per tale motivo, ipotizziamo che l'inibizione della corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento attraverso i canali

VRAC possa portare alla depolarizzazione dei neuroni, portando così ad un effetto ansiogeno (beta carboline-like effect; le beta-carboline sono agonisti inversi del recettore GABA-A, ossia riducono la sua attività basale) (*Fig. 3*).



*Fig. 3 Potenziale link tra i VRAC e l'ansia*

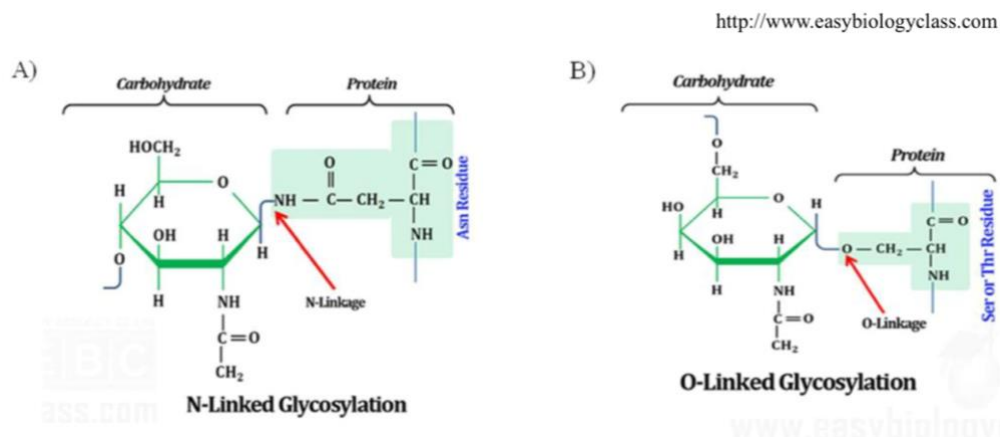
### 1.3 Glicosilazione

La ricerca sulle modificazioni post-traduzionali (PTMs) si è rivelata negli ultimi anni di grande interesse e i recenti sviluppi di metodi d'indagine quali la spettrometria di massa hanno contribuito ad aumentare notevolmente le conoscenze in questo campo. Il proteoma, l'insieme delle proteine funzionali presenti in un organismo, supera abbondantemente il numero di singole proteine che possono essere codificate dal DNA [Walsh C.T. et al., 2005]. La complessità del proteoma è principalmente dovuta allo splicing dell'RNA messaggero, alle modifiche post-traduzionali su uno o più siti amminoacidici [Qing G et al., 2017] oppure alle interazioni proteina-proteina [Dossena S. et al., 2013]. I PTM sono modificazioni biochimiche in cui i residui amminoacidici delle proteine nascenti o già ripiegate possono essere modificati tramite legame con gruppi funzionali, che a loro volta possono modificare il processo di ripiegamento e, di conseguenza, la funzione della stessa proteina. In risposta a stimoli extra- e intracellulari, una proteina può essere sottoposta a uno o più PTM per poter svolgere funzioni sempre più complesse e specifiche [Walsh C.T. et al., 2005]. Una stessa proteina può subire più PTM e tali modifiche possono competere tra di loro, in quanto possono avvenire sullo stesso residuo amminoacidico [Oliver Pagel S.L. et al., 2015]. Tra i PTM, i più frequenti sono: fosforilazione, acetilazione, metilazione, ubiquitinazione, SUMOsilazione (small ubiquitin-like modifiers) e glicosilazione [Prabakaran S. et al., 2012].



Tra i PTM, la glicosilazione delle proteine è la più diffusa e svolge un ruolo chiave in molti processi fisiologici e patologici. Esistono due tipi principali di glicosilazione delle proteine:

- **La N-Glicosilazione** che consiste nel legame tra una catena oligosaccaridica e un atomo di Azoto di residui di Asparagina, mediante un N-linkage (**Fig. 4 A**) [Manconi B. et al., 2016].
- **L'O-Glicosilazione**, che consiste nel legame tra un singolo monosaccaride e un atomo di Ossigeno di residui di Serina o Treonina di una proteina target, mediante un O-linkage [Manconi B. et al., 2016] (**Fig. 4 B**).



**Fig. 4 Tipologie di glicosilazione.** A) La N-Glicosilazione che consiste nell'aggiunta di un residuo oligosaccaridico all'atomo di Azoto della catena laterale dei residui di Asparagina di una proteina bersaglio. B) L' O-Glicosilazione che consiste nell'aggiunta di uno specifico monosaccaride al gruppo ossidrilico della catena laterale di residui di Serina o Treonina di una proteina bersaglio.

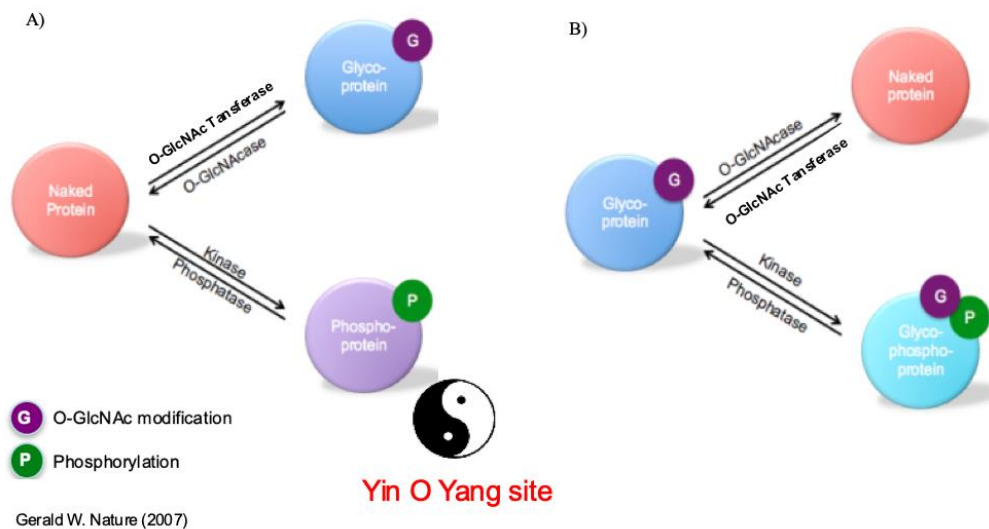
E' stato evidenziato che alcune proteine citosoliche e nucleari vengono glicosilate da un sistema enzimatico particolare presente nel citoplasma [Eustice M. et al., 2017] [Holt G.D. 1986]. Tale meccanismo prende il nome di **O-GlcNAcylation** (O-GlcNAc modification).

### 1.3.1 O-GlcNAc modification

La  $\beta$ -N-acetilglucosamina O-linked (O-GlcNAcylation, O-GlcNAc) è una particolare forma di O-Glicosilazione, scoperta nei primi anni '80 [Holt G.D. 1986], che consiste nell'aggiunta di uno specifico monosaccaride, la N-acetilglucosamina, sul gruppo ossidrilico di residui di Serina o Treonina di proteine nucleari e citoplasmatiche. Le caratteristiche dell'O-GlcNAcylation sono le seguenti: (i) un singolo monosaccaride viene legato ad una proteina target; (ii) il meccanismo ha luogo principalmente nel nucleo, nel citoplasma e nei mitocondri, ma non nel reticolo endoplasmatico; (iii) il meccanismo è un processo reversibile. D'altra parte, in altre forme di glicosilazione, come la N-Glicosilazione, la reazione è irreversibile e le catene di carboidrati coinvolte nel meccanismo si allungano in complesse

strutture oligosaccaridiche, localizzate sulla superficie cellulare e all'interno del lume di organelli citoplasmatici, come il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi [Bond M.R. et al., 2015].

Analogamente alla fosforilazione, l'O-GlcNAcylation regola molti processi cellulari. Diversi studi hanno dimostrato che O-GlcNAc e la fosforilazione possono competere per uno stesso residuo di Serina o Treonina (sito Yin O Yang) di una specifica proteina. Pertanto, un sito Yin O Yang può essere modificato mediante O-GlcNAcylation o fosforilazione in maniera mutualmente esclusiva [Yao H. et al., 2015] (Fig. 5A). Un tipico esempio di sito Yin O Yang si trova nella proteina oncogene c-Myc [Li Z. et al., 2014]. In alternativa, O-GlcNAc fosforilazione possono verificarsi su amminoacidi diversi ma situati nelle immediate vicinanze, influenzandosi a vicenda (Fig. 5B), tipico esempio la proteina P53 [Yang W.H. et al., 2006].



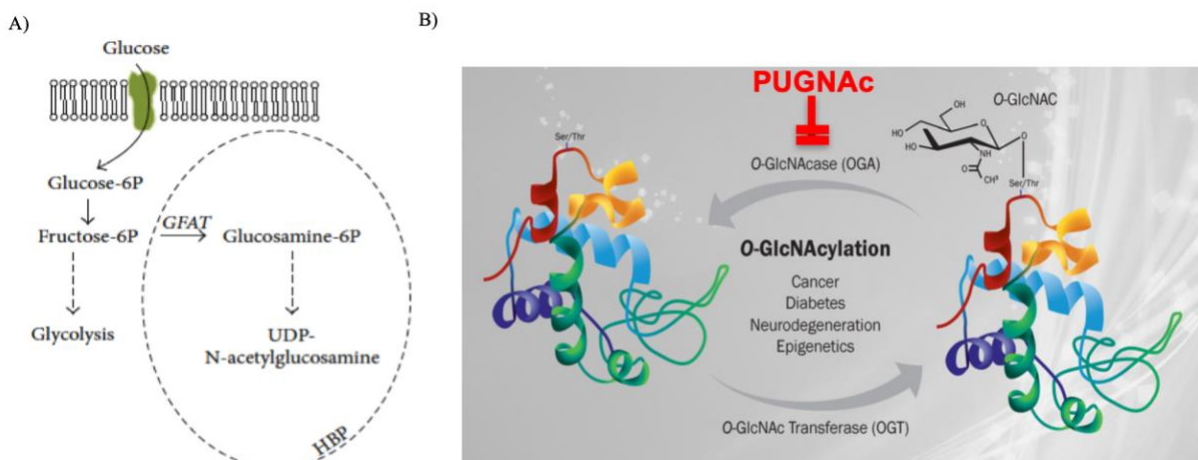
**Fig. 5 Interazione tra Fosforilazione e O-GlcNAc modification.** A) La Fosforilazione e l'O-GlcNAc modification possono competere per lo stesso sito amminoacidico (sito Yin O Yang). B) La Fosforilazione e l'O-GlcNAc modification possono verificarsi su siti amminoacidici diversi ma vicini, influenzandosi a vicenda.

### 1.3.2 Hexosamine biosynthetic pathway (HBP)

L'exosamine biosynthetic pathway (HBP) genera uridina difosfato- $\beta$ -N-acetilglucosamina (UDP GlcNAc), che è il substrato dell'O-GlcNAcylation [Marshall S. et al., 1991]. Una volta che il glucosio entra in cellula, viene rapidamente convertito in glucosio-6-fosfato che può essere usato per la sintesi di glicogeno o modificato in fruttosio-6-fosfato dall'enzima glucosio-6-fosfato isomerasi. La stragrande maggioranza del fruttosio-6-fosfato viene convogliata verso la glicolisi, tuttavia una piccola percentuale (circa il 2-3%) viene deviata verso l'HBP grazie all'attività dell'enzima

glutamina:fruttosio aminotransferasi (GFAT). La glutamina è il co-substrato, insieme al fruttosio-6-fosfato per l'attivazione dell'enzima GFAT, essenziale per la conversione del fruttosio-6-fosfato in glucosamina-6-fosfato [Benjamin Lauziera F.V. et al., 2013]. Nella seguente reazione, l'enzima glucosamina-6-fosfato acetil-transferasi converte la glucosamina-6-fosfato in N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-fosfato), utilizzando acetil-coenzima A (CoA). Successivamente, si assiste alla conversione di GlcNAc-6-fosfato in GlcNAc-1-fosfato da una mutasi e infine avviene la formazione di UDP-GlcNAc da parte di UDP-GlcNAc pirofosforilasi [Marshall S. et al., 1991] (Fig. 6 A).

I substrati dell'HBP possono derivare dal metabolismo degli aminoacidi (Glutamina), dal metabolismo dei lipidi (Acetil-CoA), dal metabolismo dei nucleotidi (UDP) e dal metabolismo del glucosio (Glucosio-6-fosfato). Le modifiche legate al meccanismo di O-GlcNAcylation sono strettamente controllate dall'attività di due soli enzimi, l'O-GlcNAc transferasi (OGT), che catalizza il legame di O-GlcNAc ai residui di Serina o Treonina della proteina bersaglio [Haltiwanger R.S. et al., 1990] e l'O-GlcNAcase (OGA), che rimuove dalla proteina target il substrato O-GlcNAc [Aquino-Gil M. et al., 2017]. L'attività di questi due enzimi rende la modifica post-traduzionale un processo specifico e reversibile (Fig. 6 B).



Fisi V. et al. Oxidative Medicine and Cellular Longevity (2017)  
Hwang A. et al. Pharmacological Research (2017)

**Fig. 6 Hexosamine biosynthetic pathway (HBP).** A) L'HBP pathway, utilizzando una piccola percentuale di glucosio cellulare, permette la sintesi di uridina difosfato- $\beta$ -N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). B) L'UDP-GlcNAc è il substrato donatore per la O-GlcNAc transferasi (OGT), enzima che catalizza l'aggiunta del residuo zuccherino a una proteina bersaglio, mentre l'O-GlcNAcase (OGA) catalizza la rimozione del residuo O-GlcNAc dalla proteina bersaglio. OGA è inibita farmacologicamente da PUGNAc.

### ***1.3.3 O-GlcNAc nei processi fisiopatologici***

L'O-GlcNAcylation è un meccanismo che può intervenire in diversi processi: trasduzione del segnale, trascrizione genica, ciclo cellulare e metabolismo energetico [Hart G.W. 2014]. Essendo l'O-GlcNAcylation coinvolta in maniera cruciale in molte funzioni cellulari, non è sorprendente che questa modifica post-traduzionale abbia un ruolo importante anche nell'eziologia di alcune condizioni patologiche come il diabete, la tossicità da glucosio, il cancro e le patologie neurodegenerative [Peterson S.B. et al., 2016] [Olivier-Van Stichelen S. et al., 2015].

È stato ampiamente dimostrato che il diabete scarsamente controllato o non controllato porta ad iperglicemia e, di conseguenza, all'aumento dell'O-GlcNAcylation in varie tipologie cellulari [Li Z. et al., 2014] [Yang W.H. et al., 2006]. Studi recenti hanno inoltre evidenziato il coinvolgimento dell'O-GlcNAcylation nella modulazione della funzione omeostatica della regolazione del volume cellulare. In particolare, il meccanismo del decremento regolatore del volume cellulare (RVD) è compromesso in seguito ad incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc nelle cellule di Jurkat [Nagy T. et al., 2010]. Altri saggi funzionali hanno evidenziato che la corrente di cloruro mediata dai canali VRAC e attivata in seguito a rigonfiamento cellulare è compromessa in adipociti e miociti di topi diabetici. Sfortunatamente, in questi studi non sono stati determinati i livelli cellulari di O-GlcNAc [Inoue H. et al., 2010] [Yamamoto S. et al., 2009]. Nel complesso tuttavia, questi risultati indicano che elevati livelli cellulari di O-GlcNAc possono inibire l'attivazione dei canali VRAC e di conseguenza la corrente  $ICl_{swell}$ . A tal proposito, è interessante notare che la proteina ICln, cruciale nell'attivazione dell' $ICl_{swell}$  attraverso i canali VRAC, è O-GlcNAc-silata [Hahne H.S.N. et al., 2013].

### ***1.4 RVD: Regolazione del volume cellulare***

La membrana plasmatica delle cellule animali è permeabile all'acqua e dotata di bassa rigidità; l'acqua si muove essenzialmente attraverso un processo diffusivo garantito dalla differenza di osmolarità tra ambiente intracellulare ed extracellulare [Lang F. et al., 1998 A]. Le cellule, oltre a mantenere un volume costante in condizioni basali, sono in grado di controbilanciare i cambiamenti del proprio volume, che potrebbero alterare lo stato morfologico e fisiologico della cellula causando gravi danni e perfino indurre morte cellulare. L'esposizione delle cellule ad uno stress osmotico determina una serie di eventi di trasduzione del segnale che, a loro volta, attivano eventi regolatori del volume, di tipo protettivo e adattativo [Hoffmann E.K. et al., 2009]. Le variazioni del volume cellulare si possono verificare sia in condizioni fisiologiche, come durante il differenziamento e la divisione cellulare [Lang

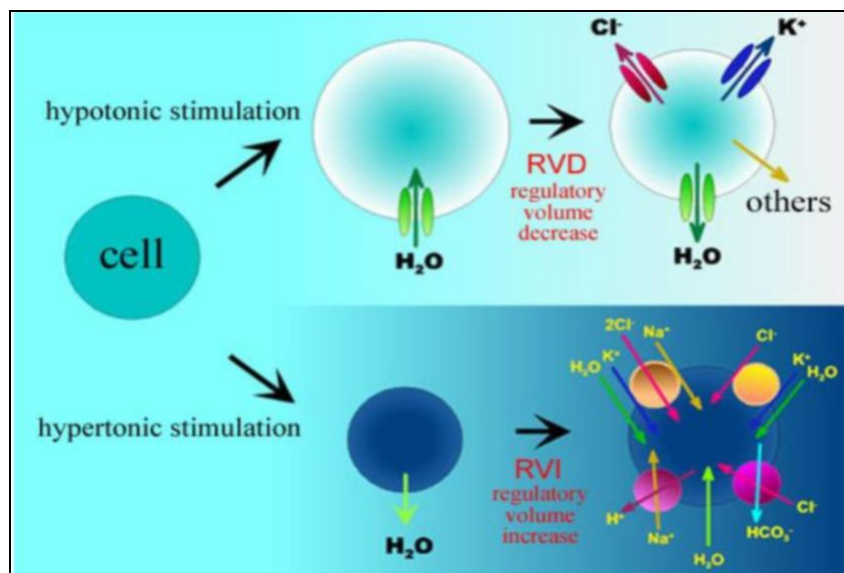
*F. et al., 1998 B*], che patologiche, come in caso di ischemia, ipossia [*Okada Y. et al., 1997*], alcalosi [*Hoffmann E.K. et al., 1989*], iperglicemia [*Lang F. 2011*], e in seguito a squilibri osmotici [*Hoffmann E.K. et al., 2009*].

Le strategie usate per controbilanciare il rigonfiamento cellulare variano nei diversi organismi, tessuti e tipi cellulari. I meccanismi messi in atto durante l'RVD hanno il compito di diminuire l'osmolarità intracellulare; avverrà così per osmosi, una fuoriuscita di acqua dalla cellula, in modo da controbilanciare l'acquisto iniziale e far recuperare alla cellula il volume originario. In condizioni di ipotonicità extracellulare o ipertonicità intracellulare si crea un flusso di acqua verso il citoplasma che provoca il rigonfiamento della cellula, mentre l'ipertonicità extracellulare o l'ipotonicità intracellulare portano all'uscita di acqua dalla cellula e quindi ad una riduzione del suo volume.

In caso di rigonfiamento, le cellule attivano un meccanismo chiamato decremento regolatorio del volume (RVD: regulatory volume decrease), che permette un recupero del volume cellulare tramite l'uscita di acqua dalla cellula. Lo stesso rigonfiamento cellulare attiva un rapido rilascio di KCl e di osmoliti organici non essenziali, e di conseguenza di acqua. Il rilascio di KCl dopo il rigonfiamento cellulare avviene mediante attivazione del co-trasportatore  $K^+/Cl^-$ , e attivazione parallela di canali  $K^+$  e canali anionici (VRAC), o attraverso l'attivazione degli scambiatori  $K^+/H^+$  e  $Cl^-/HCO_3^-$ . [*Hoffmann E.K. et al., 2007*].

Al contrario, lo shrinkage (raggrinzimento), ovvero la riduzione del volume cellulare, attiva l'assorbimento di NaCl attraverso il co-transporto  $Na^+/K^+/2Cl^-$ , lo scambiatore  $Na^+/H^+$  e i canali cationici non selettivi. L'assorbimento di NaCl genera un influsso d'acqua, permettendo alla cellula il ripristino del volume originale. Questo fenomeno è chiamato incremento regolatorio del volume (RVI: regulatory volume increase) [*Pedersen S.F. et al., 2016*] (*Fig. 7*).

La corrente anionica denominata  $ICl_{swell}$  (swelling-dependent chloride current) [*Ackerman M.J. et al., 1994 A*] [*Ackerman M.J. et al., 1994 B*] o  $ICl_{vol}$  (volume-dependent chloride current) [*Nilius B. et al., 1994*] dipende dai canali VRAC (volume-regulated anion channel/current) [*Levitan I. e Garber S.S. 1998*] presenti a livello della membrana plasmatica.



*Fig. 7 Meccanismi di trasporto coinvolti nella regolazione del volume cellulare. RVD (Regulatory Volume Decrease) e RVI (Regulatory Volume Increase).*

### **1.4.1 La corrente $I_{Cl_{swell}}$**

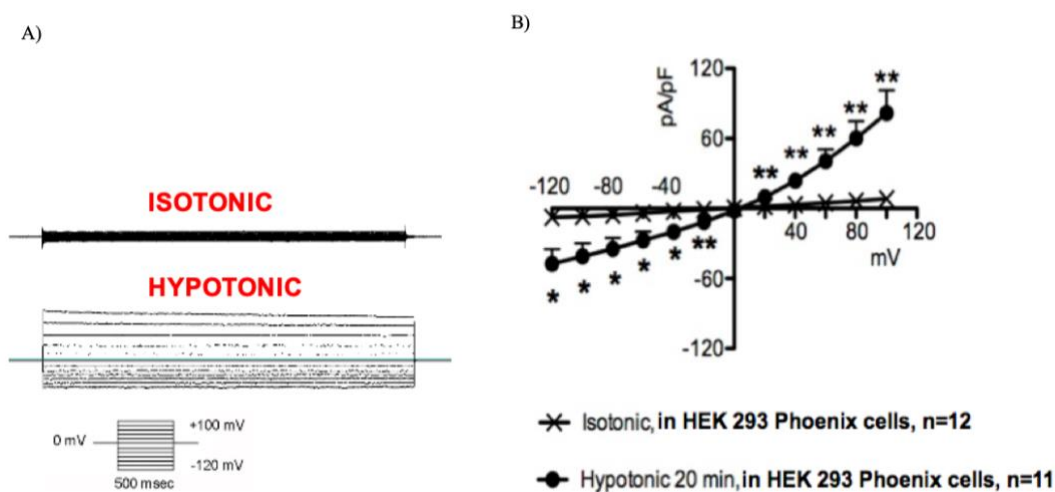
Quando una cellula è esposta ad una soluzione extracellulare ipotonica, attiva una corrente anionica determinata dal rigonfiamento cellulare denominata  $I_{Cl_{swell}}$  [Ritter M. et al., 2003]. Esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell hanno mostrato che la corrente  $I_{Cl_{swell}}$ , mediata da questi canali, possiede le seguenti caratteristiche (Fig. 8 A-B):

- rettificazione uscente [Okada Y. et al., 1997 A];
- veloce cinetica di attivazione (<1ms) [Lang F. et al., 1998 A];
- lenta inattivazione, tempo dipendente, a potenziali positivi (+40 mV) [Ackerman M.J. et al., 1994 B]. Tale inattivazione è variabile a seconda del tipo cellulare e può inoltre essere modulata da differenti fattori quali: presenza di cationi bivalenti ( $Mg^{2+}$ ) nel mezzo extracellulare, presenza di ATP nel mezzo intracellulare o extracellulare, variazioni di pH. L'aumento della concentrazione extracellulare di  $Mg^{2+}$  potrebbe avere conseguenze differenti a seconda del tipo di cellula, potrebbe quindi sopprimere [Oiki S. et al., 1994], oppure attivare, o non avere alcun effetto sulla corrente di  $I_{Cl_{swell}}$  [Bond T. et al., 1999].

$I_{Cl_{swell}}$  è attivata in presenza di ATP intracellulare [Jackson P.S. e Strange K. 1994]. Tuttavia, l'uso di una forma non idrolizzabile di ATP ha evidenziato che non è necessaria alcuna idrolisi dell'ATP per l'attivazione della corrente. Nello specifico, l'ATP intracellulare sembra essere

necessario per evocare  $ICl_{swell}$  quando lo stimolo ipotonico è modesto, ma non è necessario quando lo stimolo è più forte [Volk K.A. et al., 1996]. Al contrario, l'ATP extracellulare è un ottimo inibitore di  $ICl_{swell}$  [Okada Y. 1997 B] [Strange K. et al., 1996]. L'acidificazione extracellulare aumenta l'inattivazione della corrente a potenziali positivi [Nilius B. et al., 1998 A].

- inibizione tramite: bloccanti non selettivi dei canali anionici, 4,4-diisotiocianato-2,2-stilbenedisulfonicacid (DIDS) e 5-nitro-2-(3phenylpropyl-amino) acido benzoico (NPPB) [Nilius B. et al., 1998 B] [Nilius B. et al., 1997]; composti come il Tamoxifene [Pedersen S.F. et al., 2016] o l'acido 4-(2-butyl-6,7-diclor-2-ciclopentilindan-1-on-5-il)-ossobutirrico (DCPIB) [Akita T. et al., 2014] [Harrigan T.J. et al., 2008]; anti-estrogeni come il Clomifene o il Nafoxidina [Pedersen S.F. et al., 2016] [Maertens C.D.G. et al., 2001]. Inoltre è importante sottolineare che i bloccanti dell' $ICl_{swell}$  inibiscono di conseguenza anche il meccanismo di RVD [Furst J. et al., 2002]. Questa osservazione sottolinea il fatto che  $ICl_{swell}$  è essenziale per tale meccanismo e in condizioni fisiopatologiche in cui l'attivazione di  $ICl_{swell}$  è compromessa, anche l'RVD potrebbe subire alterazioni.



**Fig. 8 Proprietà biofisiche della corrente  $ICl_{swell}$ .** A) Regrazioni originali ottenute mediante tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell con incrementi di voltaggio pari a 20mV, (da -120 a +100mV) in cellule HEK 293 Phoenix, mantenute in condizioni isotoniche e ipotoniche. La corrente attivata da soluzione extracellulare ipotonica mostra una rettificazione uscente e lenta inattivazione a potenziali più positivi di +40mV. B) La relazione tra densità di corrente (pA/pF) e voltaggio (mV) conferma l'attivazione della corrente  $ICl_{swell}$  in condizioni di ipotonicità e la rettificazione uscente; n=12 e n=11 indicano il numero di esperimenti (cellule); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , ottenuti con Student t-test, quando la corrente registrata in condizioni ipotoniche veniva paragonata al controllo (condizione di isotonia).

Pur essendo note da tempo le caratteristiche elettrofisiologiche di  $ICl_{swell}$ , i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione della corrente di cloruro sono rimasti sconosciuti per più di 30 anni [*Strange K. et al., 2019*] [*Pedersen S.F. et al., 2015*]. La mancanza di informazioni era dovuta in parte al fatto che l'identità molecolare dei canali VRAC non venisse stabilita in modo inequivocabile. Tuttavia, varie proteine sono state proposte come candidati molecolari negli ultimi decenni [60]. I primi candidati furono la P-glicoproteina (Pgp) [*Valverde M.A. et al., 1992*], alcuni membri della famiglia del canale del cloruro (CLC) (CLC-2, CLC-3) [*Duan D. et al., 1997*] e la proteina ICl<sub>n</sub> [*Paulmichl M. et al., 1992*].

Ma nel 2014, due gruppi di ricerca indipendenti hanno identificato la proteina LRRC8A (leucine-rich repeat containing protein 8A) come componente essenziale del canale VRAC che permette l'attivazione di  $ICl_{swell}$  [*Qiu Z. et al., 2014*] [*Voss F.K. et al., 2014*]. Questi studi forniscono le basi per comprendere il preciso meccanismo di attivazione dei canali VRAC e identificare i loro partner molecolari. LRRC8A e altri membri della famiglia LRRC8 formano strutture eteromeriche, di cui la composizione controlla la conduttanza del canale, la rettificazione, la selettività degli anioni e la cinetica di inattivazione [*Syeda R. et al., 2016*] [*Voss F.K. et al., 2014*]. Ricostituendo le proteine purificate in doppi strati lipidici artificiali, si nota come i diversi complessi LRRC8 formino canali anionici attivati da disequilibrio osmotico tra i due compartimenti a contatto con la membrana [*Syeda R. et al., 2016*].

Tuttavia, altri autori hanno dimostrato che il decremento dell'osmolarità non è né sufficiente né indispensabile per attivare i canali VRAC. Pertanto, in un contesto cellulare, altri fattori, incluse le interazioni con altri complessi proteici, le modifiche post-traduzionali [*Konig B. e Stauber T. 2019*], l'attivazione di secondi messaggeri o persino l'attivazione di altri canali ionici [*Liu Y. et al., 2019*], possono contribuire all'attivazione della corrente  $ICl_{swell}$ .

Sulla base di tali evidenze scientifiche, nel presente elaborato è stato investigato il ruolo svolto dalla proteina ICl<sub>n</sub> (nucleotide-sensitive chloride current protein), in quanto è stata dimostrata essere essenziale nell'attivazione dell' $ICl_{swell}$  attraverso i canali VRAC in seguito a rigonfiamento cellulare [*Paulmichl M. et al., 1992*].

### **1.4.2 ICl<sub>n</sub>**

ICl<sub>n</sub> è una proteina multifunzionale costituita da 237 amminoacidi, clonata per la prima volta nel 1992 [*Paulmichl M et al., 1992*]. dalle cellule epiteliali MDCK (Madine Darby Canine Kidney), altamente



conservata lungo la scala evolutiva, e ubiquitariamente espressa. La proteina è fondamentale per la sopravvivenza cellulare, infatti, il knockout di ICln è letale in stadi molto precoci dello sviluppo embrionale sia in topo che in nematode [Furst J. et al., 2002]; ciò indica che ICln ha un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare [Furst J. et al., 2005]. Il gene umano (CLNS: chloride channel nucleotide sensitive) che codifica per la proteina è localizzato sul cromosoma 11q13.5-14.1 ed è controllato da un promotore costitutivamente attivo, caratteristica tipica di tutte quelle proteine a funzione di house-keeping [Scandella E. 2000]. A livello subcellulare ICln è prevalentemente distribuita nel citosol in forma solubile (circa 90%), mentre per il restante 10% è localizzata nella membrana plasmatica. Condizioni di stress ipotonico possono portare, tuttavia, alla traslocazione reversibile di ICln dal citoplasma verso la membrana. In particolare, nei fibroblasti NIH/3T3 [Ritter M. et al., 2003], la riduzione dell'osmolarità extracellulare porta alla traslocazione di ICln dal citosol alla frazione microsomiale. Tale fenomeno è evidente anche in cellule cardiache di embrione di razza [Mush M.W. et al., 1997] e in miociti cardiaci di ratto [Mush M.W. et al., 1998]. La traslocazione è stata dimostrata anche in cellule HEK 293, mediante esperimenti di FRET [Rodighiero S. et al., 2008]. Inoltre, trattando i microsomi con il detergente Triton X-100, ICln si solubilizza. Questo ha permesso di ipotizzare l'esistenza di un'interazione tra la proteina e il doppio strato lipidico, a conferma della possibilità di una traslocazione reversibile di ICln verso la membrana plasmatica [Mush M.W. et al., 1998]. È stato anche proposto [Paulmichl M. et al., 1992] [Ritter M. et al., 2003] che la traslocazione porti ad una vera e propria inserzione di ICln nel bilayer lipidico, ipotesi supportata dal fatto che la ricostituzione della proteina purificata in bilayer lipidico artificiale generi una corrente ionica [Furst J. et al., 2000].

Sebbene la proteina sia stata clonata ormai da molti anni, le sue funzioni non sono ancora state chiaramente definite e il quadro delle sue funzioni è andato ampliandosi nel corso degli anni. La prima funzione associata ad ICln è stata individuata nel meccanismo di RVD: si ritiene infatti che giochi un ruolo fondamentale nell'attivazione della corrente  $ICl_{swell}$ . L'importanza di ICln nella regolazione del volume cellulare è stata dimostrata mediante esperimenti con oligodeossinucleotidi anti-senso complementari alla porzione iniziale della regione codificante per ICln [Gshwentner M. et al., 1995], e con anticorpi monoclonali anti-ICln [Krapivinsky G.B. et al., 1994], che determinano la soppressione di  $ICl_{swell}$ . In accordo con questi dati, l'espressione di ICln in oociti di *Xenopus* [Paulmichl M. et al., 1992] oltre che in altri tipi cellulari [Dossena S. et al., 2011] porta all'attivazione di una corrente con caratteristiche fenotipiche riconducibili a  $ICl_{swell}$ . L'insieme di questi dati quindi ha indotto a supporre che ICln potesse essere una delle entità molecolari attraverso cui si origina  $ICl_{swell}$ , e che la

traslocazione di ICln verso la membrana coincidesse con la sua inserzione in forma di dimero, forse in configurazione “beta-barrel”, nella membrana plasmatica. Per verificare la correttezza di queste ipotesi, ICln purificata è stata ricostituita in membrane artificiali microscopiche (mediante tecnica tip-dip) e macroscopiche (tecnica del black lipid bilayer). Tali esperimenti suggerito che la proteina è effettivamente in grado di traslocare spontaneamente dalla soluzione alla membrana lipidica generando una corrente anionica [Strange K. et al., 1996] [Furst J. et al., 2000]. Un’ipotesi alternativa prevede che ICln possa permettere l’attivazione di un canale anionico preesistente in membrana, di cui ICln sarebbe un potenziale regolatore [Ritter M. et al., 2003] [Buyse G. et al., 1996].

Oltre al ruolo di regolatore del volume cellulare, la proteina svolge altre funzioni, ma non direttamente legate alla permeazione degli ioni. Più precisamente, è stato dimostrato, un suo coinvolgimento:

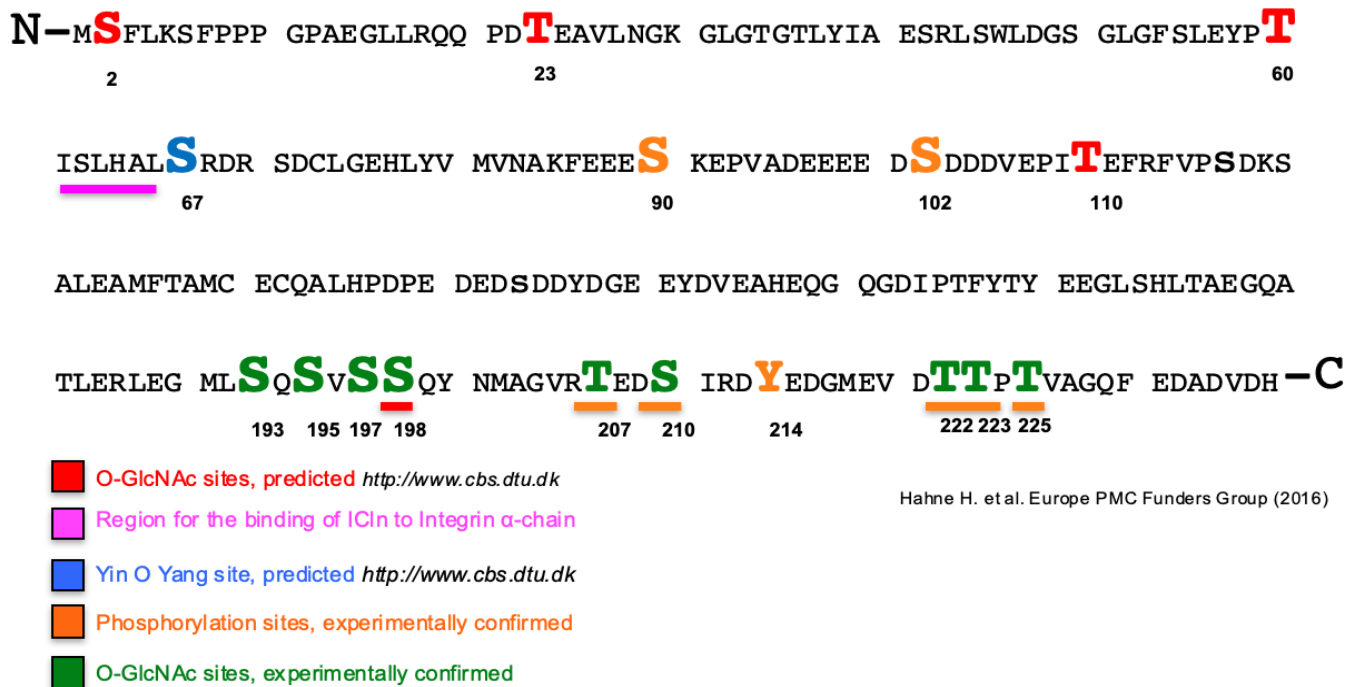
- nella regolazione della morfologia cellulare [Krapivinsky G.B. et al., 1994] [Morabito R. et al., 2017], soprattutto in virtù della sua interazione con molecole citoscheletriche come actina e miosina;
- nello splicing dell’RNA [Furst J. et al., 2005] [Furst J. et al., 2002];
- nell’attivazione delle piastrine [Larkin D. et al., 2004];
- nell’angiogenesi [Yonekura H. et al., 2004].

### ***1.4.3 ICln è O-GlcNAc modificata***

Come già spiegato in dettaglio, ICln è una proteina multifunzionale, ubiquitariamente espressa, altamente conservata ed è considerata essenziale nel processo di attivazione della corrente  $ICl_{swell}$  tramite i canali VRAC [Paulmichl M. et al., 1992]. Hahne e collaboratori hanno dimostrato mediante “click-chemistry” e spettrometria di massa che la proteina ICln è O-GlcNAc modificata [Hahne H.S.N. et al., 2013], ma non hanno identificato quali specifici aminoacidi sarebbero glicosilati. Infatti, l’analisi bioinformatica della sequenza amminoacidica dell’isoforma umana di ICln rivela la presenza di vari siti di modifica O-GlcNAc (**Fig. 9**). Esperimenti di spettrometria di massa condotti dai nostri collaboratori dell’Università di Pécs (Prof. A. Miseta e Dr. T. Nagy; Ungheria), hanno dimostrato che il sito C-terminale di ICln è O-GlcNAc modificato, ma al contempo alcuni aminoacidi presenti in prossimità di tale sito sono anche fosforilati, come si evince dalla figura 9. Inoltre, è interessante notare che la proteina ICln mostra anche un sito Yin O Yang predetto sulla Serina 67 (Ser 67), che si trova in prossimità della regione cruciale per il legame della proteina al dominio intracellulare della subunità  $\alpha$  dell’integrina [Schedlbauer A. et al., 2019].

Le integrine rappresentano una famiglia eterodimerica di molecole di adesione cellulare costituite da una subunità  $\alpha$  e da una  $\beta$ , e sono coinvolte nella regolazione degli eventi di segnalazione attraverso la membrana cellulare, svolgendo un ruolo critico in molte funzioni cellulari, come l'adesione cellulare, la migrazione, la differenziazione, la proliferazione, l'apoptosi, e la modulazione dell'attività dei canali ionici [La Flamme S.E. et al., 2018] [Davis M.J. et al., 2002].

È stato dimostrato che ICln svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'attivazione piastrinica attraverso l'interazione molecolare con l'integrina  $\alpha$ IIb, e specificamente con la sequenza amminoacidica KVGFFKR (Sequenza di riferimento NCBI: NP\_000410.2), sito altamente conservato del dominio intracellulare della subunità  $\alpha$  [Larkin D. et al., 2009] [Raab M. et al., 2010] [Daxecker H. et al., 2008] [Furst J. et al., 2006] [Larkin D. et al., 2004]. Più recentemente, è stato mostrato che l'interazione tra ICln e il dominio intracellulare della subunità  $\alpha$  dell'integrina non avviene solo a livello delle piastrine, ma è molto probabile che sia un tipo di interazione che si verifica in tutte le cellule, ed è essenziale per l'attivazione dell'ICl<sub>swell</sub>. Infatti, perturbando l'interazione molecolare diretta tra ICln e l'integrina  $\alpha$  si ottiene una soppressione dell'ICl<sub>swell</sub> [Schedlbauer A. et al., 2019]. L'attività della proteina ICln è quindi legata alle integrine, e O-GlcNAc potrebbe controllare l'interazione tra ICln e l'integrina  $\alpha$  e quindi controllare l'attivazione di ICl<sub>swell</sub>.



**Fig. 9 Sequenza amminoacidica dell'isoforma umana di ICln.** In rosso: i siti putativi O-GlcNAc modificati; in rosa, la regione di legame con il dominio intracellulare della catena  $\alpha$  dell'integrina; in blu, il sito putativo Yin O Yang; in arancione, i siti fosforilati e confermati da spettrofotometria di massa; in verde, i siti O-GlcNAc modificati e confermati sperimentalmente da spettrometria di massa.

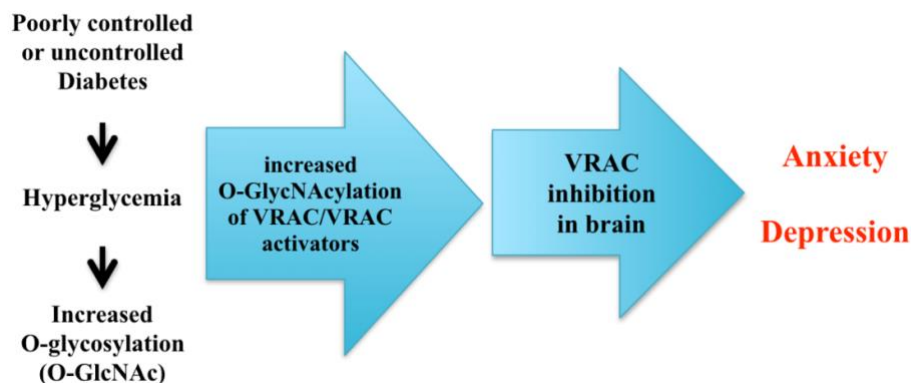
## 2. Ipotesi

### 2.1 Ipotesi generali e ipotesi dello studio

Sulla base dell'evidenza che la depressione (indotta da compromissione della neurogenesi adulta) è vista nel contesto di diverse condizioni patologiche caratterizzate da iperglicemia e che i canali VRAC possono controllare la neurogenesi, si può supporre che l'iperglicemia incontrollata possa portare a una compromissione della neurogenesi attraverso l'inibizione dei canali VRAC.

Sulla base dell'evidenza che anche l'ansia (ipereccitabilità neuronale) è vista nel contesto di diverse condizioni patologiche caratterizzate da iperglicemia e che i canali VRAC possono essere coinvolti nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, si può supporre che l'iperglicemia incontrollata possa portare ad un aumento dell'eccitabilità neuronale attraverso l'inibizione dell'attività dei VRAC.

Pertanto, è possibile ipotizzare che l'O-GlcNAcylation dei canali VRAC o degli attivatori dei canali VRAC (ICln) nel contesto di condizioni iperglicemiche possa portare all'inibizione dei VRAC nel cervello, con conseguente riduzione della neurogenesi e incremento dell'eccitabilità neuronale, portando infine ad un fenotipo di ansia e depressione (*Fig. 10*).



*Fig. 10 Il possibile meccanismo molecolare dei disturbi dell'umore indotti da iperglicemia*

#### 2.1.2 Ipotesi di lavoro

Nel presente studio, abbiamo investigato il fenotipo della corrente di cloruro attivata da rigonfiamento cellulare (ICl<sub>swell</sub>) dopo incremento dei livelli di O-GlcNAc, con particolare attenzione al ruolo svolto dalla proteina ICln, considerata un attivatore dei canali VRAC.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su due differenti linee cellulari:

- Cellule SH-SY5Y (ATCC<sup>®</sup> CRL-2266<sup>™</sup>) (Human neuroblastoma);
- Cellule HEK 293 Phoenix (Human Embryonal Kidney).

Le SH-SY5Y sono cellule che hanno un'origine neuroectodermale, con caratteristiche fenotipiche molto simili a quelle delle cellule neuronali; la linea cellulare originale, chiamata SK-N-SH, da cui la linea SH-SY5Y è stata sub-clonata, è stata isolata da una biopsia del midollo osseo prelevata da una paziente femmina di quattro anni con neuroblastoma. Le cellule SH-SY5Y sono di fenotipo adrenergico ma esprimono anche marcatori dopaminergici e, come tali, sono usate per studiare fenomeni come neurogenesi o differenziamento neuronale. Tali cellule sono spesso utilizzate come modelli per studi *in vitro*, in quanto si prestano bene alle indagini legate ai disturbi dell'umore (ansia e depressione). Le cellule erano seminate in terreno DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient mixture F12 HAM, D-0547, Sigma) già contenente di aminoacidi non essenziali, addizionato di siero bovino fetale (FBS, DE14-801F, Lonza) al 10%, di Penicillina (P0781, Sigma) 280 mM, di Streptomicina (P0781, Sigma) 144 mM e di NaHCO<sub>3</sub> (144-55-8, Sigma) al 7.5%.

Le HEK 293 Phoenix, originariamente derivate da cellule renali embrionali umane, presentano anch'esse un fenotipo neuronale in quanto esprimono canali del potassio voltaggio-dipendenti tipicamente espressi in cellule eccitabili [*Costa R. et al., 2018*], e sono state ampiamente utilizzate in quanto rappresentano un ottimo modello per studi *in vitro* a causa della loro intensa proliferazione e della loro propensione alla trasfezione. Tali cellule si prestano particolarmente per gli studi di elettrofisiologia mediante tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell per la facilità con cui permettono la realizzazione dei sigilli. Le cellule erano seminate in terreno MEM (Minimum Essential Medium, M5650, Sigma) già contenente aminoacidi non essenziali, addizionato di siero bovino fetale (FBS, DE14-801F, Lonza) al 10%, di L-Glutamina (G7513, Sigma) 200 mM, di Penicillina (P0781, Sigma) 280 mM, di Streptomicina (P0781, Sigma) 144 mM e di Acido Piruvico (P2256-25, Sigma) 1 mM.

Entrambe le linee cellulari sono state mantenute in incubatore (ThermoScientific, Austria) (T = 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, umidità 100%) e sottoposte a passaggi di tripsinizzazione (Trypsin/Ethylenediaminetetra acetic acid, EDTA, E9884, Sigma) ogni due/tre giorni per consentire la propagazione della coltura cellulare, e per tale scopo le cellule venivano seminate in capsule Petri del diametro di 10 cm.

## 3.2 Plasmidi

Per eseguire alcuni degli esperimenti proposti in tale elaborato scientifico, l'isoforma umana di ICl<sub>n</sub> (sequenza di riferimento NCBI: NP\_001284.1) è stata clonata nei seguenti vettori:

- vettore bicistronico pIRES2EGFP, (Clontech, Europa);
- vettore pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2, (Clontech, Europa).

L'uso di un vettore contenente il sito di ingresso del ribosoma (Internal Ribosome Entry Site; IRES) consente l'espressione simultanea della proteina di interesse (ICl<sub>n</sub>) e del marker di trasfezione (proteina fluorescente verde, EGFP) sotto forma di due distinte proteine, codificate però dallo stesso mRNA bicistronico, senza la produzione di una proteina di fusione [*Morgan R.A. et al., 1992*]. Gli esperimenti di controllo sono stati condotti in cellule trasfettate con il vettore pIRES2EGFP-EGFP, in cui una sequenza di codifica per EGFP aggiuntiva è stata clonata nel vettore di espressione pIRES2EGFP. Di conseguenza, un singolo vettore di controllo contiene due sequenze di codifica per EGFP (una nel sito di clonazione multipla e una a valle della sequenza IRES).

I plasmidi codificanti per: pIRES2EGFP-hICl<sub>n</sub>T223A (forma mutante di ICl<sub>n</sub> in cui la Treonina 223 è stata sostituita dall'Alanina), pIRES2EGFP-hICl<sub>n</sub>S193X (forma tronca di ICl<sub>n</sub>, privata del sito C-terminale), pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2-hICl<sub>n</sub>S90X (forma tronca di ICl<sub>n</sub>, a cui è stato legato un Flag-tag all'estremità N-terminale), pIRES2EGFP-hICl<sub>n</sub>S67A (forma mutante di ICl<sub>n</sub>, in cui la Serina 67 è stata sostituita dall'Alanina), sono stati ottenuti mediante mutagenesi sito-specifica del vettore pIRES2EGFP-hICl<sub>n</sub> e pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2-hICl<sub>n</sub>.

La mutagenesi sito-specifica è una tecnica usata per studiare la relazione struttura-funzione di una proteina, mediante l'introduzione di specifiche mutazioni in vettori plasmidici. Tale tecnica è stata eseguita con il kit di mutagenesi sito-specifica (QuikChange, Thermofisher), seguendo i protocolli forniti direttamente dalla casa produttrice e tramite l'utilizzo di primer di mutagenesi, progettati internamente (Generunner, versione 5.0.993 Beta) e ottenuti da Microsynth AG (Svizzera). Tutti i vettori plasmidici sono stati sequenziati (Microsynth AG, Svizzera) prima di essere utilizzati.

### 3.2.1 Trasfezione transiente

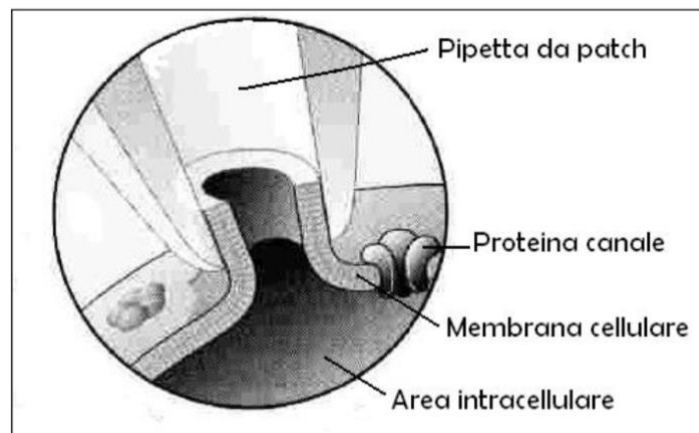
Il meccanismo di trasfezione consiste nell'introduzione di materiale genetico in cellule eucariotiche. Nella trasfezione transiente, il DNA plasmidico non è integrato nel DNA genomico della cellula trasfettata e sarà degradato dopo 4-5 giorni, portando così a una diminuzione dell'espressione proteica. Uno dei metodi maggiormente utilizzati per la trasfezione transiente è la coprecipitazione tramite

l'utilizzo del  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Tale metodo si basa sulla formazione di precipitati di DNA plasmidico che si vengono a formare in seguito all'interazione con gli ioni Calcio. L'efficienza di trasfezione del metodo della co-precipitazione del Calcio-Fosfato può variare tra le diverse linee cellulari, e infatti è ~90% per le cellule HEK 293 Phoenix e molto più bassa in altre linee cellulari.

Le cellule destinate agli esperimenti venivano seminate su piastre multi-wells da 6 pozzetti, lasciate crescere per 16 ore in modo da raggiungere una confluenza di circa il 50-60% ed esposte per 24 ore ad una miscela di trasfezione contenente 3  $\mu\text{g}$  di DNA plasmidico.

### ***3.3 Patch-clamp in configurazione whole-cell***

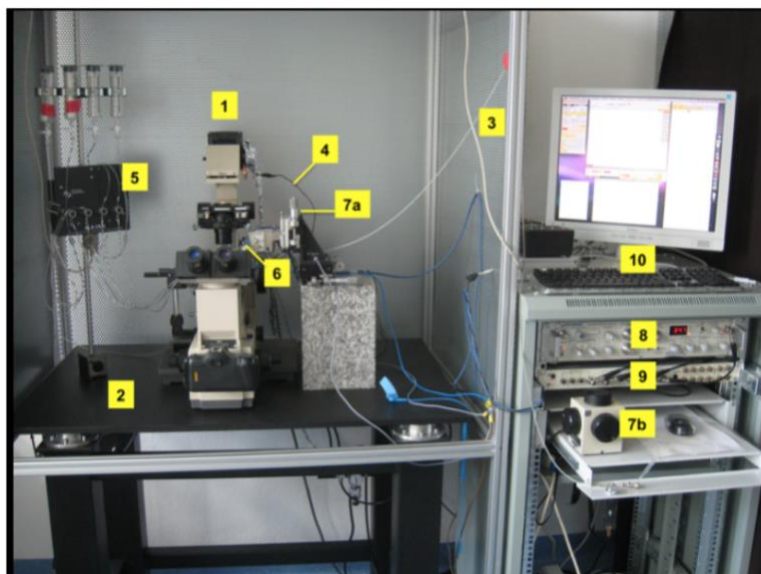
Al fine di misurare la corrente di  $\text{Cl}^-$  indotta da rigonfiamento cellulare ( $\text{ICl}_{\text{swell}}$ ) in cellule SH-SY5Y e nelle cellule HEK 293 Phoenix, è stato scelto il metodo del patch-clamp in modalità voltage-clamp e in configurazione whole-cell (*Fig. 11*).



***Fig. 11 Configurazione whole-cell***

Il set-up utilizzato (*Fig. 12*) era composto da: un microscopio invertito (1) poggiato su un tavolo anti-vibrante di tipo pneumatico (2) inserito in una gabbia di Faraday (3). Tutti i conduttori metallici all'interno della gabbia di Faraday erano opportunamente messi a terra (4). Un rapido cambio della soluzione extracellulare si realizzava sfruttando un sistema di perfusione (5) con una velocità di flusso pari a 5 ml/min ed un bagno con un volume di 500  $\mu\text{l}$  messo a terra con l'ausilio di un elettrodo di riferimento Ag/AgCl. Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato un amplificatore (8) del tipo EPC-10 (HEKA Elektronik, Germania), collegato ad una scheda analogico-digitale del tipo ITC-16 (9) e controllato da un computer Macintosh (10), corredato di programma Patch Master (HEKA Elektronik,

Germania). Tutti i dati sono stati acquisiti con una frequenza di campionamento di 50 kHz e filtrati a 2.9 kHz con un filtro Bessel a 4 poli.



*Fig. 12 Set up per patch clamp*

Le micropipette da patch-clamp sono state ottenute da capillari in vetro borosilicato (World Precision Instruments, #1B150F-3, O.D. = 1.0 mm, I.D. = 0.58 mm) mediante un puller orizzontale (P-97, Sutter Instruments, USA). Se necessario, per facilitare l'ottenimento della configurazione cell-attached, le micropipette potevano subire un trattamento definito "fire polishing", che garantisce la levigatura e la pulizia della punta, che si esegue con una microforgia (Narishige, Japan). La resistenza dei microelettrodi, misurata con le soluzioni indicate di seguito, era compresa tra i 3 e gli 8 M $\Omega$ . Le micropipette da patch-clamp venivano inserite nell'holder (6) collegato all'amplificatore. Il movimento dell'holder e la realizzazione del sigillo erano possibili tramite un micro manipolatore (7a e b) di tipo piezoelettrico (Scientifica, UK). Tutte le registrazioni erano eseguite a temperatura ambiente, 16-24 ore dopo l'ultimo passaggio di tripsinizzazione delle cellule. Le soluzioni di perfusione del bagno (extra-cellulare) e di riempimento della pipetta (intra-cellulare), sono descritte in seguito (vedi tabelle soluzioni).

### ***3.3.1 Protocolli di stimolazione***

Dopo la realizzazione del sigillo in configurazione cell-attached ed il passaggio in configurazione whole-cell, si controllava la stabilità del sigillo e l'assenza di correnti di "leakage" con il protocollo



“I/V” descritto di seguito. Le registrazioni venivano effettuate 1-2 min dopo il passaggio in configurazione whole-cell, in modo da permettere una dialisi adeguata dei contenuti intra-cellulari. L’entità della corrente veniva misurata a tempi prestabiliti (generalmente ogni 5 minuti) mediante il protocollo “I/V”.

- I/V: da un potenziale di holding di 0 mV si impartivano impulsi di potenziale della durata di 500 ms da - 120 a + 100 mV, con incrementi di + 20 mV.

L’attivazione della corrente nel tempo veniva monitorata mediante il protocollo “sweeps a + 40 mV”.

- Sweeps a + 40 mV: da un potenziale di holding di 0 mV si impartiva ogni 20 sec un impulso di potenziale di + 40 mV della durata di 400 ms.

### 3.3.2 Esperimenti di Patch-clamp

Le cellule (SH-SY5Y e HEK 293 Phoenix) destinate alle misure elettrofisiologiche, in condizioni native oppure trasfettate erano selezionate mediante microscopia a fluorescenza (Microscopio invertito, AE31, Motic); per gli esperimenti di patch-clamp le cellule venivano seminate su vetrini copri-oggetto rotondi del diametro di 1 cm contenuti in capsule Petri del diametro di 3 cm.

### 3.3.3 Soluzioni sperimentali

Le soluzioni sono state opportunamente scelte per misurare le correnti di Cl<sup>-</sup> indotte da rigonfiamento cellulare.

Soluzione isotonica extracellulare whole-cell Cl <sup>-</sup>	Soluzione isotonica intracellulare whole-cell Cl <sup>-</sup>	Soluzione ipotonica extracellulare whole-cell Cl <sup>-</sup>
NaCl 125 mM	CsCl <sub>2</sub> 125 mM	NaCl 125 mM
CaCl <sub>2</sub> 2.5 mM	MgCl <sub>2</sub> 5 mM	CaCl <sub>2</sub> 2.5 mM
MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM	EGTA 11 mM	MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM
HEPES 10 mM	ATP 2 mM	HEPES 10 mM
Mannitolo 40 mM	HEPES 10 mM	260 mOsm/KgH <sub>2</sub> O
300 mOsm/KgH <sub>2</sub> O	300 mOsm/KgH <sub>2</sub> O	pH 7.4
pH 7.4	pH 7.2	

### **3.3.4 Analisi statistica**

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati i seguenti programmi:

- Fit Master (HEKA Elektronik, Germania);
- Excel (Microsoft, USA);
- GraphPad (versione 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Nelle analisi veniva considerato il valor medio della corrente (pA) misurato in un intervallo di 7.5 msec, preso 2.5 msec dopo l'inizio dell'impulso; tale valore era inoltre normalizzato per la capacità di membrana (pF) in modo tale da ottenere un valore finale di densità di corrente (pA/pF). Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student t-test per dati non appaiati o, quando possibile, per dati appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$ ; (n) corrisponde al numero di esperimenti indipendenti, ossia al numero di cellule utilizzate.

### **3.4 Manipolazione dei livelli globali di O-GlcNAc**

I livelli globali di O-GlcNAc possono essere modificati sperimentalmente (aumentati o diminuiti) nelle cellule in coltura. Tali livelli possono essere incrementati con uno dei seguenti trattamenti [*Nagy T. et al., 2010*]:

1. Incubazione per 1 ora con 20 mM D-Glucosio;
2. Incubazione per 1 ora con 5 mM Glucosamina;
3. Incubazione per 1 ora con 100  $\mu$ M PUGNAc;
4. Incubazione per 1-3 ore con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina [*Nagy T. et al., 2010*].

E' stata utilizzata la seguente condizione sperimentale: incubazione con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, essendo la più immediata ed efficace condizione per incrementare i livelli cellulari di O-GlcNAc nelle cellule SH-5Y5Y e nelle HEK 293 Phoenix. Le SH-5Y5Y sono state incubate per 2 ore, poiché 1 ora di trattamento non era sufficiente per consentire la modifica O-GlcNAc delle proteine cellulari, come si evince da esperimenti di western-blot. Il sistema HBP richiede la Glutamina, un amminoacido non essenziale abbondante nei tessuti muscolari, per formare la glucosamina-6-fosfato. Tale composto subirà poi ulteriori modifiche e contribuirà alla formazione di UDP-GlcNAc, mentre il PUGNAc è un tipico inibitore farmacologico dell'enzima OGA [*Hattie M. et al., 2016*] (**Fig. 6**). Sono stati utilizzati diversi tempi di incubazione in modo da valutare l'effetto dell'O-GlcNAc modification a breve e a lungo termine.

I livelli cellulari di O-GlcNAc possono però essere incrementati anche in seguito ad over-espressione dell'enzima OGT. D'altra parte, rimozione di L-Glutamina dal terreno di coltura, o over-espressione dell'enzima OGA possono ridurre i livelli di O-GlcNAc cellulari. Tuttavia, tali condizioni sperimentali non sono state esplorate in questo lavoro e saranno oggetto di studi futuri.

### **3.5 Western Blotting**

Per valutare i livelli globali di proteine O-GlcNAc modificate, le cellule SH-SY5Y sono state incubate per 2 ore o per 5 giorni a 37 °C in terreno DMEM/F12 completo, aggiungendo 100 µM PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0,1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio, utilizzati come veicolo. Le cellule HEK 293 Phoenix sono state incubate per 1 ora o per 5 giorni a 37 °C in terreno MEM completo, aggiungendo 100 µM PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0.1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio, utilizzati come veicolo. In alternativa, per valutare i livelli di espressione di ICln e delle forme mutanti prese in considerazione, le cellule HEK 293 Phoenix sono state trasfettate per 24 ore con pIRES2EGFP-hIClnT223A, pIRES2EGFP-hIClnS193X, pIRES2EGFP-hIClnS90X, pIRES2EGFP-hIClnS67A, o pIRES2EGFP-EGFP utilizzato come controllo.

Dopo i relativi trattamenti, le cellule sono state lavate due volte con una soluzione PBS (tampone fosfato salino) a 4 °C e lisate per 10 minuti su ghiaccio in una soluzione contenente: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 (N. 402016 Calbiochem) 0.1% e inibitori delle proteasi (Roche). Successivamente, i detriti cellulari sono stati scartati per centrifugazione a 16.000 xg per 30 minuti a 4 °C mentre il surnatante è stato raccolto. Tipicamente, 10 µg di proteine totali sono stati separati su un gel di sodio dodecil solfato (SDS) al 7.5% di poliacrilammide, elettroblottato poi su una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) (Bio-Rad, Germania), applicando una tensione costante pari a 75 V per 2 ore a 4 °C. Le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente in albumina di siero bovino al 5% (BSA) diluita in soluzione salina tamponata con tris-HCl (TBS: NaCl 150 mM, Tris-HCl 15 mM) contenente 0.1% di Tween 20 (TBST). Successivamente, le membrane sono state incubate over night, in agitazione, con i seguenti anticorpi primari:

- anti-CTD110.6 (O-GlcNAc), anticorpo primario monoclonale, suscitato in topo, IgM (Cell Signaling, 1:1000 o 1:2000, #9875), specifico per proteine O-GlcNAc modificate [*Kneass Z.T. et al., 2004*], diluito in PBS e BSA al 5%;
- anti-CLNS1A (151-164), anticorpo primario policlonale, suscitato in coniglio, IgG, (Sigma, 1:2000, # SAB1104635);

- DYKDDDDK Tag (D6W5B) Anti-FLAG® M2, anticorpo primario, suscitato in coniglio, mAb, (Cell Signalling, 1: 1000, #14793);
- anti- $\beta$ -actina (13E5), anticorpo primario policlonale, suscitato in coniglio, mAb, (Cell Signalling, 1: 1000, #4970) usato come controllo del caricamento.

Gli anticorpi secondari sono stati diluiti in soluzione PBS e BSA al 5%. Il giorno seguente, le membrane sono state lavate tre volte in soluzione TBST e quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari:

- 680 RD Goat anti-Mouse IgM (Li-Cor, USA, IRD-680 RD, 1:10000 # 925-68180);
- 800 CW anti-rabbit IgG (Li-Cor, USA, IRD-800 CW, 1:10000 #92632214).

Il segnale è stato rivelato utilizzando un sistema di Imaging a infrarossi (Odyssey, Li-Cor®, USA).

### ***3.5.1 Analisi densitometrica e statistica***

L'analisi densitometrica delle bande è stata eseguita utilizzando il software ImageJ (1.49v). Il segnale emesso dalle proteine cellulari O-GlcNAc modificate, così come il segnale relativo ai livelli di espressione di ICln e delle forme mutanti prese in considerazione, è stato normalizzato per il segnale della  $\beta$ -actina, utilizzata come proteina house-keeping. Le analisi statistiche sono state elaborate tramite il programma EXCEL (Microsoft, USA), e GraphPad (versione 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica di 3 o più gruppi sperimentali è stata applicata l'ANOVA one-way seguita da post-hoc test di Bonferroni o di Dunnett. Per l'analisi statistica di 2 gruppi sperimentali è stato utilizzato il test del t di Student per dati *non* appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; (n) corrisponde al numero di esperimenti indipendenti.

### ***3.6 Vitalità cellulare determinata con MTS***

Per investigare l'effetto delle variazioni dei livelli globali di O-GlcNAc sulla vitalità cellulare, entrambe le linee cellulari sono state incubate come segue:

- le cellule SH-SY5Y sono state incubate in terreno di coltura DMEM/F12 completo, addizionato di 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0.1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio, per 2 ore o per 5 giorni, a 37°C, con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 100%.

- le cellule HEK 293 Phoenix sono state incubate in terreno di coltura MEM completo, addizionato di 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0.1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio per 1 ora o per 5 giorni, a 37°C, con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 100%;

La procedura del test di vitalità cellulare prevede che in ogni pozzetto siano depositati 10  $\mu$ l di una soluzione di MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, PROMEGA] e che il tutto venga incubato per 1-2 ore a 37° C con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 100%. Il test è un saggio di tipo colorimetrico, utilizzato per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono il MTS a Formazano, facendo così virare il composto da un colore giallo ad un colore marrone. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di Formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 490 nm (Victor X3 multiplate reader, Perkin Elmer).

### ***3.6.1 Analisi statistica***

Il grado di vitalità cellulare e quindi il grado di tossicità del composto testato, è esprimibile con la seguente formula: [OD (490 nm) composto testato / OD (490 nm) controllo negativo]. Le analisi statistiche sono state elaborate tramite il programma Excel (Microsoft, USA), e GraphPad (versione 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student t-test per dati non appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; (n) corrisponde al numero di esperimenti indipendenti.

### ***3.7 Vitalità cellulare determinata con DAPI***

Per investigare l'effetto del trattamento sulla vitalità cellulare, entrambe le linee cellulari sono state incubate come segue:

- le cellule SH-SY5Y sono state incubate in terreno di coltura DMEM/F12 completo, addizionato di 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0.1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio, per 2 ore o per 5 giorni, a 37°C, con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 100%.

- le cellule HEK 293 Phoenix sono state incubate in terreno di coltura MEM completo, addizionato di 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, o 0.1% Dimetilsolfossido (DMSO) + 5 mM Glucosio per 1 ora o per 5 giorni, a 37°C, con un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 100%.

Successivamente le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% e poi trattate per 30' minuti a 37° C, con il colorante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 300 nM). Questo colorante è eccitato dalla luce ultravioletta e forma complessi fluorescenti con il DNA a doppia elica, mostrando una specificità per le basi A-T. Quando il DAPI si lega al DNA, il suo assorbimento massimo è pari a 358 nm e la sua emissione massima è pari a 461 nm. L'intensità di fluorescenza misurata è stata considerata come un indicatore della densità di cellule nel campione (Victor X3 multiplate reader, Perkin Elmer).

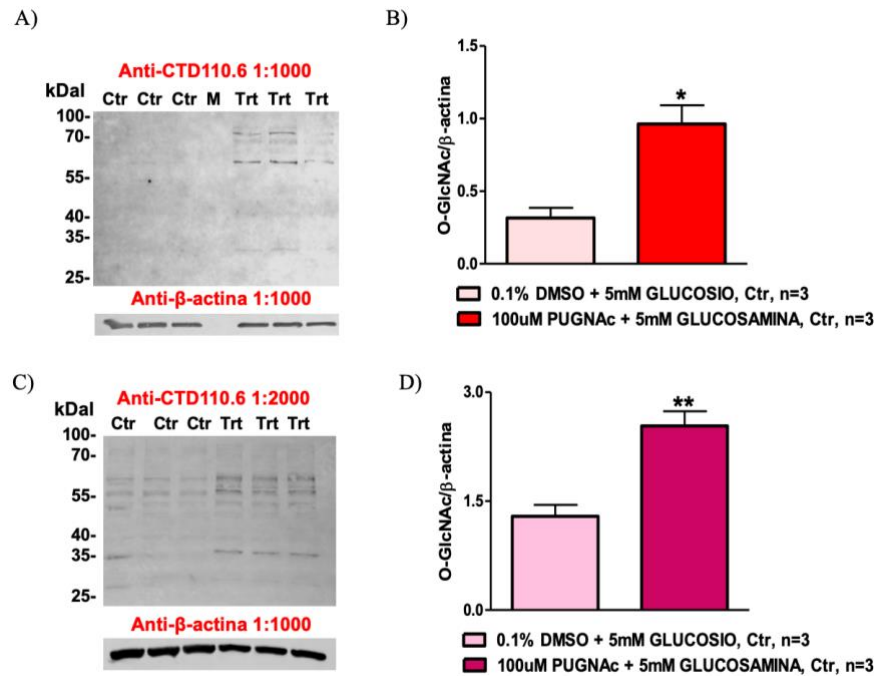
### ***3.7.1 Analisi statistica***

Le analisi statistiche sono state elaborate tramite il programma Excel (Microsoft, USA), e GraphPad (versione 4.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student t-test per dati *non* appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative per  $p < 0.05$  (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; (n) corrisponde al numero di esperimenti indipendenti.

## 4. Risultati

### 4.1 Determinazione dei livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule SH-5Y5Y

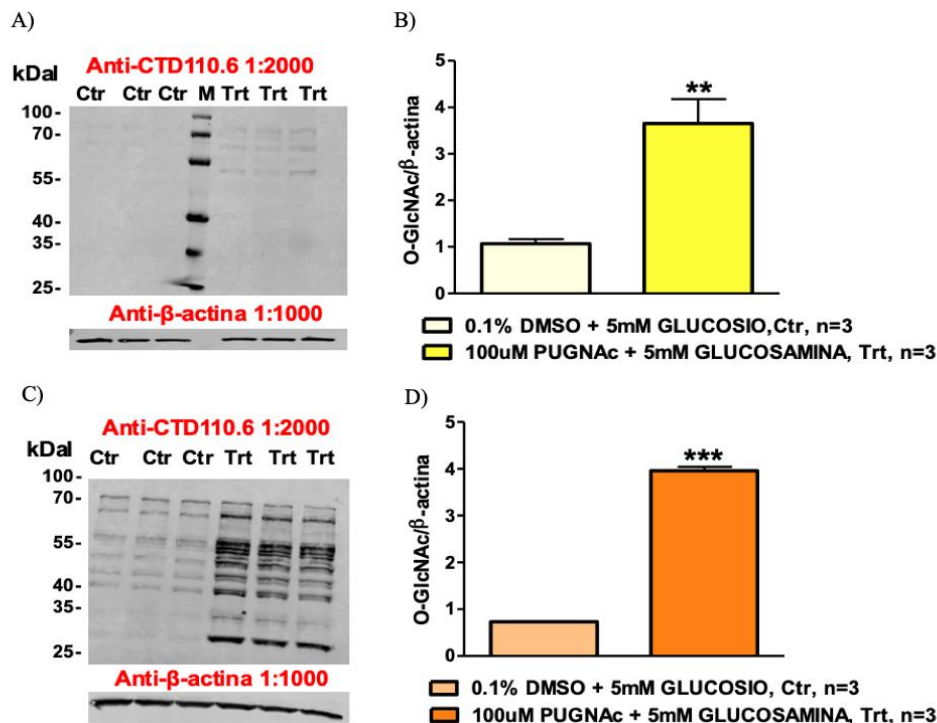
Come mostra la figura 13, i livelli globali di proteine O-GlcNAc modificate sono state valutate tramite western blotting su lisati totali ottenuti da cellule SH-5Y5Y, incubate rispettivamente per 2 ore e 5 giorni con 0.1% DMSO + 5 mM Glucosio (controllo), o con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (trattamento). Le cellule, incubate per 2 ore o per 5 giorni dopo il trattamento, mostrano chiaramente un significativo incremento di proteine O-GlcNAc modificate rispetto alla condizione di controllo (rispettivamente: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).



**Fig. 13 Livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule SH-5Y5Y.** A-B) I livelli di proteine O-GlcNAc modificate sono valutati tramite western blotting con l'anticorpo anti-CTD110.6 (1:1000 o 1:2000). I livelli di espressione derivano da lisati totali ottenuti da cellule SH-SY5Y, incubate rispettivamente per 2 ore e 5 giorni con 0.1% DMSO + 5mM Glucosio (controllo), o con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina (trattamento). C-D) I livelli proteici sono stati quantificati mediante densitometria e normalizzati utilizzando la  $\beta$ -actina. Le cellule, incubate per 2 ore o per 5 giorni con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina, mostrano un significativo incremento di proteine O-GlcNAc modificate rispetto alla condizione di controllo (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di campioni indipendenti.

### 4.1.2 Determinazione dei livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule HEK 293 Phoenix

Come mostra la figura 14, le proteine O-GlcNAc modificate derivano da lisati totali ottenuti da cellule HEK 293 Phoenix incubate rispettivamente per 1 ora e 5 giorni con 0,1% DMSO + 5 mM Glucosio (controllo), o con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (trattamento). Le cellule, incubate per 1 ora o per 5 giorni dopo il trattamento, mostrano chiaramente un significativo incremento di proteine O-GlcNAc modificate rispetto alla condizione di controllo (rispettivamente: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

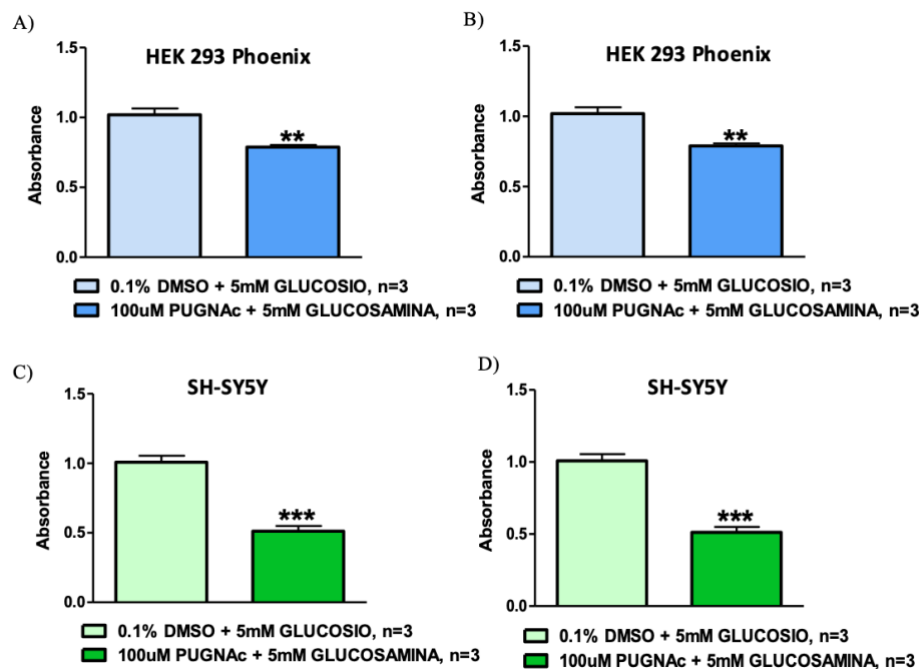


**Fig. 14 Livelli di proteine O-GlcNAc modificate in cellule HEK 293 Phoenix.** A-B) I livelli di proteine O-GlcNAc modificate sono stati valutati tramite western blotting con anticorpo anti-CTD110.6 (1:2000). I livelli di espressione derivano da lisati totali ottenuti da cellule HEK 293 Phoenix incubate rispettivamente per 1 ora e 5 giorni con 0.1% DMSO + 5mM Glucosio (controllo), o con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina (trattamento). C-D) I livelli proteici sono stati quantificati mediante densitometria e normalizzati utilizzando la  $\beta$ -actina. Le cellule, incubate per 1 ora o per 5 giorni con 100 $\mu$ M di PUGNAc + 5mM di Glucosamina, mostrano un significativo incremento di proteine O-GlcNAc modificate rispetto alla condizione di controllo, (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di campioni analizzati in modo indipendente.



## 4.2 Vitalità cellulare tramite MTS in cellule HEK 293 Phoenix e in SH-SY5Y

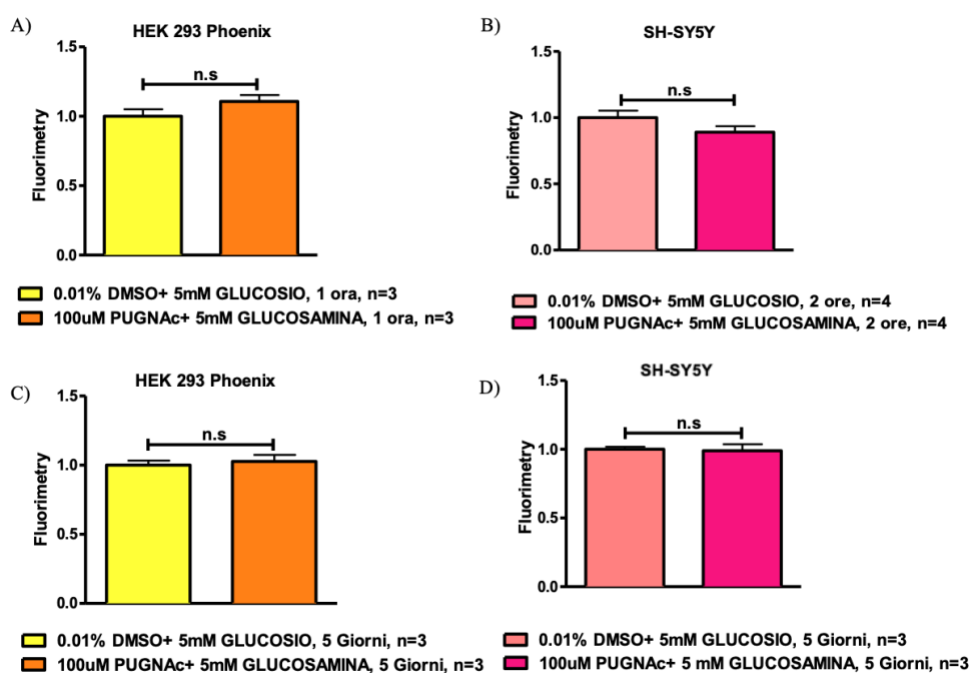
Per valutare il potenziale effetto tossico del trattamento (PUGNAc e Glucosamina), come mostra la figura 15, le cellule sono state incubate rispettivamente per 1 ora (HEK 293 Phoenix), 2 ore (SH-SY5Y) e 5 giorni con con 0,1% DMSO + 5 mM Glucosio (controllo), o con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (trattamento). Entrambe le tipologie cellulari mostrano chiaramente una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare dopo il trattamento con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, (1 ora di incubazione, \*\*  $p < 0.01$ ; 2 ore di incubazione, \*\*\*  $p < 0.001$ ; 5 giorni di incubazione, \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Fig. 15 Vitalità cellulare determinata con metodo MTS in HEK 293 Phoenix e in SH-SY5Y.** Le cellule sono state incubate rispettivamente per A) 1 ora, C) 2 ore e B-D) 5 giorni con 0.1% DMSO + 5mM Glucosio (controllo), o con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina (trattamento). Entrambi i citotipi mostrano una riduzione statisticamente significativa della vitalità dopo trattamento con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina, (HEK 293 Phoenix, 1 ora e 5 giorni di incubazione, \*\*  $p < 0.01$ ; SH-SY5Y, 2 ore e 5 giorni di incubazione, \*\*\*  $p < 0.001$ ). I dati statistici sono stati ottenuti tramite Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di esperimenti indipendenti.

#### 4.2.1 Valutazione della vitalità cellulare tramite colorazione DAPI in cellule HEK 293 Phoenix e in cellule SH-5Y5Y

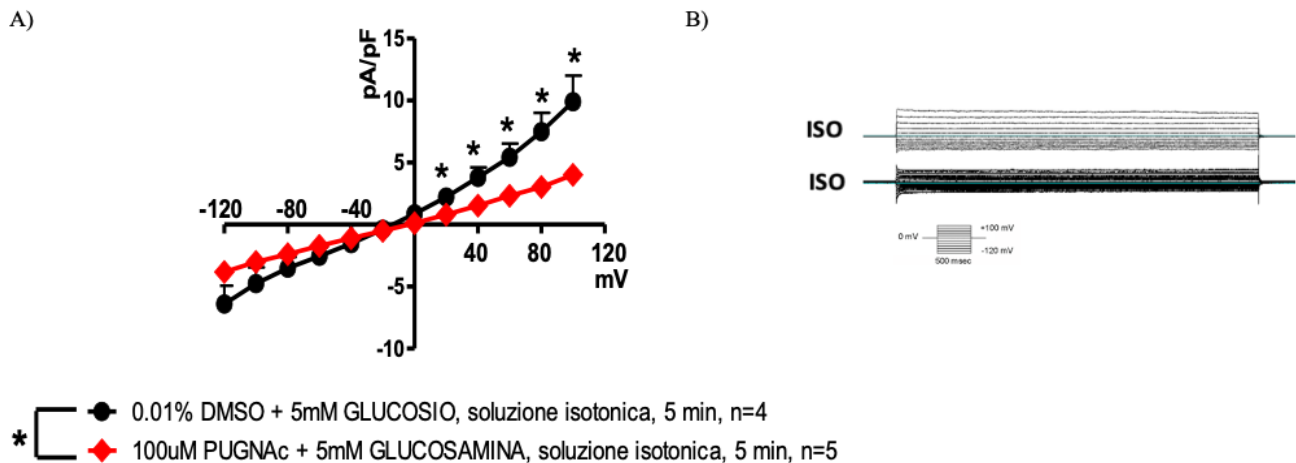
Per poter spiegare il decremento della vitalità cellulare discriminando tra rallentamento metabolico e morte cellulare, sono stati eseguiti ulteriori saggi tramite colorazione DAPI in entrambe le linee cellulari (**Fig. 16**). Per quanto attiene le cellule HEK 293 Phoenix, l'incubazione, rispettivamente, per 1 ora o 5 giorni con 0,1% DMSO + 5 mM Glucosio (controllo), o con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (trattamento) non produce una differenza statisticamente significativa dopo il trattamento con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina rispetto alla condizione di controllo. Allo stesso modo, le cellule SH-5Y5Y non mostrano una differenza statisticamente significativa dopo il trattamento con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina rispetto alla condizione di controllo. Si evince che il trattamento non conduce ad una riduzione del numero di cellule nel campione (morte cellulare), che avrebbe dovuto condurre ad un decremento dell'intensità di fluorescenza del DAPI.



**Fig. 16** Valutazione della morte cellulare tramite colorazione DAPI in HEK 293 Phoenix e in SH-5Y5Y. Le cellule sono state incubate rispettivamente per A) 1 ora, C) 2 ore e B-D) 5 giorni con 0.1% DMSO + 5mM Glucosio (controllo), o con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina (trattamento). Entrambi i citotipi non mostrano una differenza statisticamente significativa (n.s.) dopo trattamento con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5mM Glucosamina. I dati statistici sono stati ottenuti tramite Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di esperimenti indipendenti.

### 4.3 Effetto dell'incremento dei livelli di O-GlcNAc sulla corrente $ICl_{swell}$ in cellule SH-SY5Y

Come mostra la figura 17, il sigillo è stato realizzato in soluzione extracellulare isotonica. In queste condizioni sperimentali è stata misurata e monitorata per 5 minuti la corrente di cloruro ( $ICl_{swell}$  attivata da  $ICln$  endogena in condizioni basali, ossia in assenza di uno stimolo ipotonico) come descritto nella sezione materiali e metodi. La relazione densità di corrente-voltaggio, misurata in condizioni isotoniche, mostra una riduzione statisticamente significativa di  $ICl_{swell}$  dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNAc + 5mM Glucosamina (\* $p < 0.05$ ) (Fig. 17).



**Fig. 17** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule SH-SY5Y dopo incubazione per 2 ore in terreno completo con  $100\mu M$  PUGNAc + 5mM Glucosamina. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNAc + 5mM Glucosamina o 0.1% DMSO + 5mM Glucosio, usato come controllo. A) La relazione densità di corrente-voltaggio, misurata in condizioni isotoniche mostra una riduzione statisticamente significativa di  $ICl_{swell}$  dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNAc + 5mM Glucosamina. B) Registrazioni originali in cellule trattate con il veicolo (0.1% DMSO + 5mM D-Glucosio, in alto a destra) o con  $100\mu M$  PUGNAc + 5mM Glucosamina, in basso a destra, ottenute in soluzioni extracellulari isotoniche. Le cellule sono state stimolate con incrementi di voltaggio di 20mV da -120 a +100mV applicati ad un potenziale di holding pari a 0mV (inserto in basso a destra). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .

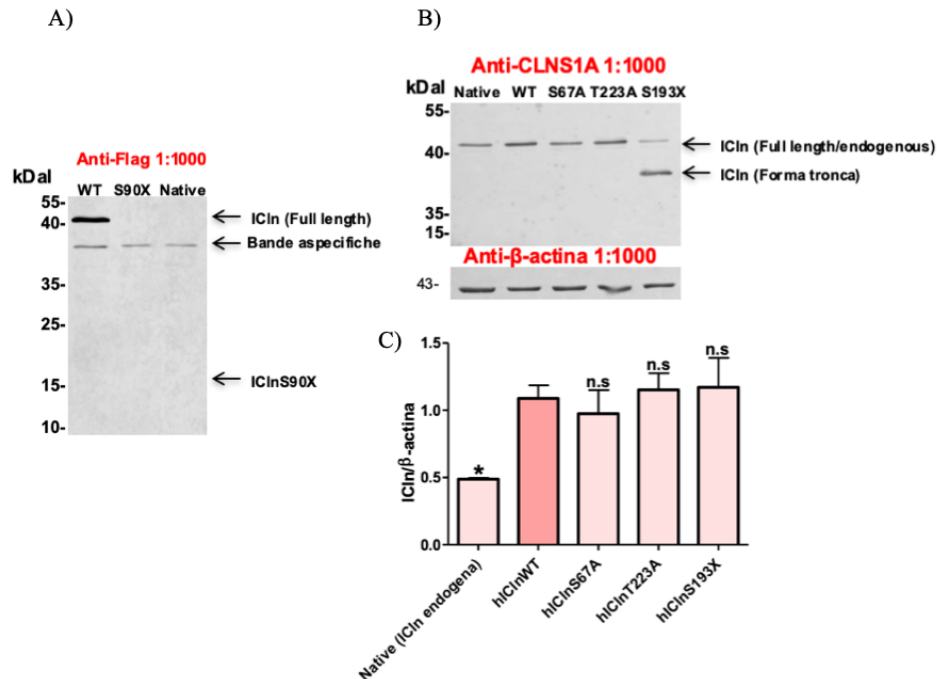
### 4.4 Determinazione dei livelli di espressione di $ICln$ e delle sue forme mutanti in cellule HEK 293 Phoenix

Al fine di studiare l'aspetto elettrofisiologico e quindi il comportamento dell' $ICl_{swell}$  in seguito ad incremento dell'O-GlcNAcylation, per comodità sperimentale e tecnica, le cellule HEK 293 Phoenix

sono state scelte come modello. Prima di verificare le caratteristiche elettrofisiologiche, in accordo con i risultati di spettrometria di massa, sono stati valutati i livelli di espressione proteica di ICln in cellule HEK 293 Phoenix trasfettate con le forme WT e mutanti prese in considerazione (pIRES2EGFP-hIClnWT, pFLAG-hIClnS90X, pIRES2EGFP-hIClnT223A, pIRES2EGFP-hIClnS193X, pIRES2EGFP-hIClnS67A). Tale procedura è stata eseguita per accertare se la linea cellulare, scelta come modello, potesse esprimere o meno la proteina pur avendo subito una mutagenesi sito-specifica in accordo con i risultati di spettrometria di massa e di analisi bioinformatica.

La figura 18 A mostra i livelli proteici valutati tramite western blotting con l'anticorpo anti-Flag. I livelli di espressione proteica derivano rispettivamente da lisati totali ottenuti da cellule HEK 293 Phoenix native (usate come controllo negativo) oppure da cellule trasfettate per 24 ore con: pIRES2EGFP-hIClnWT e pFLAG-hIClnS90X. Come si evince, la proteina hIClnS90X, forma tronca della proteina ICln ottenuta per mutagenesi sulla Serina 90 e priva di tutti i siti di glicosilazione e fosforilazione confermati sperimentalmente da spettrometria di massa e analisi di bioinformatica, non viene espressa in cellule HEK 293 Phoenix. Probabilmente, essendo stata privata di una notevole porzione amminoacidica, viene direttamente riconosciuta dal sistema proteolitico, ubiquitina-dipendente, e degradata a causa di una conformazione errata e non funzionale.

I livelli proteici nella figura 18 B sono stati valutati tramite western blotting con l'anticorpo anti-CLNS1A in cellule HEK 293 Phoenix sia in condizioni native che trasfettate per 24 ore. L' over-espressione di hIClnS67A, hIClnT223A e hIClnS193X non evidenzia una differenza statisticamente significativa rispetto alle cellule trasfettate con IClnWT. Al contrario, i livelli proteici di ICln in cellule native (ICln endogenamente espressa in tali cellule) sono statisticamente inferiori rispetto a quelli delle cellule trasfettate con IClnWT (n=3, \*  $p < 0.05$ ). Si conferma, dunque, che la trasfezione transiente conduce ad overespressione delle forme WT, T223A e 193X.



**Fig. 18 Livelli di espressione proteica di hIClnWT e di alcune forme mutanti in cellule HEK 293 Phoenix.** A) I livelli proteici sono stati valutati tramite western blotting con l'anticorpo anti-Flag (1:1000). I livelli di espressione proteica derivano da lisati totali ottenuti da cellule HEK 293 Phoenix native (usate come controllo) oppure da cellule trasfettate per 24 ore con: pIRES2EGFP-hIClnWT e pFLAG-hIClnS90X. B) Le cellule HEK 293 Phoenix in condizioni native o trasfettate per 24 ore con: pIRES2EGFP-hIClnWT, pIRES2EGFP-hIClnT223A, pIRES2EGFP-hIClnS193X e pIRES2EGFP-hIClnS67A sono state utilizzate come modello, e i livelli proteici sono stati valutati tramite western blotting con l'anticorpo anti-CLNS1A (1:1000). C) I livelli di espressione proteica sono stati quantificati mediante densitometria e normalizzati utilizzando  $\beta$ -actina. I livelli di espressione di hIClnS67A, hIClnT223A e hIClnS193X, non mostrano differenze statisticamente significative rispetto a quelli di hIClnWT, mentre i livelli proteici di hICln in cellule native mostrano un significativo decremento rispetto alle cellule trasfettate con hIClnWT ( $n=3$ ,  $*p<0.05$ ), one-way ANOVA seguita da Dunnet post-hoc test. (n) si riferisce al numero di campioni indipendenti.

#### 4.5 Effetto dell'incremento dei livelli di O-GlcNAc sulla corrente $ICl_{swell}$ in cellule HEK 293 Phoenix

La corrente  $ICl_{swell}$  è stata misurata mediante tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell. Per indurre l'incremento dei livelli di O-GlcNAc, le cellule HEK 293 Phoenix, native o trasfettate per 24 ore sono state incubate per 1 ora a 37° C in terreno completo aggiungendo:

- 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (condizione sperimentale);
- 0.1% DMSO + 5 mM Glucosio (condizione di controllo).

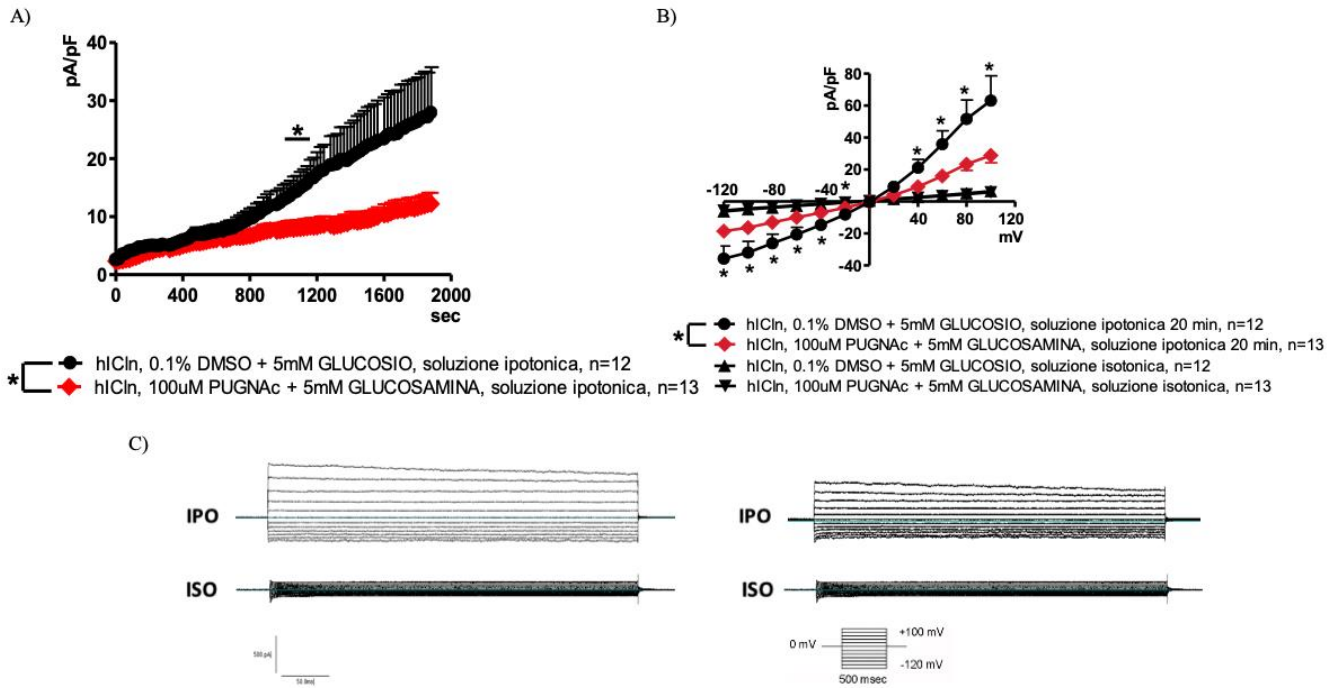
#### ***4.5.1 Incremento dei livelli globali di O-GlcNAc tramite incubazione con 100 $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina in HEK 293 Phoenix***

In ciascuno degli esperimenti illustrati nella figura 19, le cellule, transfettate con ICln WT, sono state incubate per 1 ora in terreno completo con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina. Il rispettivo controllo invece è stato realizzato trattando le cellule con 0,1% DMSO + 5 mM Glucosio. Il sigillo è stato realizzato in soluzione extracellulare isotonica, mentre la corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento (derivante dalla somma della corrente endogena e dalla corrente indotta da ICln WT overespressa) è stata suscitata in seguito all'esposizione delle cellule a una soluzione extracellulare ipotonica e monitorata per circa 20-30 minuti. L'attivazione della corrente  $ICl_{swell}$  è stata stimolata e misurata come descritto nella sezione materiali e metodi. È interessante notare che in condizioni di overespressione della proteina ICln (cellule transfettate con il vettore pIRES2EGFP-hIClnWT), PUGNAc e Glucosamina hanno ridotto significativamente la corrente indotta da ICln (\*  $p < 0.05$ ), suggerendo che l'aumento di O-GlcNAc compromette la funzione di ICln (**Fig. 19**). È importante sottolineare che tale effetto non era osservato nelle cellule native (corrente endogena), incubate per 1 ora in terreno completo con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina (**Fig. 20**). Da ciò si evince che il trattamento induce un incremento della O-GlcNAcylation di ICln eterologa, e non di ICln endogena, la quale, molto probabilmente, è già O-GlcNAc modificata.

Come descritto nell'introduzione, analisi di spettrometria di massa e predizioni bioinformatiche hanno già evidenziato diversi siti di modificazione O-GlcNAc, soprattutto in prossimità del sito C-terminale di ICln, molto probabilmente sulla Treonina 223 (**Fig. 9**). Sulla base di questi dati, diverse forme ricombinanti della proteina ICln sono state espresse in cellule HEK 293 Phoenix e testate funzionalmente. Nello specifico, esperimenti simili ai precedenti sono stati condotti dopo overespressione di IClnT223A (la Treonina 223 è stata modificata in Alanina), una forma che non ha più modo di essere O-GlcNAcificata sul residuo 223. L'overespressione di IClnT223A è stata ottenuta tramite trasfezione con il vettore pIRES2EGFP-hIClnT223A. Innanzitutto, sono stati condotti esperimenti per confermare o meno la possibilità che la mutazione di ICln sull'amminoacido 223 potesse essere in grado o meno di annullare o compromettere la funzione di ICln. I grafici della figura 21 mostrano la relazione tra la densità di corrente e il tempo (a destra) e la densità di corrente e il voltaggio (a sinistra) sia della corrente indotta da ICln endogena (in verde) sia della corrente indotta da ICln WT e T223A in over-espressione (in nero e rosso, rispettivamente) dopo esposizione delle cellule ad una soluzione extracellulare ipotonica.

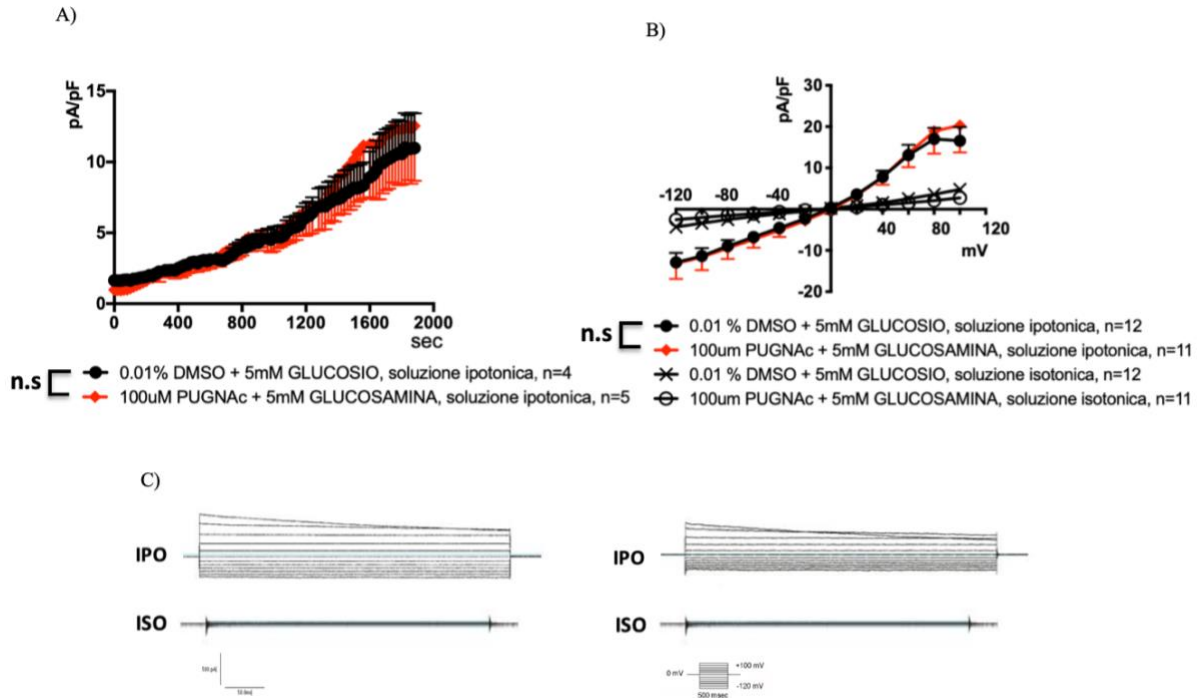
La corrente misurata in seguito ad over-espressione di ICln WT e T223A era superiore alla corrente endogena misurata in cellule di controllo (esprimenti il solo marker di trasfezione, Green Fluorescent Protein) (\*  $p < 0.05$ ). Si conferma quindi la capacità di IClnWT di attivare la corrente  $ICl_{swell}$ , come ampiamente riportato in letteratura. È importante sottolineare che la corrente misurata dopo overespressione di IClnT223A (in rosso) non è ridotta rispetto alla corrente misurata dopo overespressione di IClnWT, evidenziando così la completa funzionalità di IClnT223A. La forma mutante di ICln era dunque in grado di indurre una corrente di cloruro attivata da rigonfiamento cellulare.

Successivamente, abbiamo verificato se la corrente indotta da IClnT223A fosse ancora sensibile o meno all'incremento dei livelli di O-GlcNAc. Nella figura 22, la relazione densità di corrente-tempo (sinistra) e la relazione densità di corrente-voltaggio (destra) mostrano chiaramente che la corrente indotta da IClnT223A nelle cellule trattate con PUGNAc e Glucosamina era significativamente ridotta rispetto a quella misurata in cellule di controllo (DMSO e Glucosio, usati come veicolo) (\*  $p < 0.05$ ), suggerendo quindi che O-GlcNAcylation sull'amminoacido T223 non era responsabile della soppressione della corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento cellulare osservata dopo incremento dei livelli di O-GlcNAc.

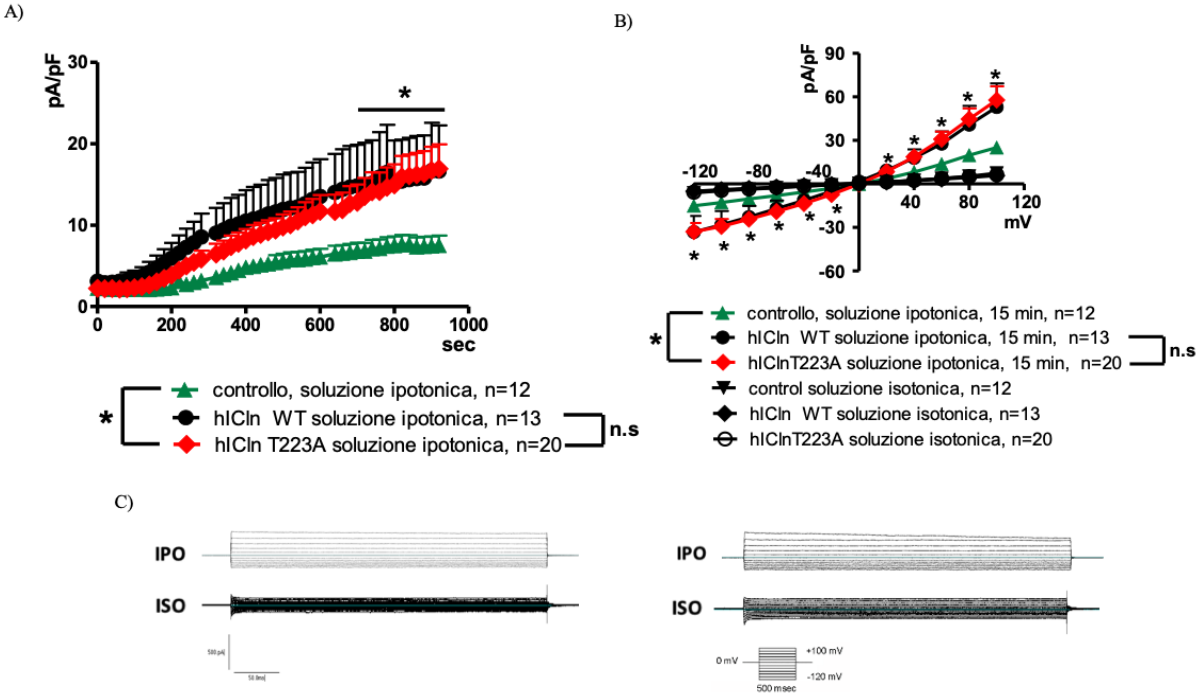


**Fig 19** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnWT e incubazione per 1 ora in terreno completo con  $100\mu M$  PUGNAc +  $5mM$  Glucosamina. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNAc +  $5mM$  Glucosamina o  $0.1\%$  DMSO +  $5mM$  Glucosio, usato come controllo. A) La relazione densità di corrente-tempo e B) la relazione densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, mostrano una riduzione statisticamente significativa di  $ICl_{swell}$  dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNAc +  $5mM$  Glucosamina. C) Registrazioni originali ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche e isotoniche, in cellule trattate con il veicolo ( $0.1\%$  DMSO +  $5mM$  Glucosio,) o con  $100\mu M$  PUGNAc +  $5mM$  Glucosamina. Le cellule sono state stimolate con incrementi di voltaggio di  $20mV$  da  $-120$  a  $+100mV$  applicati da un potenziale di holding pari a  $0mV$  (insetto in basso a destra). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .

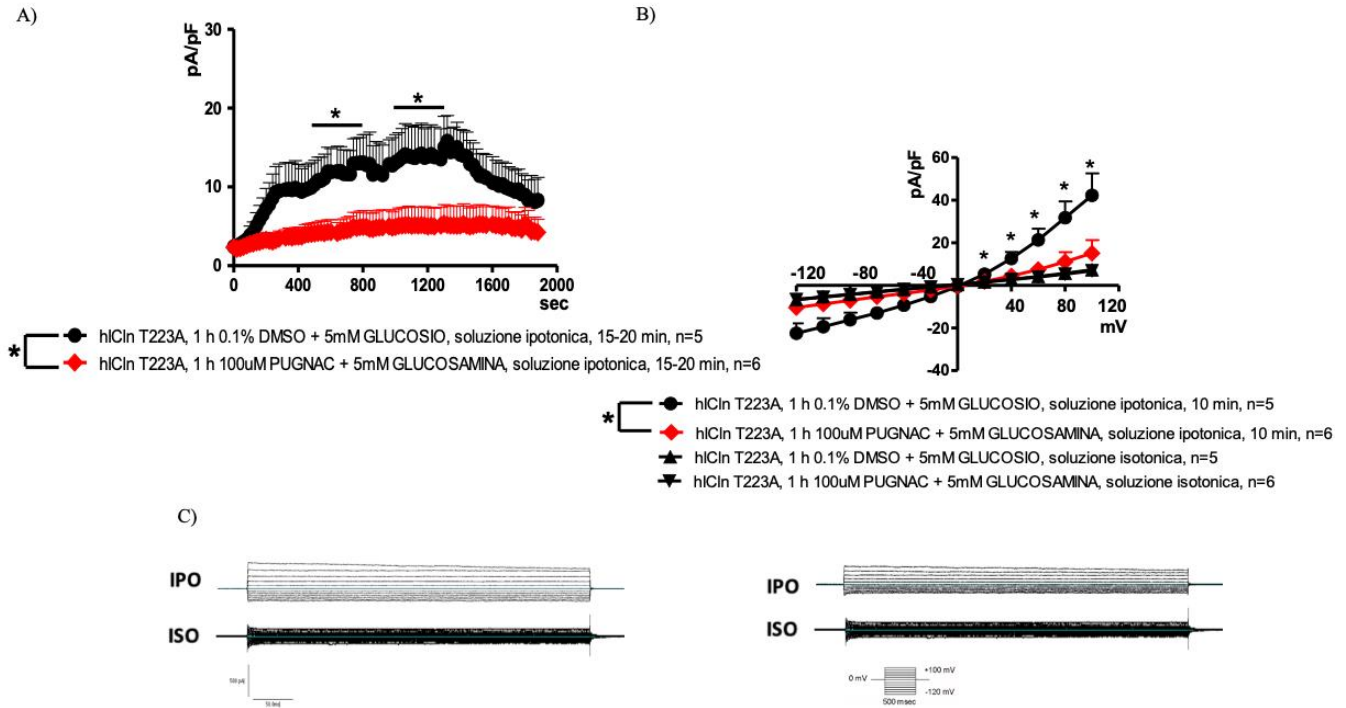




**Fig 20** Misure di  $I_{Cl_{swell}}$  in cellule HEK 293 Phoenix (native), dopo incubazione per 1 ora in terreno completo con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina. La corrente  $I_{Cl_{swell}}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina o  $0.1\%$  DMSO +  $5\text{mM}$  Glucosio, usato come controllo. A) La relazione densità di corrente-tempo e B) la relazione densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, mostrano una riduzione statisticamente significativa di  $I_{Cl_{swell}}$  dopo incubazione con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina. C) RegISTRAZIONI originali ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche e isotoniche, in cellule trattate con il veicolo ( $0.1\%$  DMSO +  $5\text{mM}$  Glucosio,) o con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di  $20\text{mV}$  da  $-120$  a  $+100\text{mV}$  applicati da un potenziale di holding pari a  $0\text{mV}$  (inserto in basso a destra). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $I_{Cl_{swell}}$ .



**Fig. 21 Misure di  $I_{Cl_{swell}}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnT223A.** La corrente  $I_{Cl_{swell}}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell. A) Le relazioni densità di corrente-tempo e B) densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, non mostrano differenze statisticamente significative tra  $I_{Cl_{swell}}$  registrata in cellule transfettate con hIClnT223A rispetto alla corrente registrata in cellule transfettate con hIClnWT. C) Registrazioni originali di cellule transfettate rispettivamente con hIClnWT e con hIClnT223A ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche e isotoniche. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di 20mV da -120 a + 100mV applicati ad un potenziale di holding pari a 0mV (insetto in basso a destra). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $I_{Cl_{swell}}$ .

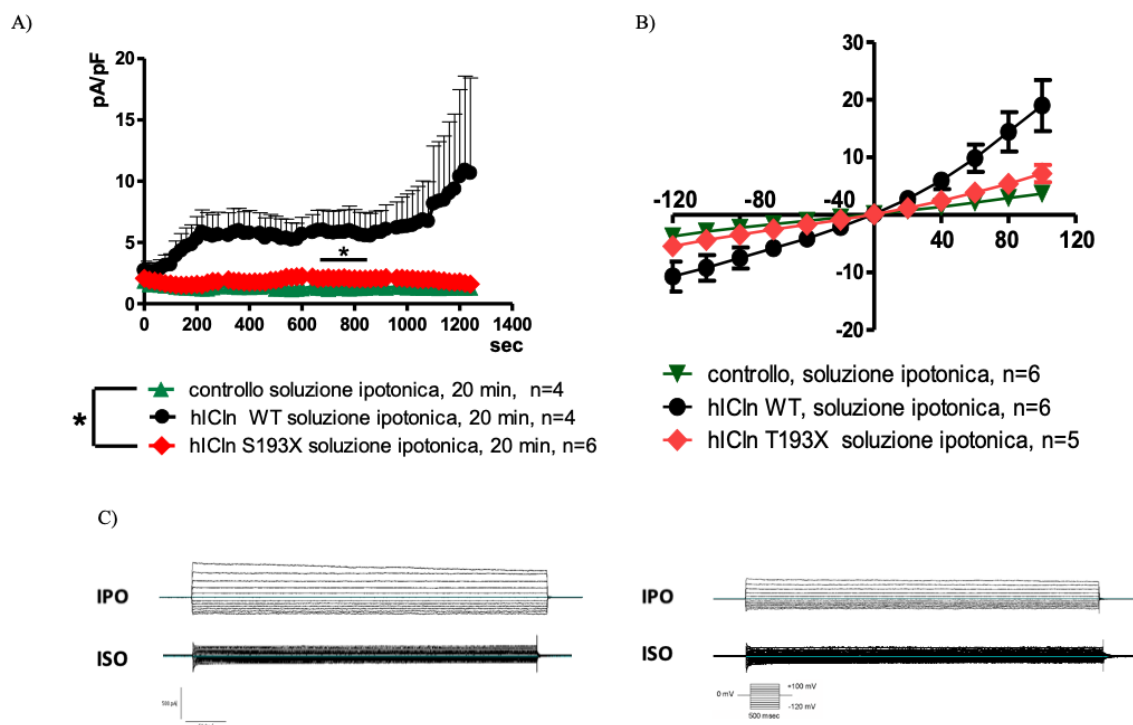


**Fig. 22** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnT223A e incubazione per 1 ora in terreno completo con  $100\mu M$  di PUGNac +  $5mM$  di Glucosamina. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNac +  $5mM$  Glucosamina o  $0.1\%$  DMSO +  $5mM$  Glucosio, usato come controllo. A) Le relazioni densità di corrente-tempo e B) densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, mostrano una riduzione statisticamente significativa di  $ICl_{swell}$  dopo incubazione con  $100\mu M$  PUGNac +  $5mM$  Glucosamina. C-D) RegISTRAZIONI originali di cellule trattate con il veicolo ( $0.1\%$  DMSO +  $5mM$  Glucosio) o con  $100\mu M$  PUGNac +  $5mM$  Glucosamina, ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche o isotoniche. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di  $20mV$  da  $-120$  a  $+100mV$  applicati ad un potenziale di holding pari a  $0mV$  (inserto in basso a destra). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .

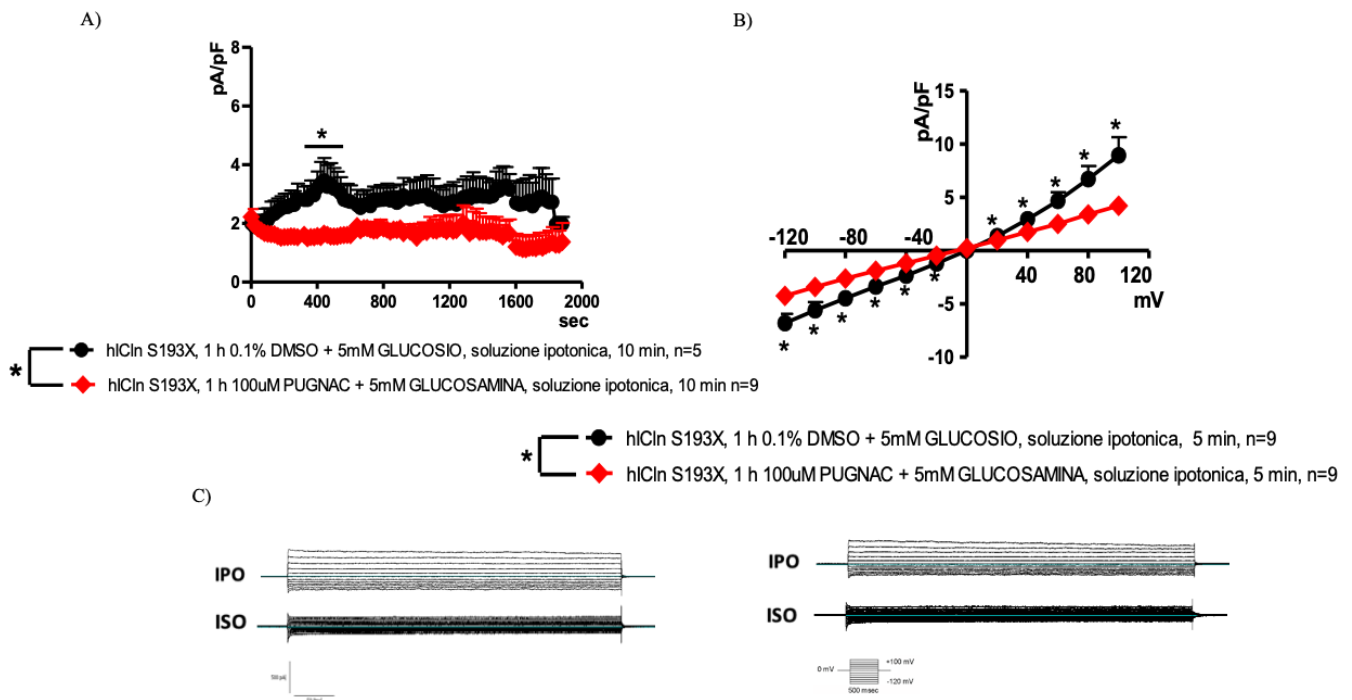
In seguito, la proteina ICln è stata troncata a livello dell'aminoacido 193 (IClnS193X), generando quindi una forma priva del sito del C-terminale. Nella figura 23 sono rappresentate le relazioni tra densità di corrente-tempo e densità di corrente-voltaggio dopo esposizione delle cellule a una soluzione extracellulare ipotonica. Ancora una volta, la corrente  $ICl_{swell}$ , misurata in seguito all'espressione di IClnWT, era superiore alla corrente endogena misurata nelle cellule di controllo. La relazione densità corrente-tempo di IClnS193X, determinata 20 minuti dopo esposizione alla soluzione extracellulare ipotonica, benché fortemente ridotta rispetto a quella di IClnWT, era leggermente - ma significativamente - superiore alla corrente endogena misurata nelle cellule di controllo (sebbene la relazione densità di corrente-voltaggio non mostrasse differenze statisticamente significative rispetto alla corrente endogena). Questi esperimenti mostrano che la proteina IClnS193X ha perso gran parte

della sua funzione, ma nonostante ciò continua a esibire una certa attività, pur essendo priva di una notevole porzione amminoacidica.

Una volta accertata la funzionalità della proteina IClnS193X, ovvero la possibilità di attivare una corrente di cloruro in seguito a rigonfiamento cellulare, le cellule sono state incubate con PUGNAc e Glucosamina per verificare l'effetto dell'O-GlcNAcylation sulla proteina priva del sito C-terminale. Nella figura 24, la relazione densità di corrente-tempo e la relazione densità di corrente-voltaggio mostrano che la corrente indotta da IClnS193X in cellule trattate con PUGNAc e Glucosamina era significativamente ridotta rispetto a quella misurata in cellule di controllo (DMSO e Glucosio, usati come veicolo) (\*  $p < 0.05$ ). Questi esperimenti dimostravano che, sebbene piccola, la corrente indotta da IClnS193X era ancora sensibile all'incremento dei livelli di O-GlcNAc, suggerendo quindi che i siti di modifica O-GlcNAc responsabili della soppressione della corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento osservata dopo incremento dei livelli di O-GlcNAc erano situati a monte rispetto alla Serina 193.



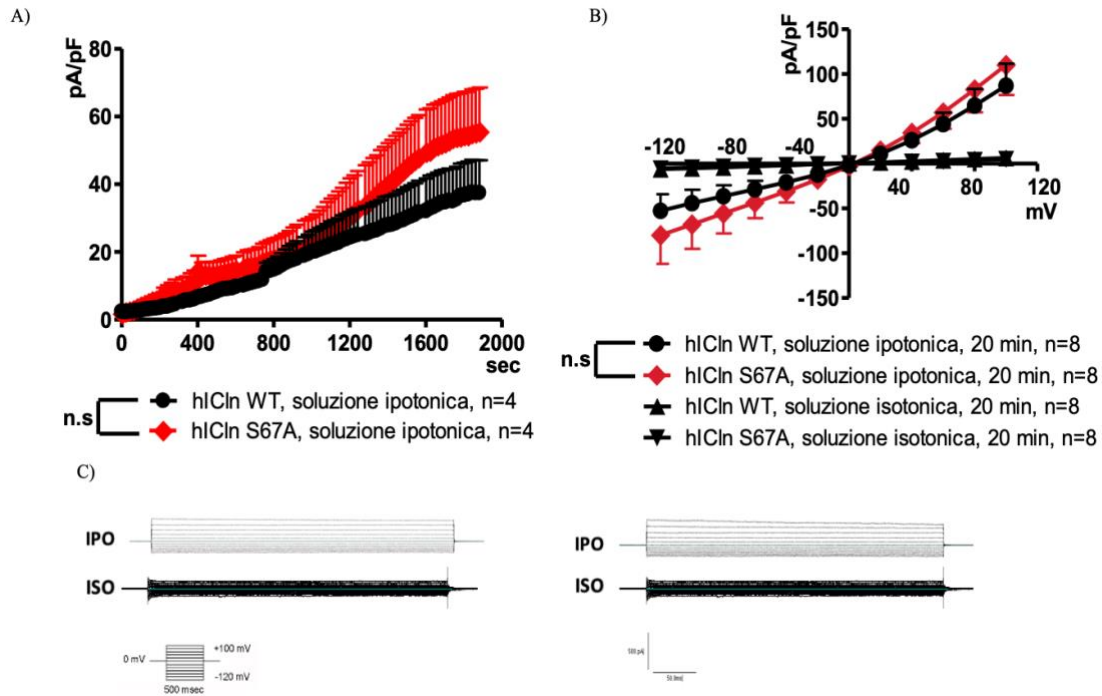
**Fig. 23** Misure di  $I_{Cl_{swell}}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnS193X. La corrente  $I_{Cl_{swell}}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell. A) La relazione densità di corrente-tempo, misurata dopo shock ipotonico, mostra differenze statisticamente significative tra  $I_{Cl_{swell}}$  registrata in cellule trasfettate con hIClnS193X rispetto alla corrente registrata in condizioni di controllo (cellule trasfettate con il marker di fluorescenza EGFP). C) Registrosioni originali da cellule trasfettate rispettivamente con hIClnWT e con hIClnS193X, ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche e isotoniche. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di 20mV da -120 a +100mV applicati ad un potenziale di holding pari a 0mV (in basso a destra). L'analisi statistica è stata fatta mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $I_{Cl_{swell}}$



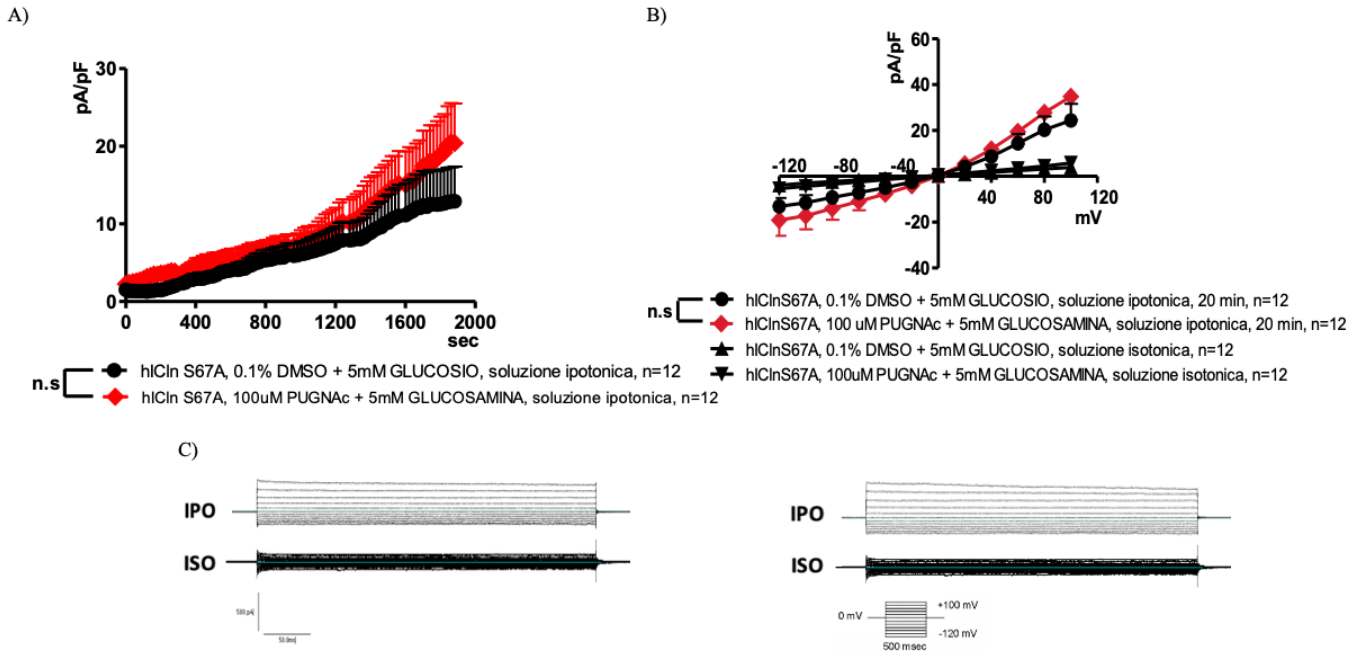
**Fig. 24** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnS193X e incubazione per 1 ora in terreno completo con 100 $\mu\text{M}$  PUGNac + 5mM Glucosamina. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con 100 $\mu\text{M}$  di PUGNac + 5mM di Glucosamina o 0.1% DMSO + 5mM Glucosio, usato come controllo. A) Le relazioni densità di corrente-tempo e B) densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, mostrano una riduzione statisticamente significativa di  $ICl_{swell}$  dopo incubazione con 100 $\mu\text{M}$  PUGNac + 5mM Glucosamina. C) Registrazioni originali di cellule trattate con il veicolo (0.1% DMSO + 5mM Glucosio) o con 100 $\mu\text{M}$  PUGNac + 5mM Glucosamina, ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di 20mV da -120 a +100mV applicati ad un potenziale di holding pari a 0mV (inserto in basso a destra). L'analisi statistica è stata verificata mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .

Esperimenti simili sono stati condotti dopo over-espressione di IClnS67A tramite trasfezione con il vettore pIRES2EGFP-hIClnS67A (la Serina 67 è stata modificata in Alanina) poiché, come accennato, la Serina 67 è un presunto sito Yin O Yang. La corrente misurata nelle cellule trasfettate con IClnS67A non è risultata essere ridotta rispetto alla corrente misurata in cellule trasfettate con hIClnWT, evidenziando così che la proteina IClnS67A era funzionale, ovvero in grado di indurre una corrente di cloruro in seguito ad un cambiamento dell'osmolarità extracellulare (Fig. 25). Inoltre, la relazione densità di corrente-tempo e la rispettiva relazione densità di corrente-voltaggio, determinate 20 minuti dopo l'esposizione delle cellule ad una soluzione extracellulare ipotonica, (Fig. 26) mostrano chiaramente che la corrente  $ICl_{swell}$  nelle cellule trattate con 100  $\mu\text{M}$  PUGNac + 5 mM Glucosamina non era significativamente diversa rispetto a quella misurata nelle cellule di controllo (DMSO e

Glucosio usati come veicolo). Questi risultati indicano che l'effetto inibitorio osservato invece su IClnWT (**Fig. 19**) molto probabilmente derivava dalla glicosilazione di ICln sulla Serina 67.



**Fig. 25** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo over-espressione di hIClnS67A. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell. A) Le relazioni densità di corrente-tempo e B) densità di corrente-vtaggio, misurate dopo shock ipotonico, non mostrano differenze statisticamente significative di  $ICl_{swell}$  registrate in cellule trasfettate con hIClnS67A rispetto alla corrente registrata in cellule trasfettate con hIClnWT. C) Registrazioni originali di cellule trasfettate rispettivamente con hIClnWT, e hIClnS67A, ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche, e in condizioni isotoniche. Le cellule sono state stimolate con incrementi di vtaggio di 20mV da -120 a +100mV applicati ad un potenziale di holding pari a 0mV (in basso a destra). L'analisi statistica è stata fatta mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .



**Fig. 26** Misure di  $ICl_{swell}$  in cellule HEK 293 Phoenix, dopo overespressione di hIClnS67A e incubazione per 1 ora in terreno completo con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina. La corrente  $ICl_{swell}$  è stata monitorata tramite tecnica di patch-clamp in configurazione whole-cell dopo incubazione con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina o  $0.1\%$  DMSO +  $5\text{mM}$  Glucosio, usato come controllo. A) Le relazioni densità di corrente-tempo e B) densità di corrente-voltaggio, misurate dopo shock ipotonico, non mostrano differenze statisticamente significative tra  $ICl_{swell}$  misurata dopo incubazione con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina e dopo incubazione con il veicolo. C) RegISTRAZIONI originali di cellule trattate con il veicolo ( $0.1\%$  DMSO +  $5\text{mM}$  D-Glucosio, o con  $100\mu\text{M}$  PUGNAc +  $5\text{mM}$  Glucosamina, ottenute in soluzioni extracellulari ipotoniche o isotoniche. Le cellule sono state stimulate con incrementi di voltaggio di  $20\text{mV}$  da  $-120$  a  $+100\text{mV}$  applicati ad un potenziale di holding pari a  $0\text{mV}$  (in basso a destra). L'analisi statistica è stata fatta mediante Student t-test per dati non appaiati. (n) si riferisce al numero di cellule utilizzate per misurare la corrente di  $ICl_{swell}$ .

## 5. Discussione

Come già confermato in letteratura, diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che il diabete determina una riduzione della neurogenesi e della neuroplasticità a livello dell'ippocampo, contribuendo al declino cognitivo e ai disturbi dell'umore (ansia e depressione), due complicanze comunemente osservate in pazienti affetti da diabete [*Ho N. et al., 2013*]. Sebbene esistano trattamenti farmacologici utili a contrastare i disturbi legati all'ansia e alla depressione, non è chiaro quanto essi siano efficaci in pazienti affetti da entrambe le condizioni patologiche (diabete e disturbi dell'umore). Inoltre, nonostante sia acclarata la relazione tra diabete e disturbi dell'umore, le attuali ricerche scientifiche non hanno ancora evidenziato i meccanismi che stanno alla base di tale fenomeno [*Black S. et al., 2018*].

Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato diversi fattori di rischio che potrebbero contribuire allo sviluppo del diabete correlato alla condizione di ansia e depressione: fattori come una scorretta educazione alimentare in fase pediatrica, una dieta poco equilibrata, o uno stile di vita sedentario, nel tempo potrebbero determinare l'insorgenza del diabete.

Dalla scoperta del meccanismo di O-GlcNAcylation, più di 4.000 proteine sono state identificate come bersagli di tale fenomeno [*Hart G.W. et al., 2007*]. Esse sono coinvolte nella regolazione di molti eventi cellulari, tra cui la segnalazione intracellulare, la trascrizione genica, o i meccanismi legati nella risposta allo stress [*Butkinaree C. et al., 2010*]. Inoltre, il meccanismo di O-GlcNAcylation, qualora dovesse andare incontro a delle alterazioni, potrebbe contribuire nel tempo allo sviluppo di patologie come cancro, malattie neurodegenerative, diabete e insulino-resistenza [*Stowell S.R. et al., 2015*] [*Lagerlof O. et al., 2014*] [*Peterson S.B. e Hart G.W. 2016*] [*Vaidyanathan K. et al., 2014*]. In particolare, durante una condizione di iperglicemia incontrollata, tipico evento che si manifesta nel diabete scarsamente controllato, il glucosio viene canalizzato attraverso l'HBP pathway e ciò permette l'O-GlcNAcilazione delle proteine attraverso l'enzima GFAT, causando complessi eventi cellulari e molecolari che portano tra l'altro al fenomeno dell'insulino-resistenza [*Buse M.G. 2006*] [*Baron A.D. et al., 1995*]. Quindi, considerando che l'incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc è coinvolto nella patogenesi del diabete e nelle complicanze legate all'insulino-resistenza [*Peterson S.B. e Hart G.W. 2016*], è ipotizzabile che l'O-GlcNAcylation possa contribuire anche allo sviluppo di altre complicanze, compresi i disturbi dell'umore (ansia e depressione).

Come già confermato in letteratura, esperimenti di spettrometria di massa e analisi bioinformatiche hanno confermato che ICln è una proteina O-GlcNAcilata [*Hahne H.S.N. et al., 2013*]. Inoltre è una delle componenti molecolari che prende parte nell'attivazione della corrente  $ICl_{swell}$  mediata dai canali



VRAC, nonostante l'entità molecolare del canale sia la proteina LRRC8A [Qui Z. et al., 2014] [Voss F.K. et al., 2014], essenziale sia nella regolazione del volume cellulare, ma di fondamentale importanza anche per il meccanismo di proliferazione cellulare [Wong R. et al., 2018].

Sebbene il meccanismo di RVD sia gravemente compromesso nelle piastrine di pazienti diabetici [Margalit A. et al., 1995], i livelli cellulari di O-GlcNAc non sono stati mai misurati in queste cellule, e quindi il potenziale collegamento tra l'incremento dei livelli di O-GlcNAc e la compromissione dell'RVD non sono stati di conseguenza valutati. Inoltre, in cellule derivanti da modelli murini diabetici è stato osservato sia un decremento della magnitudo della corrente  $ICl_{swell}$  che un'alterazione dell'RVD [Inoue H et al., 2010] [Yamamoto S. et al., 2009]. Anche in questo caso però non sono stati investigati né i livelli cellulari di O-GlcNAc, né il possibile legame tra aumento dei livelli di O-GlcNAc e decremento della corrente  $ICl_{swell}$ . Solo recentemente è stato dimostrato che l'incremento dei livelli di O-GlcNAc è direttamente coinvolto nelle alterazioni del meccanismo omeostatico della regolazione del volume cellulare [Nagy T. et al., 2010]. Nagy e collaboratori hanno dimostrato che l'incremento globale di O-GlcNAc alterava la regolazione del volume nelle cellule di Jurkat in seguito ad uno stimolo ipotonico. In particolare, si era ipotizzato che l'O-GlcNAcylation delle proteine cellulari avesse influenzato il movimento dell'acqua favorendo il rigonfiamento cellulare in seguito all'esposizione delle cellule ad una soluzione ipotonica [Nagy T. et al., 2010]. Tuttavia, il preciso meccanismo molecolare alla base di tale fenomeno è tuttora sconosciuto.

Sulla base di tali considerazioni e sull'evidenza che (i) il diabete è associato a incrementi dell'O-GlcNAcylation, (ii) i disturbi dell'umore, in particolar modo la depressione, sono associati a compromissione della neurogenesi; e che (iii) i canali VRAC possono controllare la neurogenesi [Wong R. et al., 2018], l'ipotesi avanzata col presente lavoro sperimentale è quella di verificare se l'incremento dei livelli di O-GlcNAc possa compromettere i processi di neurogenesi attraverso l'inibizione dei canali VRAC, e quindi condurre a disturbi dell'umore nel paziente diabetico. A tal fine pertanto, l'attenzione è stata posta sul possibile ruolo della proteina ICln, proteina O-GlcNAc modificata e coinvolta nell'attivazione dei VRAC, in modo tale da definire il possibile collegamento tra l'elevata O-GlcNAcylation e le alterazioni della corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento attraverso i canali VRAC. Basandosi su osservazioni che la corrente  $ICl_{swell}$  risulta compromessa negli adipociti e nei miociti ventricolari di topi diabetici [Inoue H. et al., 2010] [Yamamoto S. et al., 2009], si è deciso di verificare se l'inibizione dell' $ICl_{swell}$  dopo incremento dei livelli di O-GlcNAc fosse dovuta o meno alla O-GlcNAcylation di ICln. In particolare, è stato indagato il sito amminoacidico

coinvolto in tale modulazione. A tal fine, la magnitudo di  $ICl_{swell}$  e la cinetica di attivazione sono state monitorate sia in cellule SH-S5Y5 che in cellule HEK 293 Phoenix.

Una prima parte sperimentale è stata condotta su cellule SH-S5Y5, dimostrando che 2 ore di incubazione con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina determinano un incremento dei livelli di O-GlcNAc cellulari (**Fig. 13**) e allo stesso tempo un decremento della vitalità cellulare (**Fig. 15**). Tale trattamento ha influenzato in modo significativo la corrente  $ICl_{swell}$  (**Fig. 17**). Questi dati dimostrano che in cellule neuronali  $ICl_{swell}$  è basalmente attiva (in assenza di shock ipotonico), è ridotta da elevati livelli di O-GlcNAc, e una sua compromissione si associa a rallentamento delle funzioni metaboliche della cellula.

La seconda parte sperimentale invece è stata condotta principalmente sulle cellule HEK 293 Phoenix. Trattandosi di una linea cellulare con alcune caratteristiche neuronali [**Costa R. et al., 2018**], sono state scelte in quanto rappresentano un modello facilmente adattabile alla tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell. Abbiamo dimostrato che l'incremento dei livelli di O-GlcNAc tramite incubazione per 1 ora con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina ha influenzato in modo significativo sia la vitalità cellulare (**Fig. 15**) che la corrente  $ICl_{swell}$  (**Fig. 19**). Nelle cellule trasfettate con ICl<sub>n</sub>WT, la corrente registrata rappresentava la somma dell' $ICl_{swell}$  endogena e della corrente indotta da ICl<sub>n</sub> overespressa. A seguito dell'overespressione di ICl<sub>n</sub> e dell'esposizione per 1 ora a 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina, la corrente indotta da ICl<sub>n</sub> ha subito una significativa riduzione della magnitudo (**Fig. 19**), indicando quindi che le modifiche O-GlcNAc possono compromettere la funzione di ICl<sub>n</sub>. Al contrario, tale trattamento (PUGNAc e Glucosamina) non influenzava la corrente  $ICl_{swell}$  endogena, registrata in cellule HEK 293 Phoenix native (**Fig. 20**). Per identificare i siti di modificazione O-GlcNAc, sono state effettuate sia un'analisi bioinformatica della sequenza amminoacidica di ICl<sub>n</sub> che saggi sperimentali di spettrometria di massa [<http://www.cbs.dtu.dk>] (**Fig. 9**). Sulla base di tali risultati, e considerando che gli incrementi di O-GlcNAc riducono la magnitudo della corrente  $ICl_{swell}$ , sono state prodotte diverse forme non glicosilabili di ICl<sub>n</sub> per capire quale sito amminoacidico potesse modulare o meno la corrente  $ICl_{swell}$  dopo incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc.

La magnitudo di  $ICl_{swell}$  e la cinetica di attivazione sono state monitorate in cellule HEK 293 Phoenix dopo overespressione delle forme mutanti: hICl<sub>n</sub>T223A, hICl<sub>n</sub>S193X, hICl<sub>n</sub>S67A. È interessante notare che la significativa diminuzione della corrente indotta da ICl<sub>n</sub>WT osservata dopo aumento di O-GlcNAc con 100  $\mu$ M PUGNAc + 5 mM Glucosamina è stata osservata anche dopo overespressione con hICl<sub>n</sub>T223A e hICl<sub>n</sub>S193X (**Fig. 22-24**), suggerendo che il sito amminoacidico 223 e tutti quelli a

valle del 193 non sono coinvolti nella soppressione della funzione di ICln dopo aumento dei livelli cellulari di O-GlcNAc. L'analisi bioinformatica della sequenza amminoacidica di ICln ha però rivelato la presenza di un sito Yin O Yang sulla Serina 67 (**Fig. 9**). Sulla base di questa previsione, è stata prodotta una forma non glicosilabile di ICln, in cui la Serina 67 è stata mutata in Alanina (IClnS67A). Come detto, la magnitudo di ICln<sub>swell</sub> e la cinetica di attivazione sono state monitorate in cellule HEK 293 Phoenix dopo overespressione di IClnS67A. È interessante notare che la significativa diminuzione della corrente indotta da ICln osservata dopo aumento di O-GlcNAc con 100 μM PUGNAc + 5 mM Glucosamina non è stata più osservata dopo overespressione di IClnS67A (**Fig. 26**), suggerendo che la Serina 67 potrebbe essere criticamente coinvolta nella soppressione della funzione ICln dopo incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc. È importante ricordare che IClnS67A conserva la sua funzione, cioè significa che può portare ad un up-regulation di ICln<sub>swell</sub> quando overespressa nelle cellule, tuttavia, non è più sensibile all'incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc.

I risultati funzionali ottenuti dimostrano che l'attività di ICln è controllata direttamente dall'incremento dei livelli di O-GlcNAc, probabilmente dalla modifica che subisce la Serina in posizione 67. Quindi tale sito potrebbe rappresentare un possibile bersaglio dell'O-GlcNAcylation. Inoltre, poiché è ampiamente documentato che ICln interagisce con molte proteine cellulari ed è coinvolta in diversi processi fisiologici [*Furst J. et al., 2006*], Dossena e collaboratori hanno investigato il possibile ruolo della modifica O-GlcNAc sulle interazioni di ICln con altri partner molecolari [*Schedlbauer A. et al., 2019*]. In particolare, sapendo che l'interazione di ICln con la catena α delle integrine è essenziale per l'attivazione di ICln<sub>swell</sub> e data la stretta vicinanza della Ser67 con il sito di legame di ICln alla catena α delle integrine, è stato valutato se l'O-GlcNAcylation potesse modificare o meno tale interazione. Esperimenti preliminari di FRET tuttora in corso mostrano che entrambe le isoforme di ICln (WT e S67A) stabiliscono un'interazione molecolare diretta con la catena α dell'integrina e che, nel caso di IClnWT, questa interazione è destabilizzata dopo incremento dei livelli intracellulari di O-GlcNAc. Ancora più interessante è il fatto che l'interazione tra IClnS67A e la catena α dell'integrina non è più modulata dopo incremento dei livelli globali di O-GlcNAc. Pertanto, è possibile affermare che l'O-GlcNAcylation di ICln a livello della Ser67 disturba l'interazione con la catena α dell'integrina.

Come già accennato in precedenza, l'O-GlcNAcylation è coinvolta nello sviluppo di molti stati patologici [*Peterson S.B. e Hart G.W. 2016*][*Hart G.W.S.C et al., 2011*], e il suo ruolo nello sviluppo delle complicanze croniche del diabete mellito e dell'insulino-resistenza è ormai ben consolidato [*Peterson S.B. e Hart G.W. 2016*] [*Vaidyanathan K. et al., 2014*]. Tra le complicanze croniche del diabete mellito, la trombogenicità [*Margalit A. et al., 1995*], la nefropatia [*Sun Y.M. et al., 2013*], la

cardiomiopatia [Ngoh G.A. et al., 2010], l'inibizione della neurogenesi a livello ippocampale o addirittura la maggiore eccitabilità neuronale [Ho N. et al., 2013] potrebbero essere correlate alla compromissione delle funzioni di ICIn e di conseguenza all'inibizione della corrente  $IC_{I_{swell}}$ .

La trombogenicità è uno stato patologico derivante da anomalie nel meccanismo della coagulazione, rappresenta una complicanza comune del diabete mellito e può portare a lesioni cerebrali e coronariche [Ceriello A 1993]. È interessante notare che il meccanismo di RVD è ridotto nelle piastrine di pazienti affetti da cardiopatia ischemica, infarto del miocardio, diabete mellito e ipertensione [Margalit A. et al., 1995]. Questi risultati indicano che una compromissione dell'RVD a livello delle piastrine potrebbe causare anomalie nella reazione antitrombotica, aumentando così la probabilità di un evento trombotico.

La nefropatia diabetica è una patologia caratterizzata da danno renale e può causare insufficienza renale [Gueutin V. et al., 2012]. I reni sono fondamentali per il mantenimento della pressione sanguigna e dell'equilibrio elettrolitico dell'intero organismo e sono spesso soggetti a stress osmotico durante la diuresi e l'anti-diuresi [Arora M.K. et al., 2013]. Gli eventi cellulari e molecolari che portano alla nefropatia diabetica sono complessi e solo parzialmente compresi. Sebbene la fibrosi renale, l'espansione mesangiale, l'ipertrofia glomerulare, l'infiammazione e lo stress ossidativo sembrano essere i principali eventi che portano alla nefropatia diabetica [Arora M.K. et al., 2013], è possibile che se il meccanismo di RVD dovesse essere compromesso, tale alterazione potrebbe provocare necrosi delle cellule renali [Okada Y. et al., 2001], con conseguente sviluppo di insufficienza renale.

La cardiomiopatia diabetica è una delle complicanze diabetiche più comuni, principalmente causata dall'instabilità delle proprietà elettriche del cuore [Boudina S. et al., 2010], che può portare a insufficienza cardiaca [Dhingra R. e Vasan R.S. 2012]. E' noto che  $IC_{I_{swell}}$  è basalmente espressa e gioca un duplice ruolo nel cuore: (i) depolarizzazione del potenziale di membrana a riposo e (ii) abbreviazione della durata del potenziale d'azione (APD) durante la depolarizzazione dei miociti ventricolari. Questa corrente è anche attivata cronicamente in condizioni isoosmotiche e in alcune condizioni patologiche come ischemia e insufficienza cardiaca. Nell'insufficienza cardiaca, dove l'APD è prolungato, l'attivazione persistente di  $IC_{I_{swell}}$  limita il prolungamento dell'APD determinando un effetto benefico. Di conseguenza, l'inibizione di  $IC_{I_{swell}}$  potrebbe invece favorire il prolungamento dell'APD, determinando tachiaritmie, anomalie nella ripolarizzazione e morte improvvisa [Duan D. 2009] [Baumgarten C.M. et al., 2005] [Vandenberg J.I. et al., 1997].

Infine, la relazione tra diabete e depressione è sottesa dalla reciprocità: la depressione inficia l'aderenza alle cure e predispone alle complicanze, mentre il diabete, specie se presenta difficoltà di controllo,

costituisce un fattore di rischio della depressione. Diversi sono i dati presenti in letteratura che confermano il legame tra le due condizioni patologiche, ma nonostante ciò il meccanismo molecolare che determina il decremento della neurogenesi a livello ippocampale non è del tutto noto. Proponiamo che un'inibizione dei canali del cloruro VRAC dovuta a O-Glicosilazione del loro attivatore ICl<sub>n</sub> a livello della Serina 67 possa contribuire a compromissione della neurogenesi nell'individuo diabetico, portando a disturbi dell'umore.

Nonostante i risultati ottenuti possano contribuire a spiegare tale fenomeno, ulteriori studi saranno necessari per investigare il comportamento della corrente ICl<sub>swell</sub> mediata dai canali VRAC dopo esposizione delle cellule ad un trattamento a lungo termine con PUGNAc e Glucosamina. Inoltre, ulteriori studi saranno indispensabili per poter rispondere alla seconda ipotesi proposta nell'elaborato scientifico, ovvero se l'iperglicemia incontrollata potrebbe portare o meno ad un aumento dell'eccitabilità neuronale attraverso l'inibizione dell'attività dei VRAC, partendo dal presupposto che anche l'ansia è vista nel contesto di diverse condizioni patologiche caratterizzate da iperglicemia e che i canali VRAC potrebbero essere coinvolti nella regolazione dell'eccitabilità neuronale.

## 6. Conclusioni

Quando le cellule vengono esposte a PUGNAc e Glucosamina per 1, 2 ore o 5 giorni si assiste ad un incremento dei livelli globali di O-GlcNAc. Inoltre, questo trattamento determina un decremento della vitalità cellulare, che non si traduce in fenomeni di morte cellulare, ma sembrerebbe legata ad un decremento del metabolismo cellulare. L'esposizione al trattamento a breve termine induce nelle cellule SH-SY5Y una riduzione statisticamente significativa della corrente  $ICl_{swell}$ . Inoltre, lo stesso trattamento induce nelle cellule HEK 293 Phoenix, sottoposte ad overespressione della proteina ICl<sub>n</sub>, una riduzione statisticamente significativa della corrente indotta da ICl<sub>n</sub> tramite i canali VRAC dopo esposizione ad una condizione di ipotonia, indicando che le modifiche dovute all'incremento dei livelli cellulari di O-GlcNAc possono alterare la funzione della proteina ICl<sub>n</sub>.

In conclusione:

1. la corrente indotta da ICl<sub>n</sub>T223A è simile alla corrente indotta da ICl<sub>n</sub>WT ed è similmente soppressa dopo incremento di O-GlcNAc; concludiamo che la Treonina 223 non è coinvolta nella soppressione della funzione di ICl<sub>n</sub> dopo la modifica O-GlcNAc;
2. ICl<sub>n</sub>S193X perde gran parte della sua attività, sebbene la corrente residua sia ancora sensibile agli incrementi di O-GlcNAc; concludiamo che i siti di modifica O-GlcNAc responsabili della soppressione della corrente indotta da ICl<sub>n</sub> devono trovarsi a monte rispetto alla Serina 193, ciò indica che il sito C-terminale non sembra coinvolto in tale meccanismo;
3. Invece, la corrente indotta da ICl<sub>n</sub>S67A è simile alla corrente indotta da ICl<sub>n</sub>WT, ma insensibile agli incrementi di O-GlcNAc. La Serina 67 potrebbe essere un buon candidato per la O-GlcNAc silenziosa.

Alla luce dei risultati ottenuti e delle evidenze suggerite dalla letteratura, i dati mostrano un collegamento tra diabete, O-GlcNAcylation, canali VRAC, corrente  $ICl_{swell}$  e proteina ICl<sub>n</sub>. Infatti i risultati sottolineano che gli incrementi dei livelli cellulari di O-GlcNAc modulano la corrente di cloruro attivata dal rigonfiamento cellulare attraverso i canali VRAC. È probabile che le modifiche indotte da O-GlcNAc sulla proteina ICl<sub>n</sub> possano giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi delle complicanze diabetiche, in modo particolare possano contribuire a compromettere il meccanismo della neurogenesi a livello ipocampale.

Quindi, la proteina ICl<sub>n</sub>, attivatore dei canali VRAC, potrebbe rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico nella prevenzione o nel trattamento di stati patologici caratterizzati da proteine

cronicamente O-GlcNAsylate, compresi i disturbi dell'umore legati al diabete e all'iperglicemia incontrollata o scarsamente controllata.

## 7. Bibliografia

- Ackerman MJ., Krapivinsky GB., Gordon E., Krapivinsky L., Clapham DC. Characterization of a native swelling-induced chloride current,  $ICl_{swell}$ , and its regulatory protein, pICln, in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Physiol*, 1994;44 Suppl 2:S17-24.
- Ackerman MJ., Wickman KD., Clapham DE. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*, 1994;103(2):153-79.
- Akita T., Okada Y. Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience*, 2014;275:211-31.
- Aquino-Gil M., Pierce A., Perez-Cervera Y., Zenteno E., Lefebvre T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem Soc Trans*, 2017;45(2):365-70.
- Arora MK., Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul Pharmacol*, 2013;58(4):259-71.
- Baron AD., Zhu JS., Zhu JH., Weldon H., Maianu L., Garvey WT. Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2792-801.
- Baumgarten CM., Browe DM. Swelling and Stretch-activated Chloride Channels in the Heart: Regulation and Function: Academia Publishing House, 2005.
- Benjamin Lauziera FV., Clemence M., RG., Bertrand, Boucharda M-ER., Labartheb F., Vern Dolinskyc JD., Allena JCC., and Des Rosiersa C. Metabolic effects of glutamine on the heart. Anaplerosis versus the hexosamine biosynthetic pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2013;55:92-100.
- Black S., Shah A., Simpson G., Scogin F., Smith A. Diabetes, depression, and cognition: a recursive cycle of cognitive dysfunction and glycemic dysregulation. *Curr Diab Rep*, 2018;18(11):118.
- Bond MR., Hanover JA. A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol*, 2015;208(7):869-80.
- Bond T., Basavappa S., Christensen M., Strange K. ATP dependence of the  $ICl_{swell}$  channel varies with rate of cell swelling. Evidence for two modes of channel activation. *J Gen Physiol*, 1999;113(3):441-56.
- Boudina S., Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord*, 2010;11(1):31-9.
- Bromet E., Andrade LH., Hwang I., Sampson NA., Alonso J., De Girolamo G., De Graaf R., Demyttenaere K., Hu C., Iwata N., Karam AN., Kaur J., Kostyuchenko S., Lépine JP., Levinson D., Matschinger H., Mora ME., Browne MO., Posada-Villa J., Viana MC., Williams DR., Kessler RC. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Med*, 2011;26;9:90.
- Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006;290(1):E1-E8.
- Butkinaree C., Park K., and Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*, 2010;1800(2):96-106.



- Buyse G., De Greef C., Raeymaekers L., Droogmans G., Nilius B., Eggermont J. The ubiquitously expressed pICln protein forms homomeric complexes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 218(3):822-7.
- Ceriello A. Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia*, 1993;36(11):1119-25.
- Costa R., Civello DA., Bernardinelli E., Vanoni S., Zopf M., Scantamburlo G., Nofziger C., Patsch W., Paulmichl M., Dossena S. A Potassium-Selective Current Affected by Micromolar Concentrations of Anion Transport Inhibitors. *Cell Physiol Biochem*, 2018;45(3):867-882.
- Crupi R., Mazzon E., Marino A., La Spada G., Bramanti P., Spina E., Cuzzocrea S. Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. *J Pineal Res*, 2011. 51(3):353-60.
- Davis MJ., Wu X., Nurkiewicz TR., Kawasaki J., Gui P., Hill MA., Wilson E. Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem Biophys*, 2002;36(1):41-66.
- Daxecker H., Raab M., Bernard E., Devocelle M., Treumann A., Moran N. A peptide affinity column for the identification of integrin alpha IIb-binding proteins. *Anal Biochem*, 2008;374(1):203-12.
- De Battista C. Antidepressant agents. In: Katzung & Trevor, Basic and Clinical pharmacology, 12<sup>th</sup> edition, Mc Graw Hill Medical, 2012. Chapter 30.
- De Celis MF., Bornstein SR., Androutsellis-Theotokis A., Andoniadou CL., Licinio J., Wong ML., Ehrhart-Bornstein M. The effects of stress on brain and adrenal stem cells. *Mol Psychiatry*, 2016. 21(5):722.
- Dhingra R., Vasan RS. Diabetes and the risk of heart failure. *Heart Fail Clin*, 2012;8(1):125-33.
- Dossena S., Gandini R., Tamma G., Vezzoli V., Nofziger C., Tamplenizza M., Salvioni E., Bernardinelli E., Meyer G., Valenti G., Wolf-Watz M., Fürst J., Paulmichl M. The molecular and functional interaction between ICln and HSPC038 proteins modulates the regulation of cell volume. *J Biol Chem*, 2011. 25;286(47):40659-70.
- Dossena S., Nofziger C., Bernardinelli E., Soyal S., Patsch W., Paulmichl M. Use of the operon structure of the *C. elegans* genome as a tool to identify functionally related proteins. *Cell Physiol Biochem*, 2013;32(7):41-56.
- Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol*, 2009;587(Pt 10):2163-7.
- Duan D., Winter C., Cowley S., Hume JR., Horowitz B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, 1997;390(6658):417-21.
- Elorza-Vidal X., Gaitán-Peñas H., Estévez R. Chloride channels in astrocytes: structure, roles in brain homeostasis and implications in disease. *Int J Mol Sci*, 2019;27;20(5).
- Eustice M., Bond MR., Hanover JA. O-GlcNAc cycling and the regulation of nucleocytoplasmic dynamics. *Biochem Soc Trans*, 2017;45(2):427-36.
- Fürst J., Saino S., Dopinto S., Gandini R., Dossena S., Vezzoli V., Rodighiero S., Bazzini C., Garavaglia ML., Meyer G., Jakab M., Ritter M., Wappl-Kornherr E., Paulmichl M. The ICln interactome. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006;187, 43-49.
- Fürst J., Botta G., Saino S., Dopinto S., Gandini R., Dossena S., Vezzoli V., Rodighiero S., Bazzini C., Garavaglia ML., Meyer G., Jakab M., Ritter M.,

- Wappl-Kornherr E., Paulmichl M. The ICln interactome. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006;187(1-2):43-9.
- Furst J., Gschwentner M., Ritter M., Botta G., Jakab M., Mayer M., Garavaglia L., Bazzini C., Rodighiero S., Meyer G., Eichmuller S., Woll E., Paulmichl M. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch*, 2002;444(1-2):1-25.
  - Furst J., Jakab M., Konig M., Ritter M., Gschwentner M., Rudzki J., Danzl J., Mayer M., Burtscher CM., Schirmer J., Maier B., Nairz M., Chwatal S., Paulmichl M. Structure and function of the ion channel ICln. *Cell Physiol Biochem*, 2000;10(5-6):329-34.
  - Furst L., Ritter M., Rudzki J., Danzl J., Gschwentner M., Scandella E., Jakab M., König M., Oehl B., Lang F., Deetjen P., Paulmichl M. ICln ion channel splice variants in *Caenorhabditis elegans*: voltage dependence and interaction with an operon partner protein. *J Biol Chem*, 2002;277(6):4435-45.
  - Furst J., Schedlbauer A., Gandini R., Garavaglia ML., Saino S., Gschwentner M., Sarg B., Lindner H., Jakab M., Ritter M., Bazzini C., Botta G., Meyer G., Kontaxis G., Tilly BC., Konrat R., Paulmichl M. ICln 159 folds into a pleckstrin homology domain-like structure. Interaction with kinases and the splicing factor LSm4. *J Biol Chem*, 2005;280(35):31276-82.
  - Gonul AS., Gonul AS., Kitis O., Eker MC., Eker OD., Ozan E., Coburn K. Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with hippocampus volumes in drug-free depressed patients. *World J Biol Psychiatry*, 2011;12(2):110-8.
  - Gshwentner M., Nagl UO., Woll E., Schmarda A., Ritter M., Paulmichl M. Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels. *Pflugers Arch*, 1995;430(4):464-70.
  - Gueutin V., Deray G., Isnard-Bagnis C. Renal physiology. *Bull Cancer*, 2012;99(3):237-49.
  - Hahne HSN., Nyberg T., Helm D., Borodkin VS., Van Aalten DM., Agnew B., Kuster B. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2013;12(2):927-36.
  - Haltiwanger RS., Holt GD., Hart GW. Enzymatic Addition of O-GlcNAc to Nuclear and Cytoplasmic Proteins. Identification of a Uridine Diphospho-N-Acetylglucosamine-Peptide Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 1990;265(5):2563-8.
  - Harrigan TJ., Abdullaev IF., Jourd'heuil D., Mongin AA. Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. *J Neurochem*, 2008;106(6):2449-62.
  - Hart GW. Three Decades of Research on O-GlcNAcylation - A major nutrient sensor that regulates signaling, transcription and cellular Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014;5:183.
  - Hart GW., Housley M.P., and Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007. 446(7139):1017-22.
  - Hart GWSC., Ramirez-Correa G., Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*, 2011;80:825-58.

- Hattie M., Cekic N., Debowski AW., Vocadlo DJ., Stubbs KA. Modifying the phenyl group of PUGNAc: reactivity tuning to deliver selective inhibitors for N-acetyl-d-glucosaminidases. *Org Biomol Chem*, 2016;14(12):3193-7.
- Hernandez-Benitez R., Sedeño-Cortés A., Ramos-Mandujano G., Pasantes-Morales H. Regulatory volume decrease in neural precursor cells: taurine efflux and gene microarray analysis. *Cell Physiol Biochem*, 2014;34(6): p. 2038-48.
- Ho N., Sommers MS. and Lucki I. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013;37(8):1346-62.
- Hoffman EK., Simonsen LO. Membrane mechanism in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev*, 1989;69(2):315-82.
- Hoffmann EK., Lambert IH., Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*, 2009;89(1):193-277.
- Hoffmann EK., Schettino T., Marshall WS. The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007;148(1):29-43.
- Holt GD HG. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel proteinsaccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*, 1986;261(17):8049-57.
- <http://www.cbs.dtu.dk>
- Hussain S., Habib A., Singh A., Akhtar M., Najmi AK. Prevalence of depression among type 2 diabetes mellitus patients in India: A meta- analysis. *Psychiatry Res*, 2018;270:264-273.
- Inoue H., Takahashi N., Okada Y., Konishi M. Volume-sensitive outwardly rectifying chloride channel in white adipocytes from normal and diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010;298(4):C900-9.
- Ismail K., Maissi E., Chalder T., Schmidt U., Bartlett J., Patel A., Dickens C., Creed F., Treasure J. A randomised controlled trial of cognitive behaviour therapy and motivational interviewing for people with Type 1 diabetes mellitus with persistent sub-optimal glycaemic control: a Diabetes and Psychological Therapies (ADaPT) study. *Health Technol Assess*, 2010;14(22):1-101.
- Jackson PS., Strange K. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am J Physiol*, 1994;267:C1203-C9.
- Kneass ZT., Marchase RB. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. *J Biol Chem*, 2004;279(44):45759-65.
- König B., and Stauber T. Biophysics and structure-function relationships of LRRC8-formed volume-regulated anion channels. *Biophys. J*, 2019;116, 1185-1193.
- Korczak, DJ., Pereira S., Koulajian K., Matejcek A., Giacca A. Type 1 diabetes mellitus and major depressive disorder: evidence for a biological link. *Diabetologia*, 2011;54(10): p. 2483-93.
- Krapivinsky GB., Ackerman MJ., Gordon EA., Krapivinsky LD., Clapham DE. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell*, 1994;76(3):439-48.
- La Flamme SE., Mathew-Steiner S., Singh N., Colello-Borges D., and Nieves B. Integrin and microtubule crosstalk in the regulation of cellular processes. *Cell. Mol. Life Sci*, 2018;75(22):4177-4185

- Lagerlof O., and Hart GW. O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins: Roles in Neuronal Functions and in Neurodegeneration. *Adv Neurobiol.* 2014;9:343-66.
- Lang F. Effect of cell hydration on metabolism. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser,* 2011;69(69):115-26.
- Lang F., Lepple-Wienhues A., Paulmichl M., Szabò I., Siemen D., Gulbins E. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem,* 1998;8(6):285-92. (A)
- Lang F., Lepple-Wienhues A., Szabò I., Siemen D., Gulbins E. Cell volume in cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib Nephrol,* 1998;123:158-68. (B)
- Larkin D., Murphy D., Reilly DF., Cahill M., Sattler E., Harriott P., Cahill DJ., Moran N. ICln, a novel integrin alphaIIb beta3-associated protein, functionally regulates platelet activation. *J Biol Chem,* 2004;279(26):27286-93.
- Larkin D., Treumann A., Murphy D., De Chaumont C., Kiernan A., Moran N. Compartmentalization regulates the interaction between the platelet integrin alpha IIb beta 3 and ICln. *Br J Haematol,* 2009;144(4):580-90.
- Levitan I., Garber SS. Anion competition for a volume-regulated current. *Biophys J,* 1998;75(1):226-35.
- Li Z., Yi W. Regulation of cancer metabolism by O-GlcNAcylation. *Glycoconj J,* 2014;31(3):185-91.
- Liu Y., Zhang H., Men H., Du Y., Xiao Z., Zhang F., Huang D., Du X., Gamper N., Zhang H. Volume-regulated Cl<sup>-</sup> current: contributions of distinct Cl<sup>-</sup> channel and localized Ca<sup>2+</sup> signals. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol,* 2019;317(3):466-480.
- Maertens CDG., Chakraborty P., Nilius B. Inhibition of volume-regulated anion channels in cultured endothelial cells by the anti-oestrogens clomiphene and nafoxidine. *Br J Pharmacol,* 2001;132:135-42.
- Manconi B., Cabras T., Sanna M., Piras V., Liori B., Pisano E., Iavarone F., Vincenzoni F., Cordaro M., Castagnola M., Messina I. N- and O-linked glycosylation site profiling of the human basic salivary proline-rich protein 3M. *J Sep Sci,* 2016;39(10):1987-97.
- Mansur RB., Brietzke E., McIntyre RS. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev,* 2015.52:89-104.
- Margalit A., Gilutz H., Granot Y. Original article: low regulatory volume decrease rate in platelets from ischemic patients: a possible role for heparin a(3) in thrombogenicity. *Platelets,* 1995;6(6):371-6.
- Marshall S., Bacote V., Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem,* 1991;266(8):4706-12.
- McIntyre RS., Park KY., Law CW., Sultan F., Adams A., Lourenco MT., Lo AK., Soczynska JK., Woldeyohannes H., Alsuwaidan M., Yoon J., Kennedy SH. The association between conventional antidepressants and the metabolic syndrome: a review of the evidence and clinical implications. *CNS Drugs,* 2010;24(9):741-53.
- Mongin AA. Volume-regulated anion channel a frenemy within the brain. *Pflugers Arch,* 2016. 468(3):421-41.
- Morabito R., Costa R., Rizzo V., Remigante A., Nofziger C., La Spada G., Marino A., Paulmichl M., Dossena S. Crude venom from nematocysts of *Pelagia*

- noctiluca (*Cnidaria: Scyphozoa*) elicits a sodium conductance in the plasma membrane of mammalian cells. *Sci Rep*, 2017;7:41065.
- Morgan RA., Couture L., Elroy-Stein O., Ragheb J., Moss B., Anderson WF. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res*, 1992;20(6):1293-9.
  - Mush MW., Davis-Amaral EM., Vandenburg HH., Goldstein L. Hypotonicity stimulates translocation of ICln in neonatal rat cardiac myocytes. *Pflugers Arch*, 1998. 436(3):415-22.
  - Mush MW., Luer CA., Davis-Amaral EM., Goldstein L. Hypotonic stress induces translocation of the osmolyte channel protein pICln in embryonic skate (*Raja eglanteria*) heart. *J Exp Zool*, 1997. 277(6):460-3.
  - Nagelhus EA., Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev*, 2013. 93(4):1543-62.
  - Nagy, T., Balasa A., Frank D., Rab A., Rideg O., Kotek G., Magyarlaki T., Bogner P., Kovacs GL., Miseta A. O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells. *Eur Biophys J*, 2010;39(8):1207-17.
  - Ngoh GA., Facundo HT., Zafir A., Jones SP. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circ Res*, 2010;107(2):171-85.
  - Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Bio*, 1997;68(1):69-119.
  - Nilius B., Oike M., Zahradnik I., Droogmans G. Activation of a Cl<sup>-</sup> current by hypotonic volume increase in human endothelial cells. *J Gen Physiol*, 1994;103(5):787-805.
  - Nilius B., Prenen J., Droogmans G. Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. *Pflugers Arch*, 1998;436(5):742-8. (A)
  - Nilius B., Prenen J., Droogmans G. Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. *Pflugers Arch*, 1998;436(5):742-8. (B)
  - Oiki S., Kubo M., Okada Y. Mg<sup>2+</sup> and ATP-dependence of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human epithelial cells. *Jpn J Physiol*, 1994;44 Suppl 2:S77-9.
  - Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sub>2</sub> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol*, 1997; 273:C755-C89. (A)
  - Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *The Journal of Physiology*, 2001;532(1):3-16.
  - Okada Y., Oiki S., Tominaga M., Kubo M., Miwa A., Tominaga T., Tsumura T., Ueda K. Volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel in human epithelial cells: regulation by ATP and relation to P-glycoprotein. *Jpn J Physiol*, 1997;47:S19-20. (B)
  - Oliver Pagel SL., Sickmann A., and Zahedi PR. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2015;3(12): 235-53.
  - Olivier-Van Stichelen S., Hanover JA. You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2015;18(4):339-45.

- Paulmichl M., Li Y., Wickman K., Ackerman M., Peralta E., Clapham D. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature*, 1992;356(6366):238-41.
- Pedersen SF., Klausen TK., and Nilius B. The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing Odyssey. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015;213:868-881.
- Pedersen SF., Okada Y., Nilius B. Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflugers Arch*, 2016;468(3):371-83.
- Peterson SB., Hart GW. New insights: A role for O-GlcNAcylation in diabetic complications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2016;51(3):150-61.
- Pivonello R., De Leo M., Vitale P., Cozzolino A., Simeoli C., De Martino MC., Lombardi G., Colao A. Pathophysiology of diabetes mellitus in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*, 2010;92 Suppl 1:77-81.
- Prabakaran S., Lippens G., Steen H., Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2012;4(6):565-83.
- Qing G., Lu Q., Xiong Y., Zhang L., Wang H., Li X., Liang X., Sun T. New Opportunities and Challenges of Smart Polymers in Post-Translational Modification Proteomics. *Adv Mater*, 2017;29(20).
- Qiu Z., Dubin AE., Tu B., Reddy K., Miraglia LJ., Reinhardt J., Orth AP., Patapoutian A. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*, 2014;157, 447-458.
- Raab M., Parthasarathi L., Treumann A., Moran N., Daxecker H. Differential binding of ICln in platelets to integrin-derived activating and inhibitory peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010;392(3):258-63.
- Renn BN., Feliciano L., Segal DL. The bidirectional relationship of depression and diabetes: a systematic review. *Clin Psychol Rev*, 2011;31(8):1239-46.
- Reus GZ., Matias BI., Maciel AL., Abelaira HM., Ignácio ZM., De Moura AB., Matos D., Danielski LG., Petronilho F., Carvalho AF., Quevedo J. Mechanism of synergistic action on behavior, oxidative stress and inflammation following co-treatment with ketamine and different antidepressant classes. *Pharmacol Rep*, 2017;69(5):1094-1102.
- Ritter M., Ravasio A., Jakab M., Chwatal S., Furst J., Laich A., Gschwentner M., Signorelli S., Burtscher C., Eichmuller S., Paulmichl M. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *J Biol Chem*, 2003;278(50):50163-74.
- Rodighiero S., Bazzini C., Ritter M., Furst J., Botta G., Meyer G., Paulmichl M. Cell Physiol Biochem. Fixation, mounting and sealing with nail polish of cell specimens lead to incorrect FRET measurements using acceptor photobleaching. *Epub*, 2008. 21(5-6):489-98.
- Roy T., and Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord*, 2012;142 Suppl:S8-21.
- Sanavio E., Cornoldi C. *Psicologia Clinica*, edizione 2, editore Il Mulino, 2010.
- Scandella E. The Promoter for Constitutive Expression of the Human ICln Gene CLNS1A. *Journal of Biological Chemistry*, 2000;275(21):15613-20.

- Schedlbauer A., Tamma G., Rodighiero S., Civello DA., Tamplenizza M., Ledolter K., Nofziger C., Patsch W., Konrat R., Paulmichl M., Dossena S. Binding of the protein ICln to  $\alpha$ -integrin contributes to the activation of IC<sub>lswell</sub> current. *Sci Rep*, 2019. 21;9(1):12195.
- Schorr SG., Hammes HP., Abholz HH., Landgraf R., Bertram B. The prevention and treatment of retinal complications in diabetes. *Dtsch Arztebl Int*, 2016;113(48):816-823.
- Stowell SR., Ju T., Cummings RD. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*, 2015;10:473-510.
- Strange K., Emma F., Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol*, 1996;270(3Pt1):C711-30.
- Strange K., Yamada T., and Denton JS. A 30-year journey from volume-regulated anion currents to molecular structure of the LRRC8 channel. *J. Gen. Physiol*, 2019;151,100-117.
- Sun YM., Su Y., Li J., Wang LF. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013;433(4):359-61.
- Syeda R., Qui Z., Dubin AE., Murthy SE., Florendo MN., Mason DE., Mathur J., Cahalan SM., Peters EC., Montal M., Patapoutian A. LRRC8 proteins form volume-regulated anion channels that sense ionic strength. *Cell*, 2016;164, 499-511.
- Untiet V., Kovermann P., Gerkauf NJ., Gensch T., Rose CR., Fahlke C. Glutamate transporter-associated anion channels adjust intracellular chloride concentrations during glial maturation. *Glia*, 2017;65(2):388-400.
- Vaidyanathan K., Wells L. Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes. *J Biol Chem*, 2014;289(50):34466-71.
- Valverde MA., Diaz M., Sepulveda FV., Gill DR., Hyde SC., Higgins CF. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*, 1992;355(6363):830-3.
- Vandenberg JJ., Bett GC., Powell T. Contribution of a swelling-activated chloride current to changes in the cardiac action potential. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 1997;273(2):C541-C7.
- Volk KA., Zhang C., Husted RF., Stokes JB. Cl<sup>-</sup> current in IMCD cells activated by hypotonicity: time course, ATP dependence, and inhibitors. *Am J Physiol*, 1996;271(3 Pt 2):F552-9.
- Voss FK., Ulrich F., Münch J., Lazarow K., Lutter D., Mah N., Andrade-Navarro MA., von Kries JP., Stauber T., Jentsch TJ. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*, 2014;344, 634-638.
- Walsh CT., Garneau-Tsodikova S., Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005;44(45):7342-72.
- Wellen KE., and Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 2005. 115(5):1111- 9.
- Wong R., Chen W., Zhong X., Rutka JT., Feng ZP., Sun HS. Swelling-induced chloride current in glioblastoma proliferation, migration, and invasion. *J Cell Physiol*, 2018;233(1):363-370.

- Yamamoto, S., Ichishima K., and Ehara T. Reduced volume-regulated outwardly rectifying anion channel activity in ventricular myocyte of type 1 diabetic mice. *J Physiol Sci*, 2009;59(2):87-96.
- Yang WH., Kim JE., Nam HW., Ju JW., Kim HS., Kim YS., Cho JW. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*, 2006;8(10):1074-83.
- Yao H., Li A., Wang M. Systematic analysis and prediction of in situ cross talk of O-GlcNAcylation and phosphorylation. *Biomed Res Int*, 2015;2015:279823.
- Yi XJ., Wang H., Li QP. Exercise on the sexual development and the fat leptin receptor mRNA expression in the high-fat diet female rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2009;25(4):454-6, 542.
- Yonekura H., Kim CH., Sakurai S., Yamamoto Y., Takiya T., Futo S., Watanabe T., Yamamoto H. Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs. *Endothelium*, 2004;11(5-6):293-300.
- Zunszain PA., Anacker C., Cattaneo A., Carvalho LA., Pariante CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych*, 2011;35(3):722-9.