



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

Studio dell'interazione di un composto del Platino con Ca-ATPasi

Study about the interaction of a Platinum compound with Ca-ATPase

Relatore

Maria Rosa Moncelli

Correlatore

Francesco Tadini-Buoninsegni

Candidato

Giacomo Sordi

Anno Accademico 2013/2014

Dedicato alle persone senza le quali tutto ciò non sarebbe stato possibile.

*Al personale di laboratorio , persone meravigliose, in particolare alla prof.ssa
Maria Rosa e a Francesco, per la pazienza, la fiducia e l'immensa disponibilità;*

Alla mia famiglia, che mi ha sempre sostenuto;

Alla mia dolce Eva, la mia forza e il mio rifugio.

Indice

CAPITOLO 1: Introduzione

- 1.1 Membrana cellulare e proteine di membrana
- 1.2 Diversi tipi di trasporto
- 1.3 Pompe ioniche
- 1.4 Le ATPasi
 - 1.4.1 Le P-ATPasi come target farmacologico
- 1.5 Ca²⁺-ATPasi
 - 1.5.1 Struttura
 - 1.5.2 Meccanismo di funzionamento
 - 1.5.3 SERCA: la svolta farmacologica
- 1.6 Lo ione Ca²⁺ e la vita
- 1.7 Una nuova scoperta

CAPITOLO 2: Materiali e Metodi

- 2.1 Prodotti chimici
- 2.2 Modello sperimentale di membrana biologica: solid supported membrane (SSM)
- 2.3 Lo strumento SURFE²R^{One}
- 2.4 Metodo del salto di concentrazione

CAPITOLO 3: Risultati e Discussione

- 3.1 Obiettivo
- 3.2 Misura del transiente di corrente
- 3.3 Risultati e discussione

Conclusioni

Bibliografia

OBIETTIVO.

Data l'importanza dei composti del platino nei trattamenti dei tumori, il nostro scopo è stato di iniziare uno studio sull'interazione del cis-platino con la Ca^{2+} -ATPasi, in quanto questa proteina è over-espressa in molte forme tumorali.

Capitolo 1
Introduzione

1.1 MEMBRANA CELLULARE E PROTEINE DI MEMBRANA

La membrana cellulare è il rivestimento, spesso 5-10 nm (50-100 Å), che circonda ogni cellula e la separa dall'ambiente esterno. Essa è costituita per lo più da fosfolipidi che presentano una parte polare, *testa*, e una parte apolare, *coda*, i quali si dispongono

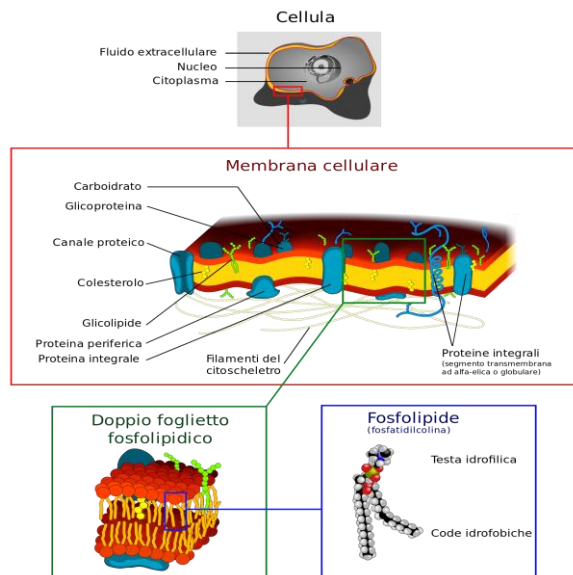


Figura 1.1 Rappresentazione schematica della membrana cellulare e dei suoi scomparti. Immagine tratta da http://it.wikipedia.org/wiki/Membrana_cellulare.

formando il cosiddetto doppio strato fosfolipidico: le teste polari si affacciano sulla parte citosolica e verso l'ambiente esterno ponendo tra loro le code apolari che costituiscono l'ambiente idrofobico interno alla membrana. Altri componenti minori della membrana, ma con funzioni molto importanti, sono le proteine, il colesterolo e i carboidrati (fig. 1.1).

In condizioni fisiologiche sia le componenti lipidiche che le proteine sono in grado di muoversi all'interno del monostrato di appartenenza. I fosfolipidi posseggono

un'alta mobilità e possono anche dare origine ad un flip-flop da una parte all'altra del bistrato. Le proteine di membrana hanno una mobilità molto più ridotta imposta dalla loro natura. Questo perché la membrana si trova in uno stato fisico detto liquido-cristallino, in cui le catene carboniose dei lipidi si trovano allo stato fluido e quindi hanno una notevole libertà di movimento.

Lo scopo principale della membrana cellulare è quello di isolare e proteggere la cellula dall'ambiente esterno, ma anche quello di monitorare l'entrata o l'uscita delle diverse sostanze utili o nocive alla vita della cellula. Più nel dettaglio, l'idrofobicità dell'interno del doppio strato fosfolipidico limita di molto la permeabilità di sostanze polari o polarizzabili, che sono le più numerose in un ambiente acquoso come quello plasmatico, impedendo così un diffondersi incontrollato di sostanze tra citosol e ambiente esterno. A poter passare attraverso la membrana per semplice diffusione sono piccole molecole gassose come O₂, N₂, CO₂, molecole lipidiche a basso peso molecolare, acqua e altre molecole polari di piccole dimensioni come etanolo e glicerolo che riescono ad attraversarla molto lentamente, come anche molecole prive di carica di grandi dimensioni quali alcuni ormoni. Le specie cariche, come gli ioni e le sostanze con gruppi carichi, sono incapaci di diffondere attraverso la membrana indipendentemente dalle loro dimensioni. Se da una parte la membrana cellulare funge più come barriera, dall'altra le proteine di membrana gestiscono, attraverso meccanismi più complessi, una giusta regolazione di tutte le sostanze, ma sono importanti anche per altre funzioni. Le proteine, infatti, hanno diversi ruoli: sono enzimi che catalizzano varie reazioni chimiche, trasportatori attraverso la membrana (canali ionici, pompe ioniche, carrier), molecole strutturali che mantengono la forma della cellula, recettori

che riconoscono i diversi segnali chimici provenienti dall'ambiente, ecc.

Le proteine di membrana sono suddivise in due categorie: le estrinseche, o proteine periferiche, e le intrinseche, o proteine transmembrana o integrali (fig. 1.2).

Le proteine estrinseche si legano alla membrana tramite legami non covalenti con le

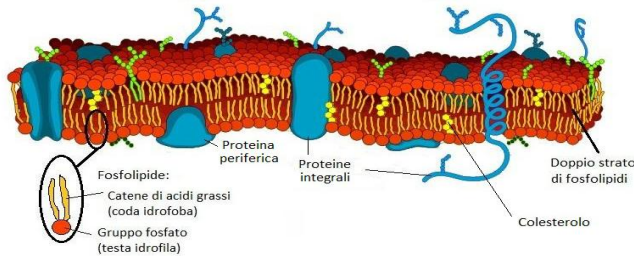


Figura 1.2. Rappresentazione della membrana cellulare con i vari componenti che la costituiscono indicate dalle didascalie in figura, da <http://www.oilproject.org>.

proteine transmembrana o con le teste polari dei fosfolipidi. Esse non attraversano l'intera membrana, ma si affacciano soltanto sulla parte interna o esterna della cellula.

Le proteine transmembrana attraversano l'intero doppio strato fosfolipidico anche più volte, affacciandosi da entrambi i lati della cellula.

Soltanto queste possono funzionare da trasportatori di sostanze attraverso la membrana. Per il loro importante ruolo biologico di trasportatori, e mediatori nelle interazioni della cellula con l'ambiente esterno, le proteine di membrana sono un importantissimo target farmacologico.

1.2 DIVERSI TIPI DI TRASPORTO

Ci sono due tipi di trasporto: il trasporto passivo, se la specie trasportata segue il gradiente di concentrazione (diffusione), e il trasporto attivo, se, viceversa, la specie è trasportata contro gradiente di concentrazione.

Nel trasporto passivo la proteina partecipa facilitando l'immissione o l'emissione di un determinato soluto attraverso la membrana, e non si ha dispendio di energia. Le proteine che attuano un trasferimento passivo sono di due tipi: i carriers ed i canali ionici. I carriers mediano il trasporto di carboidrati, aminoacidi e nucleosidi. Una volta legato il soluto, dalla parte dove esso è più concentrato, all'interno o all'esterno della cellula, il carrier cambia conformazione rilasciandolo dall'altra parte dove la concentrazione è più bassa. I canali proteici, invece, formano dei pori attraverso la membrana che a seconda dei vari stimoli si aprono e si chiudono permettendo il passaggio di determinate sostanze.

A differenza del trasporto passivo, nel trasporto attivo è necessario un apporto di energia. In questo tipo di meccanismo le sostanze si muovono contro gradiente chimico, elettrico o elettrochimico. Si distinguono due classi principali di trasporto attivo: quello primario e quello secondario. Nel trasporto primario avviene un dispendio di energia al fine dello spostamento diretto di una sostanza, mentre in quello secondario il trasporto di una sostanza avviene di conseguenza a quello primario di un'altra. Le ATPasi sono un esempio molto importante di proteine che utilizzano l'energia dovuta all'idrolisi di ATP (adenosintrifosfato) in ADP (adenosindifosfato) per il trasporto di ioni contro il loro gradiente elettrochimico. Nel trasporto secondario non c'è un consumo diretto di energia perché sfrutta il gradiente formato durante il trasporto primario, ma dipende comunque dall'energia necessaria al primo trasloco. Esistono due forme di trasporto: l'uniporto, e il cotrasporto del quale fanno parte il simporto e l'antiporto (fig. 1.3).

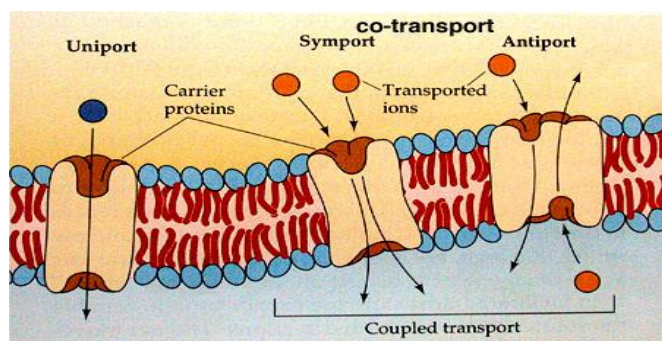


Figura 1.3. Schematizzazione dei meccanismi di uniporto, simporto e antiporto, da <http://academic.brooklyn.cuny.edu>

L'uniporto è il trasporto di una sola sostanza. Il cotrasporto è il trasporto contemporaneo di due sostanze: per il simporto il movimento delle due specie avviene nella stessa direzione attraverso la membrana e per l'antiporto, invece, in direzione opposta.

Quando a venir trasportati attraverso la membrana cellulare sono degli ioni, il processo può essere ulteriormente contraddistinto da un punto di vista delle cariche, ovvero si definisce trasporto elettrogenico un movimento di carica complessiva diversa da zero, invece si ha un trasporto elettroneutrale se non c'è stato un movimento di carica netto.

1.3 POMPE IONICHE

I trasportatori ionici prendono spesso il nome di pompe ioniche. Esse hanno precisi siti di legame specifici per un determinato soluto, che legandosi, scatena un susseguirsi di cambi conformazionali nella proteina fino ad essere portato al di là della barriera fosfolipidica. Per avvenire tutto ciò, però, la proteina deve essere attivata da una fonte di energia. La fonte più comune per il nostro organismo è l'ATP. Comunemente l'idrolisi dell'ATP, processo che libera molta energia, permette ad un gruppo fosfato di legarsi al proprio sito di legame sulla proteina, e, di conseguenza, si innesca il cambio di conformazione necessario allo svolgersi del trasporto. Altre fonti di energia oltre all'ATP possono essere la radiazione UV, o l'energia derivante dal trasporto di un altro soluto il cui gradiente chimico e elettrochimico sia esoergonico, cioè fornisca energia. Reazioni di questo genere sono di tipo enzimatico. La specificità della proteina per la sostanza o le sostanze di cui si occupa è molto alta.

1.4 LE ATPasi

Possono essere classificate in più categorie: F, V, E, A, P.

Le F-ATPasi sono localizzate nelle membrane dei mitocondri, dei cloroplasti e dei batteri. Sono le prime produttrici di ATP, che rigenerano, sfruttando il gradiente protonico della fosforilazione ossidativa.

Le V-ATPasi si trovano principalmente nei vacuoli (organelli cellulari) e si occupano della riduzione del pH all'interno di quest'ultimi.

Le A-ATPasi funzionano come le F-ATPasi, ma sono presenti negli Archea, batteri che vivono in ambienti solfurei che si pensa popolassero la Terra ai suoi primordi.

Le E-ATPasi sono presenti nelle membrane cellulari e si occupano dell'idrolizzazione di numerosi nucleotidi non solo dell'ATP.

Le ATPasi di tipo P si occupano del trasporto selettivo di diversi ioni come H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , attraverso diversi tipi di membrane biologiche. A differenza degli altri tipi di ATPasi, quelle di tipo P, hanno una struttura più semplice, con una subunità α , che contiene tutti i componenti essenziali per il trasporto e l'attività enzimatica. Un'altra differenza dalle altre ATPasi è che il meccanismo di reazione prevede un intermedio fosforilato: il P_i (fosforo inorganico) è trasferito ad un residuo interno di aspartile^[1]. Per le conoscenze che si hanno in materia su questo tipo di enzimi, si può affermare che abbiano tutte una simile struttura di base, e di un meccanismo analogo per il trasporto degli ioni. Infatti un passo molto importante per capire il complesso meccanismo riguardo queste pompe ioniche, è stato fatto quando è stata determinata la struttura atomica della Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarco(endo)plasmatico, proveniente dal muscolo scheletrico del coniglio^[2]. Questa struttura rivelò la generale architettura

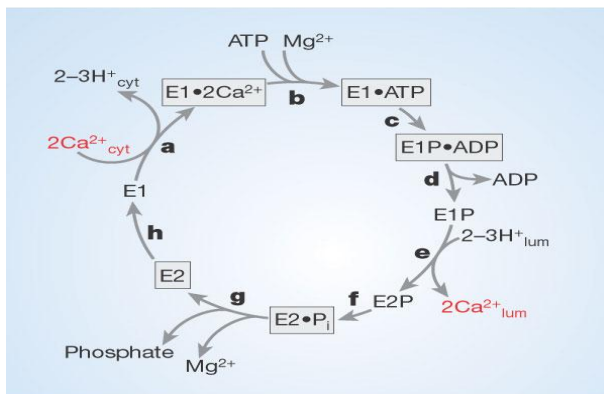


Figura 1.4. Post-Albers scheme: qui in particolare è preso come esempio il ciclo della Ca^{2+} -ATPasi. C. Roy, D. Lancaster, "Structural biology: Ion pump in the movies", *Nature* 432, 286-287 (18 November 2004).

delle subunità catalitiche delle P-ATPasi, la quale comprende: tre domini citoplasmatici A, P e N, un segmento transmembranale di 10 eliche (da TM1 a TM10) recanti i due siti di legame per i due ioni Ca^{2+} . Più recentemente sono state descritte anche le strutture di altre proteine della famiglia delle P-ATPasi: la Na^+,K^+ -ATPasi, dal rene di maiale, la H^+ -ATPasi e la Cu -ATPasi. Il meccanismo generale di funzionamento di molte delle P-ATPasi

consiste nell'antiporto di due ioni: Na^+-K^+ , ma anche $Ca^{2+}-H^+$. Il ciclo di reazione è sintetizzato nel "Post-Albers scheme" (fig. 1.4) nel quale si può vedere che le pompe attuano una conversione tra due conformazioni principali: E1 ed E2.

1.4.1 LE P-ATPasi COME TARGET FARMACOLOGICO ^[1]

Le proteine di membrana sono un importante bersaglio farmacologico. Non sono da meno le P-ATPasi, che anzi, per la loro funzione di trasportatori di ioni, sono tra le proteine più importanti per la fisiologia cellulare. Infatti il loro ruolo è centrale nella sopravvivenza della cellula, per questo, sono collegate a numerose malattie anche molto gravi. Ad esempio alcune malattie neurodegenerative sono dovute ad una mutazione della Na^+,K^+ -ATPasi, e una mutazione nel reticolo sarcoplasmatico della Ca^{2+} -ATPasi (SERCA) può causare diversi tipi di miopatie (sindrome dovuta ad alterazioni delle cellule o del tessuto interstiziale dei muscoli volontari), a seconda dell'isoforma specifica implicata (SERCA1 o SERCA2). La Ca^{2+} -ATPasi può, soprattutto, interagire con il meccanismo apoptodico (morte programmata della cellula) che è innescato da un'alta concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} .

La Na^+,K^+ -ATPasi è invece designata come target per la cura dell'insufficienza cardiaca. I CTS (cardiotonic steroids) sono degli ottimi inibitori di questa proteina. L'inibizione della Na^+,K^+ -ATPasi attraverso il legame con i CTS provoca un innalzamento della concentrazione di Na^+ all'interno della cellula. Come risultato, il

trasporto secondario di Ca^{2+} , verso l'esterno della cellula, è rallentato e la contrattilità del muscolo cardiaco aumenta (effetto inotropo positivo).

Per lo sviluppo di inibitori specifici, per le ATPasi, sono molto importanti le informazioni che si possono ottenere sulla struttura e sul meccanismo di trasporto degli ioni.

1.5 Ca^{2+} -ATPasi^[3]

Le Ca^{2+} -ATPasi sono enzimi della classe delle P-ATPasi, che trasferiscono ioni Ca^{2+} , e sono fondamentali per molti processi fisiologici. A seconda della localizzazione nella cellula le Ca^{2+} -ATPasi si dividono in due sottocategorie:

- SERCA (*Sarco-(Endo)Plasmic Reticulum Calcium ATPase*) presente nel reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari con la funzione di sequestrare ioni Ca^{2+} , e portarli all'interno del reticolo sarcoplasmatico.
- PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*) presente nella membrana plasmatica delle cellule, e ha la funzione di pompare ioni calcio verso l'ambiente esterno alla cellula.

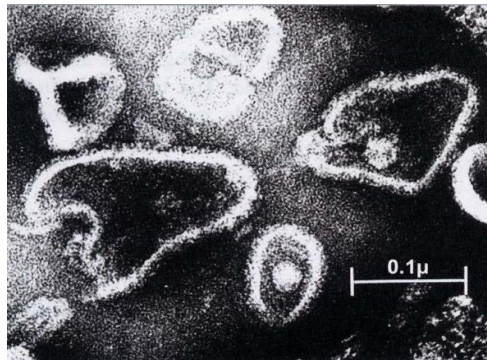


Figura 1.5. Immagine al microscopio di vescicole del reticolo sarcoplasmatico. G. Inesi, C. Toyoshima; *Catalytic and Transport Mechanism of the Sarco-(Endo)Plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)*; da "Handbook of ATPases" a cura di M. Futani, Y. Wada, J. H. Kaplan, (2004) 63-87.

La SERCA è presente nel nostro organismo in tre diverse isoforme, che sono specifiche per il tessuto in cui sono collocate. La SERCA1 si trova nel tessuto muscolare scheletrico, la SERCA2 nel tessuto muscolare cardiaco e la SERCA3 in altri tessuti. Tutti i tipi di SERCA hanno un importante ruolo in numerosi meccanismi citosolici di segnalazione dove è richiesto il sequestro di Ca^{2+} .

L'isoforma specifica usata in questo studio è la SERCA1. Essa è contenuta in vescicole

(fig. 1.5) ottenute dal muscolo scheletrico del coniglio che viene omogenizzato e ripetutamente centrifugato. L'esperimento viene fatto direttamente con queste vescicole che permettono la misura dell'attività ATPasica e del trasporto di Ca^{2+} per lo studio del meccanismo di funzionamento di questo enzima^[3].

1.5.1 STRUTTURA

Gli studi strutturali per le Ca^{2+} -ATPasi sono stati eseguiti proprio con l'isoforma SERCA1. Questa proteina è costituita da 994 aminoacidi distribuiti principalmente tra la parte transmembranale attraverso il doppio strato fosfolipidico e la parte citosolica. I primi studi al TEM (transmission electron microscopy) e i successivi ai raggi X dell'enzima cristallizzato, hanno dimostrato che la parte transmembranale è costituita da dieci segmenti per lo più in conformazione ad elica. La regione esterna alla membrana include tre diversi domini denominati A, N e P. La struttura cristallina è

ottenuta in presenza di Ca^{2+} nella conformazione chiamata E1, che è la conformazione di maggiore affinità per il legame con gli ioni calcio (fig.1.6).

Il dominio P è quello in cui avviene la fosforilazione di un residuo di aspartato da parte dell'ATP ed è formato da sette β -foglietti fiancheggiati da otto piccole eliche. Questo dominio è connesso direttamente ai residui trans-membranali che collegano tra loro la parte citosolica della proteina e quella interna, nel lumen del reticolo sarcoplasmatico. Il dominio P è inoltre collegato al sito catalitico, dove avviene il legame con gli ioni Ca^{2+} , che è in una posizione centrale nella parte esterna, e ben accessibile.

Il dominio N è collegato al dominio P attraverso due segmenti. La sua funzione è quella di legare l'ATP che deve poi essere idrolizzato. Questo dominio si compone di sette β -foglietti come il dominio P, ma con soltanto altre due α -eliche legate insieme. I residui nucleotidici dell'adenosina trifosfato si pongono all'interno di una "tasca" che si forma tra i β -foglietti e le α -eliche.

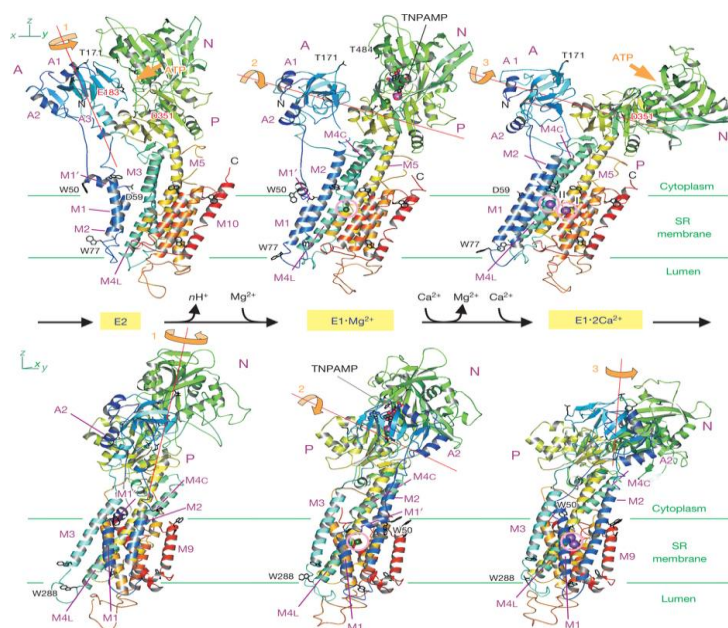


Figura 1.6. Struttura della SERCA. Sono indicati i domini P, N e A. Si può notare come essi cambino di orientazione nelle diverse conformazioni E1 ed E2 che la proteina assume durante il suo funzionamento. Immagine tratta da: C. Tpyoshima, S. Iwasawa, H. Ogawa, A. Hirata, J. Tsueda, G. Inesi, "Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg^{2+} -bound E1 state", Nature, 495, 260-264 (2013).

Il dominio A è una parte citoplasmatica posta tra due segmenti trans-membranali. Esso si compone prevalentemente di β -foglietti ed è coinvolto nei cambi conformazionali che regolano il trasporto degli ioni. Il dominio A include anche dei segmenti N-terminali piegati in due piccole α -eliche adiacenti alla struttura dei β -foglietti.

Le dieci eliche che compongono la parte trans-membrana dell'enzima sono collegate direttamente al dominio P. La principale caratteristica di questa regione è il dominio di legame per gli ioni Ca^{2+} che si compone di due siti (sito I e il sito II) formati da parecchi residui che partecipano alla stabilizzazione del legame con questo ione.

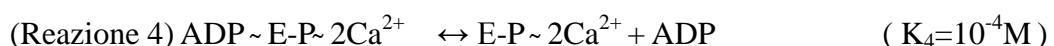
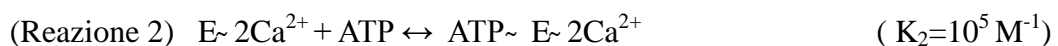
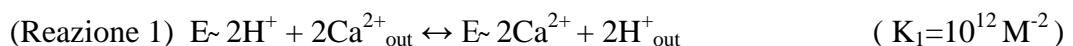
1.5.2 MECCANISMO DI FUNZIONAMENTO

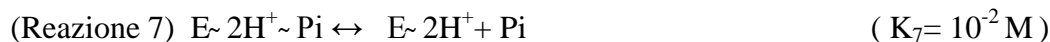
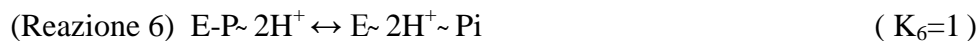
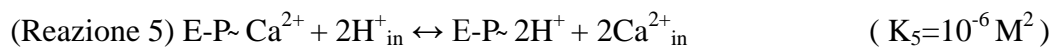
Il trasporto attivo da parte della SERCA avviene in presenza di ATP, con un perfetto rapporto di due ioni Ca^{2+} trasportati, per molecola di ATP che viene idrolizzata, dal citoplasma della cellula all'interno del lume del reticolo sarcoplasmatico. Il trasporto degli ioni calcio avviene contro un gradiente elettrochimico molto elevato perché la concentrazione di Ca^{2+} differisce di ben 4 ordini di grandezza: 10^{-7} M nel citoplasma e 10^{-3} M nel lume del reticolo. È stato anche dimostrato che il trasporto di due ioni Ca^{2+} all'interno del lume del reticolo è accoppiato ad un contro trasporto di due ioni H^+ , e quindi, che la pompa è elettrogenica. Il legame con i due ioni avviene in modo sequenziale e cooperativo, con due differenti costanti di equilibrio. Infatti, è il cambio di orientazione del sito I legato al primo ione Ca^{2+} a permettere il legame con il Ca^{2+} al sito II. I due legami, poi, comportano un ulteriore cambio conformazionale che rende l'enzima propenso al legame con l'ATP. L'ATP si lega al dominio N dell'enzima e fosforila un residuo di aspartato nel dominio P, ciò è reso possibile dall'ione Mg^{2+} . Questo ione non è tanto importante affinché l'ATP si leghi all'enzima, ma è fondamentale perché possa avvenire la scissione del gruppo fosfato dall'ATP e quindi l'idrolisi. Il magnesio infatti stabilizza l'intermedio di reazione tra proteina legata con l'ATP e proteina ad idrolisi avvenuta, fornendo, quindi, un vantaggio cinetico. L'energia libera richiesta per il trasporto attivo di Ca^{2+} all'interno del reticolo sarcoplasmatico è data da:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}} \right) + zF\Delta V \approx 51 \text{ KJ}/(\text{mol.})$$

dove $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ e $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ sono rispettivamente la concentrazione di calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico e la concentrazione nel citosol, z è la carica elettrica degli ioni trasportati, R è la costante dei gas, F la costante di Faraday, e ΔV è il potenziale elettrico attraverso il bistrato fosfolipidico. È stato provato che l'energia libera richiesta allo svolgersi di tutto il meccanismo di trasporto è comparabile con il potenziale chimico che l'ATP può offrire.

Il legame dell'ATP con l'enzima, che avviene attraverso un fosfato terminale, non sarebbe possibile se prima la proteina non si legasse agli ioni Ca^{2+} . Lo ione calcio infatti attiva l'enzima permettendo una rapida formazione dell'intermedio fosforilato, a seguito del trasferimento del fosfato terminale su un residuo aspartilico. Avvenuto ciò, si può innescare lo spostamento vettoriale dei due ioni Ca^{2+} . C'è da dire anche che il ciclo di questa ATPasi descritto adesso è altamente reversibile. Tutto il processo dell'enzima si basa sulla conversione tra due conformazioni: lo stato E1, che ha alta affinità per gli ioni Ca^{2+} e i siti di legame orientati verso il lato citoplasmatico, e lo stato E2 che ha scarsa affinità per gli ioni calcio e l'orientazione dei siti verso il lume del reticolo sarcoplasmatico. Tutto il meccanismo può essere capito meglio analizzando le varie reazioni parziali e le loro costanti di equilibrio:





dove il simbolo (-) indica un legame covalente e il simbolo (~) un legame non covalente. Le costanti si riferiscono ad una temperatura di 25°C e ad un pH 7.

Nella prima reazione si può notare l'alta affinità del legame con i due ioni Ca^{2+} , che attiva l'enzima permettendo l'utilizzazione dell'ATP e la formazione dell'intermedio fosforilato (reazioni 2, 3, 4). A sua volta l'enzima fosforilato abbassa l'affinità e cambia l'orientazione dei siti di legame con l'ione calcio affinché essi possano essere rilasciati nel lume del reticolo sarcoplasmatico (reazione 5). Nelle ultime due reazioni viene rilasciato il Pi e l'enzima ritorna alla conformazione iniziale. L'energia derivante dall'ATP serve all'enzima per poter rilasciare l'ione Ca^{2+} perché, come si può vedere dalla K_1 e dalla K_5 , l'affinità da parte dell'enzima per il calcio è molto alta e quindi serve energia affinché avvenga la dissociazione.

1.5.3 SERCA: LA SVOLTA FARMACOLOGICA

Non è molto tempo che la SERCA viene studiata come possibile target farmacologico. È stata la scoperta che l'inibizione di questa proteina porta all'innesco del processo apoptodico, a indirizzare la ricerca su questa strada. In particolare la SERCA sembrerebbe un ottimo target, a dispetto di altri, per la cura del cancro alla prostata. Si tratta, infatti, di un tipo di tumore, che presenta un basso tasso di proliferazione da

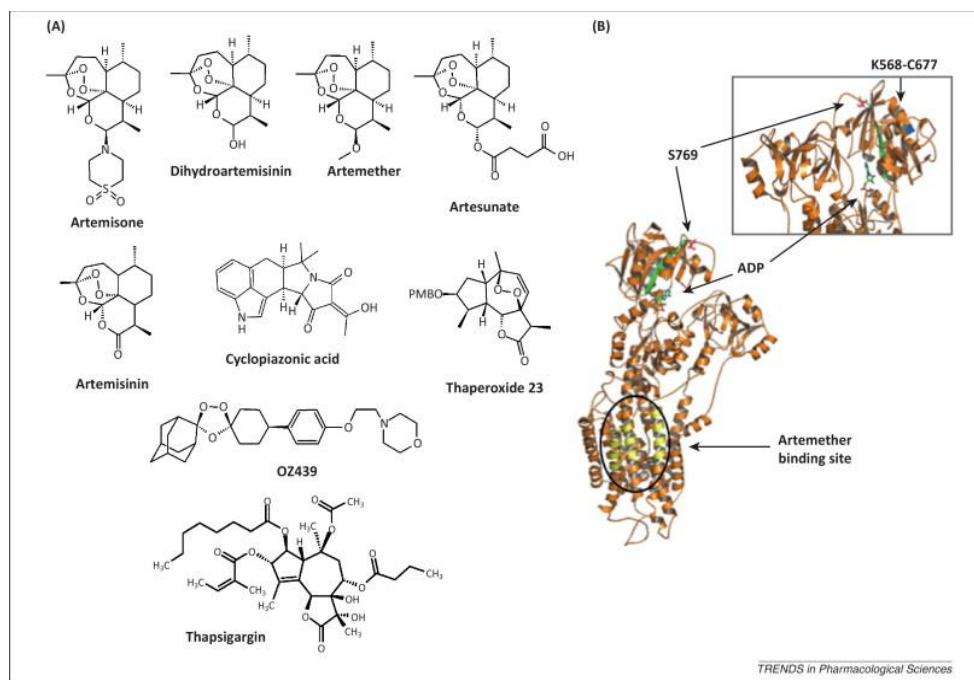


Figura 1.7. Rappresentazione di vari inibitori per SERCA. A destra struttura della SERCA con ingrandimento della parte citosolica. S. Krishna, S. Pulcini, C. M. Moore, B. H.-Y. Teo, H. M. Staines; "Pumped up: reflections on PfATP6 as the target for artemisinins"; Trends in Pharmacological Sciences (2014), Vol. 35 n°1.

parte delle cellule malate, caratteristica questa molto insolita. Ciò rende inefficaci le normali chemioterapie anti-proliferazione usate nelle cure per gli altri tumori. Una via alternativa di cura si potrebbe quindi identificare con un percorso specifico, che permetta di individuare un requisito per la sopravvivenza esclusivamente proprio delle cellule tumorali della prostata. Un modo efficace potrebbe essere quello di inibire la Ca^{2+} -ATPasi delle cellule tumorali^[4], ma usare, per esempio, la tapsigargina significherebbe colpire tutte le Ca^{2+} -ATPasi poste in tutte le cellule. Quindi il problema è piuttosto complicato. In uno studio incrociato tra ricercatori di alcune università statunitensi e danesi è stato presentato lo sviluppo di un pro-farmaco chiamato G202.

Il G202 consiste di PSMA (carboxypeptidase prostate-specific membrane antigen), una glicoproteina iper-espressa nelle cellule tumorali della prostata, accoppiato con la tapsigargina^[5]. Il meccanismo di azione del G202 con la membrana delle cellule tumorali è piuttosto complesso e protetto da brevetto. Comunque si può dire che questo pro-farmaco riconosce solo l'antigene specifico e quindi si ha, poi, un'interazione della tapsigargina solo con la Ca^{2+} -ATPasi delle cellule tumorali. Questo tipo di approccio è molto interessante e promettente.

La SERCA sembra dimostrarsi importante anche per trovare cure alternative per il cancro ai polmoni dove i normali trattamenti anti-tumorali falliscono. Infatti tra cellule epiteliali bronchiali normali e cellule malate è stata riscontrata una minore espressione di SERCA nel reticolo sarcoplasmatico. Questa differenza tra cellule sane e malate potrebbe, così, rappresentare un buon target per la cura di questa malattia perché garantirebbe l'auspicabile possibilità di poter colpire le cellule tumorali salvando in larga parte quelle sane^[6]. Altri studi hanno appurato che la SERCA è protagonista nell'attività cardiaca. Essa, attraverso la modulazione tramite il fosfolambano, regola il trasporto di Ca^{2+} controllando così la contrazione e il rilassamento del muscolo cardiaco. Lo scompenso cardiaco e l'ipertrofia cardiaca sono dovuti ad un difetto nell'assorbimento di Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico. Lo studio di una cura efficace a queste malattie è riposta nella ricerca di composti che destabilizzino l'interazione tra fosfolambano e SERCA^[7]. L'ultimo esempio che riporto, per rendere l'idea di quanto lo studio della SERCA risulti essere importante nella cura di malattie, anche molto diverse tra loro, è la scoperta che l'artemisinina (il principale farmaco antimalarico) agisca proprio inibendo le SERCA del Plasmodium falciparum, un protozoo parassita che causa la malaria nell'uomo^[8].

Data l'importanza acquisita nel tempo dalla SERCA come target farmacologico, sono stati individuati via via diversi inibitori (fig. 1.7) come ad esempio la tapsigargina, l'acido ciclopiazonico e il 2,5-di-(t-butil)-diidrossibenzene [tabella I]^[1,9]. A causa del suo forte potere inibente, la tapsigargina, è anche molto tossica, tuttavia sono stati studiati alcuni suoi derivati che costituiscono una buona promessa per il futuro dei farmaci antitumorali. La tapsigargina interagisce con tutte le reazioni parziali descritte in precedenza (par. 1.5.2), e induce la stabilizzazione dell'enzima nella forma E2, quella con minore affinità per gli ioni calcio, legandosi in una posizione intermedia tra i residui all'interno della membrana e la parte citosolica^[1].

Gli inibitori della SERCA non agiscono tutti nello stesso modo e non hanno lo stesso sito di legame. Si può fare una prima distinzione tra le molecole che stabilizzano la SERCA nella conformazione E2 e quelli che la stabilizzano nella conformazione E1^[9]. Per riassumere in breve e in modo abbastanza esaustivo le caratteristiche di alcuni inibitori per la SERCA si riporta una tabella tratta dalla rivista "Biochemical Society Transactions"^[9], dove si riportano le costanti di inibizione.

Tabella I

Table 1 Potencies and conformational effects of some SERCA inhibitors

Inhibitor	K_i or IC_{50}	E1-like or E2-like conformation
Thapsigargin	0.21–12 nM	E2
Cyclopiazonic acid	90–2500 nM	E2
BHQ	2–7 μ M	E2
Nonylphenol	6 μ M	E2
Bisphenol	2 μ M	E2
Bisphenol A	233 μ M	E2?
TBBPA	0.5–2.3 μ M	E2
4-Chloro- <i>m</i> -cresol	2.8 mM	?
Orthovanadate	10–100 μ M	E2
Quercetin	9 μ M	E1
3,6-Dihydroxyflavone	6 μ M	E1
Galangin	9 μ M	E1
2APB	70–700 μ M	E1
Curcumin	7–15 μ M	E1
Paxilline	5 μ M	E1
Alisol B	27 μ M	E2
Mastoparan	1 μ M	E1
Ivermectin	15 μ M	E1
Cyclosporin A	62 μ M	?
Rapamycin	77 μ M	?
Chlorpromazine	23 μ M	E1
Calmidazolium	0.5 μ M	E1
Fluphenazine	15 μ M	E1
DES	20 μ M	?
1,3-Dibromo-2,4,6-tris(methylisothiuronium)benzene (Br ₂ -TITU)	29 μ M	E1

1.6 LO IONE Ca²⁺ E LA VITA

I meccanismi vitali di ogni organismo sono sempre molto complessi e dipendono da una fitta rete di reazioni tra miriadi di molecole diverse, non c'è dubbio però, che gli ioni calcio giochino un ruolo fondamentale nella vita delle cellule, della quale, esse sono i mattoni.

Tra i processi regolati dal calcio i più importanti sono: la contrazione muscolare, la trasmissione sinaptica, la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Per questi processi e per altri ancora è di vitale importanza che la concentrazione di calcio sia precisamente controllata all'interno di un organismo. Nel corpo umano i livelli di Ca²⁺ extracellulare sono dell'ordine di 1,2 mM e all'interno del citosol di circa 100 nM^[10]. All'interno della cellula si instaura un altro gradiente di calcio tra citosol e reticolo sarcoplasmatico o endoplasmatico che sia, attraverso le Ca²⁺-ATPasi (SERCA nel caso di reticolo sarcoplasmatico), che portano il Ca²⁺ all'interno del reticolo dove la concentrazione di questi ioni raggiunge livelli molto più elevati che nel citosol. Il reticolo funziona da serbatoio di ioni Ca²⁺ e lo rilascia di nuovo nel citoplasma quando necessario. Tra l'altro un'alterazione dell'omeostasi del calcio è implicata nella tumorigenesi e nella progressione tumorale^[4,6,10]. Ci sono tre classi di proteine direttamente coinvolte nell'omeostasi di questo ione: i canali, le ATPasi e gli scambiatori. I canali, come le ATPasi sono sfruttati come target per farmaci antitumorali. Nel tempo è stato scoperto che un'espressione alterata di queste proteine è ricorrente e molto comune nelle cellule tumorali. Per esempio un aumento

dell'espressione di queste proteine di membrana, come le PMCA, fa aumentare il flusso di Ca^{2+} verso il citosol, stimolando l'attività proliferativa della cellula, oppure, un aumento dell'espressione delle SERCA fa aumentare l'assorbimento di calcio nel reticolo sarcoplasmatico, conferendo una resistenza all'apoptosi. Addirittura anche una localizzazione aberrante delle proteine che si occupano del trasporto del calcio basta a modificare il delicato equilibrio di questo ione e a portare, quindi, ad un conseguente tumore^[10,12].

A far pensare che queste proteine possano essere ottimi target farmacologici è soprattutto la loro partecipazione ai processi di proliferazione e apoptosi, in modo particolare a quest'ultima.

L'apoptosi è definita come morte cellulare programmata. A differenza della necrosi, che è la morte cellulare come conseguenza ad un trauma, l'apoptosi è un processo di morte cellulare controllato geneticamente^[11]. Il processo apoptodico, come detto, è legato alla concentrazione di Ca^{2+} e, siccome è uno dei tantissimi processi legati a questo ione, come è facile immaginare, si instaura attraverso un controllo plurimo di molecole che interagiscono in modo diretto e indiretto con i trasportatori di Ca^{2+} , stimolando o inibendo la loro attività. Come se non bastasse non c'è un unico percorso di innesco dell'apoptosi^[4,10-12]. Comunque sia la stimolazione delle proteine del reticolo endoplasmatico o sarcoplasmatico ad un maggior rilascio di Ca^{2+} nel citosol ha come conseguenza l'aumento della concentrazione dell'ione nei mitocondri, e ciò dà il via all'apoptosi^[10,12]. Il dubbio che potrebbe sorgere è quello di come possa essere possibile riuscire a sfruttare l'apoptosi per colpire selettivamente le cellule tumorali. La risposta chiave sta nel fatto che nelle cellule tumorali si riscontra spesso un'alterazione delle proteine che si occupano dell'omeostasi del calcio. Questo fa sì che, mentre nelle cellule normali i processi derivanti da una modifica dell'equilibrio di Ca^{2+} possono seguire percorsi multipli, nelle cellule tumorali ciò non è così. In questo modo, trattando le cellule normali e malate con l'inibitore di uno specifico percorso, vengono uccise soltanto le cellule tumorali che hanno solamente quella strada o poco più per sopravvivere. Quindi se la cellula tumorale, come spesso accade, ha solamente la possibilità di sfruttare l'attività della SERCA per controllare la concentrazione di calcio all'interno dei mitocondri, e poche altre, inibendo questa proteina si è sicuri di innescare con maggiore efficacia il processo di apoptosi nelle cellule tumorali^[4-6,8,10].

1.7 UNA NUOVA SCOPERTA

Il cisplatino (cis-diamminodichloroplatino) è il composto più usato ed efficace nella cura dei tumori. Esso viene usato perché si lega al DNA delle cellule impedendone la replicazione e quindi anche la divisione cellulare. Siccome le cellule tumorali hanno come peculiarità quella di avere un'attività molto più frenetica rispetto alle cellule normali, la somministrazione del cis-platino colpisce per lo più le cellule malate perché sono loro ad assorbire la maggior parte delle sostanze esterne. Quando è al di fuori del citoplasma questo tipo di composto è relativamente poco reattivo per l'alta concentrazione di cloro nei vasi sanguigni, mentre la sua attività è favorita nel citosol per la bassa concentrazione di cloro al suo interno. Questo farmaco mostra un'attività clinica contro una discreta varietà di tumori maligni come alle ovaie, ai testicoli, alla testa e al collo dell'utero, ai polmoni, alla vescica e allo stomaco^[14,17-21]. A volte il cis-platino è anche usato in combinazione con altri agenti citotossici e/o radiazioni terapeutiche^[18]. Ad oggi sono stati approvati tre farmaci di platino per usi clinici e cioè il cis-platino, il carboplatino e l'ossaliplatino. Il meccanismo di citotossicità del cis-

platino è ben noto, ma il problema legato a questo tipo di farmaco è lo sviluppo di una certa resistenza alla terapia prolungata nel tempo. Infatti sono stati fatti vari studi per trovare come le cellule riescano a ridurre l'influsso e/o ad aumentare il deflusso del farmaco attraverso la membrana, proteggendosi dal suo effetto dannoso per il DNA. Questo tipo di studi, stanno riportando le prove dell'interazione del cis-platino con alcune proteine di membrana. Ricontrando una sovrapproduzione della Cu-ATPasi ATP7B nelle cellule resistenti del carcinoma alle ovaie, si era pensato all'interazione tra cis-platino e questo tipo di proteina, ipotizzando che questa potesse trasportare in modo attivo il farmaco al di fuori della cellula^[20]. Immediati studi successivi hanno confermato il legame tra ATP7B e cis-platino, ma si ponevano in contrasto con l'idea di un trasporto attivo da parte di questa proteina. Infatti, un'inattivazione dell'ATP7B non aumentava in alcun modo la sensibilità cellulare al cis-platino. Dallo studio risulta che i siti di legame con il rame della Cu-ATPasi sono distinti da quelli che interagiscono con il cis-platino e che questo induce l'intermedio catalitico fosforilato, non cambiando quasi in alcun modo l'attività della proteina^[19]. In altri studi il trasporto di cis-platino per mezzo dell'ATP7B era stato dimostrato^[20], ma soltanto ad un pH 4,6, ben lontano da quello fisiologico, quindi non si può indicare questo trasporto come determinante per la resistenza delle cellule. Il collegamento tra questa sovra-espressione dell'ATP7B e resistenza al farmaco nelle cellule è stata così ricondotta ad una diminuzione della concentrazione di rame nella cellula^[19].

In anni successivi a questi lavori sono stati fatti vari studi sull'interazione del cis-platino con le sostanze all'interno della cellula, tanto da mettere in discussione che la sua capacità di danneggiamento del DNA cellulare fosse la ragione primaria nell'indurre la morte cellulare. Infatti, si è notato che solo una piccola quantità di platino cellulare (<1%) si lega al DNA nucleare ed esiste una scarsa correlazione tra la sensibilità delle cellule alla morte cellulare indotta da cisplatino e il grado di platinazione del DNA. Diversi studi suggeriscono che il DNA mitocondriale, o altri obiettivi mitocondriali, sono forse più importanti del danno al DNA nucleare, nel portare alla morte cellulare indotta da cisplatino. Un danno al DNA mitocondriale potrebbe essere più micidiale per la vita della cellula rispetto ad un danneggiamento al DNA nucleare perché il primo ha una minore capacità di riparazione. Inoltre si è scoperto che il cis-platino interagisce direttamente con i meccanismi di apoptosi, attivando alcuni responsabili di questo fenomeno, come le caspasi e il rilascio di citocromo c^[21].

Un'altra scoperta significativa è stata fatta ricercando le ragioni della nefrotossicità di questo farmaco. Per l'attività del rene il gradiente di Na⁺ è sfruttato per il trasporto secondario di molte molecole come glucosio, Ca²⁺, e H⁺, e la Na,K-ATPasi riveste un ruolo centrale per le funzioni di questo organo. Si è verificato, così, se il cis-platino potesse inibire la Na,K-ATPasi, e quindi causare il danneggiamento del rene. È stata ottenuta un'inibizione del 50% della Na,K-ATPasi in condizioni di saturazione (1:4 proteina:cisplatino)^[14]. Studi appena successivi dimostrano che la Na,K-ATPasi è, insieme ai trasportatori del rame, un'altra proteina che permette l'influsso del cis-platino all'interno della cellula, oltre ad essere inibita da questo farmaco della sua naturale attività^[17].

Tenuto conto di questi dati di letteratura il nostro laboratorio ha iniziato uno screening sull'interazione di molecole antitumorali con la SERCA. In un lavoro pubblicato poco fa (agosto 2014) si sono studiati nuovi composti antitumorali a base di rutenio e si è studiata anche un'isoforma del cisplatino (cis-diammino-dicloro-platino(II)), molto usata nella lotta contro il cancro^[13].

I composti antitumorali a base di rutenio sono indicati con le sigle KP1019, indizolium

trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]; NAMI-A, (imH[*trans*-RuCl₄(dmsos)(im)] e RAPTA-C, [Ru(η⁶-arene)Cl₂(pta). Tra questi, il composto più efficace per l'inibizione della proteina, si è dimostrato il KP1019, ed è stata calcolata una costante di semi inibizione (IC₅₀) pari a 1.0 ± 0.1 μM. Da questo stesso studio è anche emerso che probabilmente il KP1019 legandosi alla SERCA vada ad occupare dei siti nella regione trans-membranale della proteina, impedendole di trasferire i due ioni Ca²⁺ all'interno della membrana. Inoltre è stato visto che il *cis*-diammino-dicloro-platino(II) non ha una sostanziale capacità di inibizione della SERCA. Nell'ambito di questi studi abbiamo, pertanto, concentrato il nostro interesse allo studio di una particolare isoforma di un complesso del platino il *cis*-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]. L'interazione tra la SERCA e questa particolare molecola di *cis*-platino si è rivelata estremamente interessante e, quindi, abbiamo esaminato, in dettaglio, questa interazione.

Capitolo 2
Materiali e Metodi

2.1 PRODOTTI CHIMICI

- MOPS: $P_m = 209,26$ g/mol, purezza 95%, SIGMA ALDRICH, utilizzata una soluzione stock 0,5 M;
- KCl: $P_m = 74,55$ g/mol, purezza 99,5%, MERK;
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$: $P_m = 203,30$ g/mol, purezza 99%, MERK, utilizzata una soluzione stock 0,5 M;
- $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$: $P_m = 147,02$ g/mol, purezza 99,5%, MERK, utilizzate due soluzioni stock, 0,5 M e 0,05 M in H_2O ;
- EGTA (Ethylene Glycol-Bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid): $P_m = 380,4$ g/mol, purezza 97%, SIGMA ALDRICH, utilizzata una soluzione stock 0,1M;
- KOH: $P_m = 55,11$ g/mol, purezza 85,0%, MERK.
- ATP (Adenosina-5-trifosfato- sale disodico idrato): $P_m = 551,15$ g/mol (+ H_2O), purezza $\geq 95\%$, FLUKA, utilizzata una soluzione stock 100mM in H_2O ;
- Ottadecantiolo ($C_{18}SH$): 286,57 g/mol, utilizzata una soluzione stock 1mM in 2-propanolo;
- 1,2-Diphytanoil-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Choline] (DPPC): $P_m = 870,17$ g/mol, prodotto conservato in una soluzione 10 mg/ml in $CHCl_3$, AVANTI POLAR LIPIDS, utilizzata una soluzione stock 7,5 mg/ml in decano;
- A23187 (calcimicina, ionoforo): $P_m = 523,62$ g/mol, utilizzata una soluzione stock 10 μM in DMSO;
- SERCA1a: sospensione di vescicole native di reticolo sarcoplasmatico in soluzione tampone (MOPS 10 mM, saccarosio 30%, pH = 7 in H_2O), contenente 8,4 mg/ml di proteina, SERCA presente per circa il 50% dell'ammontare totale di proteina, utilizzate aliquote stock da 20 μL ciascuna;
- Tapsigargina (TG): 650,75 g/mol, utilizzata una soluzione stock 200 μM in etanolo;
- Cis-platino (cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]): $P_m = 343,1$ g/mol, utilizzata una soluzione stock 1mM in H_2O ;
- L-Glutathione reduced (GSH): $P_m = 307,3$ g/mol, SIGMA ALDRICH;
- Ditiotreitolo (DTT): $P_m = 154,25$ g/mol, SIGMA ALDRICH.

Composizione del buffer di lavoro:

- KCl: 100 mM;
- MOPS: 25 mM;
- $MgCl_2$: 1 mM;
- $CaCl_2$: 0,25 mM;
- EGTA: 0,25 mM;
- $[Ca^{2+}]_{libero} = 10 \mu M$
- pH = 7 (soluzione portata a pH = 7 con KOH).

Il composto Cis-platino è stato fornito dal Prof. Fabio Arnesano e Prof. Giovanni Natile del Dipartimento di Chimica dell'Università di Bari "Aldo Moro".

La SERCA1a è stata ottenuta con un protocollo che prevede l'estrazione della proteina dal muscolo scheletrico veloce delle zampe posteriori di un coniglio di razza New Zealand White^[22]. È stato utilizzato il metodo di Lowry^[23] per determinarne la quantità nelle vescicole.

2.2 MODELLO SPERIMENTALE DI MEMBRANA BIOLOGICA: SOLID SUPPORTED MEMBRANE (SSM)

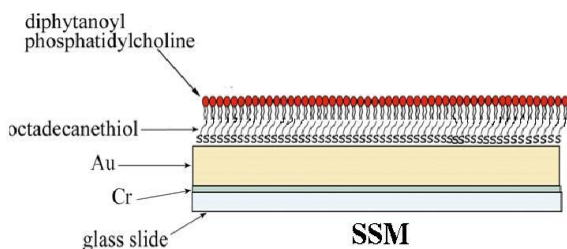


Figura 2.1. SSM: modello sperimentale di membrana biologica. <http://www.bioelectrolab.unifi.it> .

membrana, rende possibile l'analisi di un gran numero di proteine di membrana che possono essere immobilizzate sull'elettrodo con un procedimento semplice e spontaneo.

L'SSM si compone di vari strati (fig.2.1). Una lamina d'oro è posta su un supporto di vetro ricoperto di cromo per far aderire bene l'oro. L'elettrodo d'oro, così costruito, viene fatto incubare in una soluzione (50 μ l) di ottadecantiolo 1 mM in 2-propanolo per circa 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo il periodo di incubazione si sciacqua bene con acqua ultrapura per eliminare l'alcanthiolo che non ha aderito alla lamina d'oro. L'elettrodo viene poi asciugato con un flusso di N_2 . Quest'ultima operazione è molto importante perché anche la minima traccia di umidità non permetterebbe una buona formazione del bistrato. La formazione del bistrato viene quindi ultimata depositando alla superficie dell'elettrodo 3,5 μ l di 1,2-Diphytanoil-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Choline] (DPPC), un fosfolipide a doppia catena, da una soluzione 7,5 mg/ml in decano, e subito dopo 50 μ l del buffer di lavoro. Si lascia l'elettrodo a temperatura ambiente per circa 4h. Si forma così un bistrato ibrido alcanthiolo/fosfolipide su oro attraverso un processo di auto-organizzazione (self-

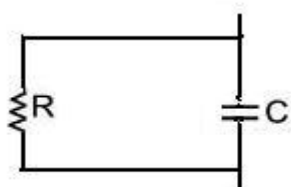


Figura 2.3. Circuito RC con resistenza e condensatore posti in parallelo.

Questo modello sperimentale di membrana biologica è usato, fra l'altro, per la caratterizzazione funzionale di pompe ioniche e trasportatori^[24]. In questa tecnica vengono fatti adsorbire su un bistrato ibrido alcanthiolo/fosfolipide, supportato da un elettrodo d'oro, frammenti o vescicole di membrana cellulare o anche proteoliposomi. L'adsorbimento sull'SSM di vescicole o frammenti di



Figura 2.2. Sensore. <http://www.bioelectrolab.unifi.it> .

assembly): le code alchiliche dell'alcanthiolo e quelle del fosfolipide interagiscono tra loro per formare un doppio strato, mentre le teste polari del fosfolipide vengono a contatto con la soluzione acquosa. Il bistrato ibrido che si ottiene è particolarmente robusto perché il monostrato di alcanthiolo si lega all'oro con un legame covalente.

Da un punto di vista elettrico l'SSM si può schematizzare con un circuito elettrico equivalente RC (fig. 2.3) costituito da una

resistenza e un condensatore posti in parallelo. Se il bistrato su oro è stato ben realizzato i valori di capacità sono compresi tra 10 e 30 nF, e quelli di conduttanza ($G=1/R$) tra 0,5 e 4 nS. Essendo la superficie dell'elettrodo d'oro pari a 7 mm², la capacità dell'SSM varia quindi tra 0,2 e 0,4 µF/cm² e la conduttanza tra 7 e 57 nS/cm². Per verificare che i valori di capacità e conduttanza rientrino nei limiti sopra indicati, si effettua una misura di C e G, applicando una differenza di potenziale di forma triangolare di ampiezza pari a ± 50 mV.

Pertanto si ottiene un voltammogramma di forma rettangolare e, dalla differenza tra i due valori limite di corrente misurata, si deduce il valore della capacità dalla seguente espressione:

$$\Delta i = 2 \cdot C \cdot v \quad (2.1)$$

dove C è la capacità e v la velocità di scansione dV/dt, dove V è il potenziale ai capi del condensatore. Il valore della resistenza, e quindi della conduttanza associata al bistrato ibrido, si determina applicando al bistrato una differenza di potenziale elettrico nota e costante (+100 mV); tramite il fitting del decadimento della corrente è possibile ottenere una stima della conduttanza dell'SSM^[25].

L'ultima operazione, prima di adsorbire la proteina sull'SSM, è di misurare la corrente di off-set, che deve essere pari a zero, e di verificare che non siano presenti artefatti di natura elettrica. Ciò viene valutato attraverso scambi del solo buffer di lavoro in prossimità dell'SSM. Si raccolgono più misure e si mediano tra loro: il risultato di questa operazione è considerato come bianco. Se non sono presenti artefatti di tipo elettrico o irregolarità sulla linea di base e se la corrente di off-set è prossima al valore zero, è possibile procedere con l'esperimento.

L'adsorbimento della proteina sull'SSM viene realizzato nel modo seguente. Si

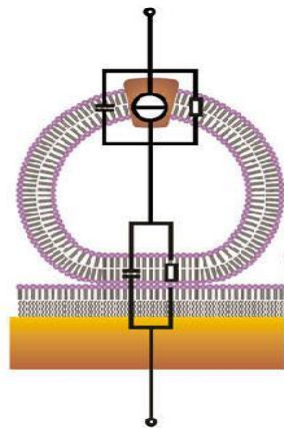


Figura 2.4. Rappresentazione schematica di una vescicola adsorbita su SSM e relativo circuito elettrico. Modificata P. Schulz, J. J. Garcia-Celma, K. Fendler; "SSM-based electrophysiology"; Methods 46 (2008), 97–103.

prelevano 20 µl di una sospensione di vescicole contenenti SERCA alla concentrazione 4,2 mg/ml. A questa aliquota si aggiungono poi 16 µl della soluzione tampone e 4 µl dello ionoforo A23187 dallo stock a concentrazione 10 µM. La sospensione di vescicole viene quindi sottoposta a sonicazione per 1 minuto in modo da separare eventuali aggregati formati dalle vescicole. Infine si deposita la sospensione sull'elettrodo d'oro tramite una pipetta Eppendorf, e si attende circa un'ora a temperatura ambiente per l'adsorbimento delle vescicole alla superficie dell'SSM. Le vescicole contenenti la SERCA si adsorbono sull'SSM grazie ad

interazioni di tipo elettrostatico tra le teste polari dei fosfolipidi del bistrato ibrido (SSM) e quelle dei fosfolipidi delle vescicole del reticolo sarcoplasmatico. Con la presenza delle vescicole sull'SSM il circuito elettrico equivalente si modifica: si aggiunge al circuito RC (fig 2.3) un'altra maglia costituita anch'essa da un analogo circuito RC (fig. 2.4).

2.3 LO STRUMENTO SURFE^{2R}One

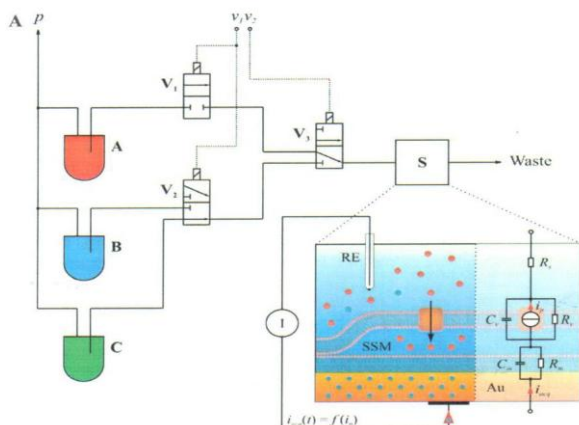


Figura 2.5. Schema del sistema di valvole e contenitori dell'unità analitica del SURFE^{2R}One. B. Kelety, K. Diekert, J. Tobien, N. Watzke, W. Dörner, P. Obrdlik, K. Fendler; "Transporter assays using solid supported membranes: a novel screening platform for drug discovery"; *ASSAY and Drug Development Technologies* 4 (2006).

sistema di valvole elettromagnetiche (fig. 2.5). La cella elettrochimica (fig.2.6) è costruita con plexiglass ed è in grado di ospitare un elettrodo di riferimento la cui composizione è coperta da brevetto, e l'elettrodo d'oro su cui è formato l'SSM, che funziona da elettrodo di lavoro e può essere inserito e disinserto dalla cella con facilità. Tramite l'apertura o la chiusura delle valvole è possibile scambiare rapidamente, nella cella, le soluzioni provenienti dai tre contenitori, e quindi realizzare salti di concentrazione di un determinato substrato alla superficie dell'SSM. La cella con l'elettrodo, per le misure di corrente capacitiva, è inserita all'interno dello strumento che funziona da gabbia di Faraday per diminuire al minimo il rumore elettrico di fondo dell'ambiente circostante. In condizioni di lavoro ottimali, il rumore elettrico è compreso tra 10 e 20 pA. Le funzioni dello strumento possono essere tutte controllate ed eseguite direttamente dal PC grazie all'installazione dell'apposito software, fornito sempre dalla IonGate.

Il SURFE^{2R}One (fig.2.5) è stato prodotto dalla ditta IonGate Biosciences di Francoforte, Germania. Lo strumento si compone di diverse parti: l'alimentatore che fornisce energia al sistema, l'unità analitica, che contiene la cella elettrochimica ed è direttamente collegata al PC, ed un auto campionatore anch'esso collegato direttamente al PC e all'alimentatore, che ha la funzione di ricaricare i contenitori (A,B,C in figura 2.5) con le soluzioni di lavoro. I flussi delle soluzioni, all'interno dello strumento, sono regolati da un



Figura 2.6. Cella elettrochimica.
<http://www.bioelectrolab.unifi.it>

2.4 METODO DEL SALTO DI CONCENTRAZIONE

Il metodo utilizzato in questi esperimenti è stato quello del salto di concentrazione, che si realizza scambiando velocemente alla superficie dell'SSM una soluzione non attivante con una attivante contenente il substrato, nel nostro caso ATP. La sequenza utilizzata con lo strumento SURFE^{2R}One è denominata "Jump ATP". Nel protocollo standard viene fatta fluire in cella la soluzione non attivante costituita dal buffer di lavoro, per 1 secondo, quindi si immette in cella la soluzione attivante (2 secondi). La soluzione attivante è costituita dal buffer di lavoro con l'aggiunta di ATP 100 μ M. Lo

scambio tra soluzione non attivante e soluzione attivante determina il salto di concentrazione del substrato ATP alla superficie dell'SSM. In seguito al salto di ATP, le proteine adsorbite su SSM si attivano e generano una corrente elettrica (flusso di ioni Ca^{2+} verso l'interno della vescicola), che viene registrata dallo strumento come transiente di corrente capacitiva. Si rimuove infine la soluzione attivante dalla cella

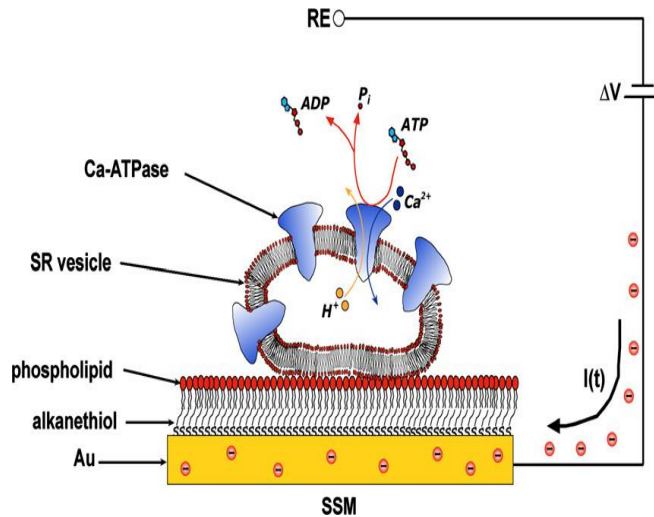


Figura 2.7. Rappresentazione schematica di una vescicola contenente SERCA adsorbita su SSM e soggetta ad un salto di concentrazione di ATP. In condizioni potenziostatiche l'accumolo di ioni Ca^{2+} all'interno della vescicola è compensata da un flusso di elettroni verso l'elettrodo d'oro. F. Tadini-Buoninsegni, G. Bartolommei, M. R. Moncelli, K. Fendler; "Charge transfer in P-type ATPases investigated on planar membranes"; Archives of Biochemistry and Biophysics 476 (2008), 75–86.

quello di riferimento. In condizioni potenziostatiche l'accumolo di ioni di carica positiva (ioni Ca^{2+}), trasportati dalla proteina all'interno della vescicola, viene compensato da un flusso di elettroni lungo il circuito esterno verso l'elettrodo d'oro (fig. 2.7). Tale flusso di elettroni costituisce il transiente di corrente capacitiva misurato sperimentalmente.

con la soluzione non attivante (2 secondi) in modo da riportare la proteina in uno stato di riposo prima di effettuare un nuovo salto di concentrazione. Prima di ripetere la misura si attende, infatti, un tempo di 200 s, tempo necessario affinché tutti gli ioni Ca^{2+} accumulati all'interno delle vescicole, durante l'attività della SERCA, fuoriescano annullando il gradiente di concentrazione formatosi. Questo tempo di attesa garantisce che vengano ripristinate le condizioni iniziali prima di ogni misura, e ciò garantisce elevata riproducibilità. La misura del transiente di corrente avviene in condizioni potenziostatiche, cioè mantenendo una differenza di potenziale costante tra l'elettrodo d'oro e

Capitolo 3
Risultati e Discussione

3.1 OBIETTIVO

Durante questi esperimenti sono state fatte misure di tipo elettrico sulla Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico (SERCA), utilizzando lo strumento SURFE^{2R}ONE. Come primo esperimento è stata fatta una prova di inibizione con la tapsigargina e successivamente con $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})]$. Successivamente è stato analizzato l'effetto del $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})]$ in presenza di glutatione ridotto in soluzione. Infine è stato valutato l'effetto del cis-platino a varie concentrazioni per ricavarne la costante di semi-inibizione.

3.2 MISURA DEL TRANSIENTE DI CORRENTE^[26]

La misura del transiente di corrente viene effettuata in condizioni di pre-stazionarietà, ovvero in tempi più brevi rispetto al turnover della proteina, e sottoponendo il campione ad un salto di concentrazione del substrato attivante. Si osserva un transiente di corrente capacitiva quando uno o più stati elettrogenici sono coinvolti nel rilassamento che segue l'attivazione della proteina. Questo transiente di corrente capacitiva è descritto da un'equazione di decadimento esponenziale:

$$y(x) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-x/\tau_i} + b. \quad (3.1)$$

L'andamento esponenziale della corrente capacitiva è quello classico che assume nei circuiti RC. A_i e τ_i sono rispettivamente l'ampiezza del segnale e la costante di tempo dello stadio i -esimo, n il numero totale di stadi elettrogenici.

Risolvendo il circuito equivalente per lo specifico sistema utilizzato in questi esperimenti, l'espressione della corrente misurata è:

$$I(t) = \frac{C_f}{C_f + C_p} \left(\sum_{i=1}^{n-1} a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} + a_0 e^{-k_0 t} + b \right) \quad (3.2)$$

con

$$k_0 = \frac{G_f + G_p}{C_f + C_p} = \tau_0^{-1} \quad (3.3)$$

dove C_f e G_f sono rispettivamente la capacità e la conduttanza del bistrato lipidico (SSM), e C_p e G_p la capacità e la conduttanza della membrana che contiene la proteina.

La relazione tra corrente misurata, che si è descritto, e la corrente generata dalla proteina è piuttosto semplice se si considerano tempi brevi, e cioè se $t \ll \tau_I$ dove $\tau_I = \frac{C_f + C_p}{C_p}$. La relazione tra corrente prodotta dalla proteina (I_p) e quella misurata (I) è:

$$I_p(t) = \left(1 + \frac{C_p}{C_f} \right) I(t) \quad (3.4)$$

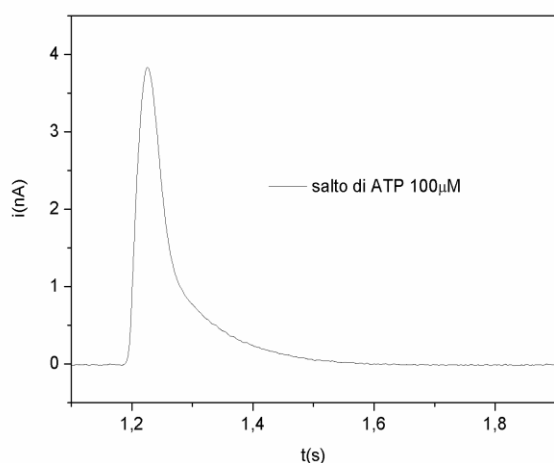


Figura 3.1. Transiente di corrente capacitiva della SERCA.

Ca^{2+} , ma soltanto che non vi è più variazione nel tempo della differenza di potenziale attraverso la membrana che contiene la proteina. Ciò avviene quando la proteina raggiunge il turnover e il flusso di ioni calcio verso l'interno delle vescicole che contengono la SERCA è bilanciato dal flusso di ioni calcio che fuoriescono dalle vescicole, il quale è reso possibile dallo ionoforo calcimicina (A23187).

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

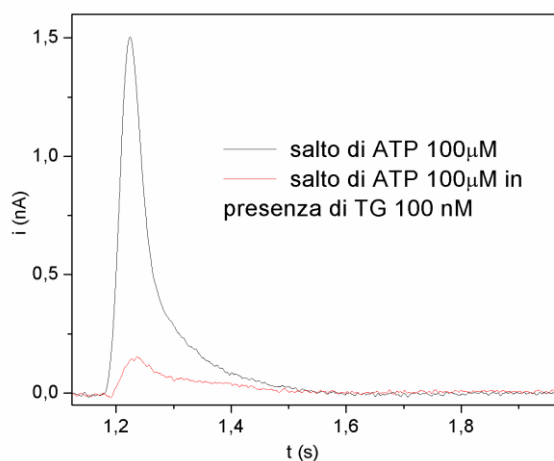


Figura 3.2. Transienti di corrente generati dalla SERCA dovuti ad un salto di concentrazione di ATP 100 μM . La linea grigia indica il transiente ottenuto in assenza di tapsigargina, mentre quella rossa indica il transiente ottenuto con una concentrazione di tapsigargina 100 nM. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libero}} \approx 0$, $\text{pH} = 7$.

salto di concentrazione di ATP 100 μM ed abbiamo registrato il transiente di corrente (linea grigia di fig. 3.2). La proteina è stata, quindi, incubata con una soluzione

In figura 3.1 è illustrato il transiente di corrente capacitiva generato dalla proteina SERCA. La soluzione non attivante ha la seguente composizione: KCl 100mM; MOPS 25mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 0,25mM; EGTA 0,25 mM; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libero}} = 10 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 7$. La soluzione attivante ha la stessa composizione e in aggiunta contiene ATP 100 μM . Il decadimento fino a zero del segnale non significa che la proteina cessa la sua attività di trasporto di ioni

La capacità di inibizione della tapsigargina (TG) nei confronti della SERCA è molto elevata, ben nota e descritta in letteratura^[1-5,9,10]. Infatti la costante di semi-inibizione è inferiore al nano molare. Abbiamo quindi usato la TG per un confronto con i dati relativi al composto $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})]$. In figura 3.2 sono illustrati i risultati ottenuti. I transienti di corrente riportati sono quelli prodotti dalla SERCA a seguito di un salto di ATP 100 μM in assenza (linea grigia) e in presenza di tapsigargina a concentrazione 100 nM (linea rossa). La proteina SERCA è stata inizialmente attivata con un

contenente taspigargina 100 nM in assenza di ioni Ca^{2+} per circa 10 minuti. Abbiamo poi ripetuto il salto di ATP 100 μM in presenza di TG 100 nM, ed abbiamo osservato che il transiente di corrente scompare quasi completamente, confermando così, il forte effetto inibitorio della taspigargina nei confronti della SERCA.

Abbiamo, quindi, fatto un'indagine preliminare dell'effetto del cis-platino sulla SERCA.

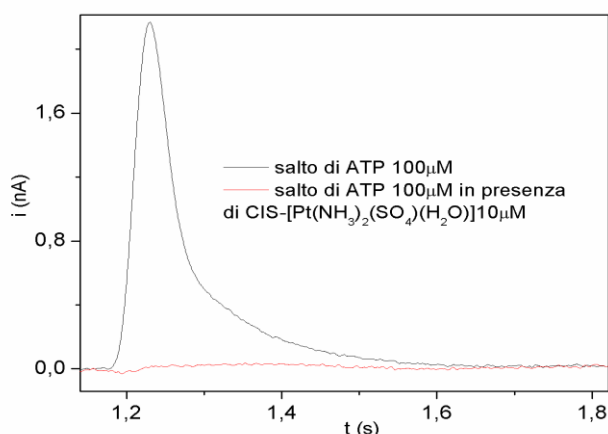


Figura 3.3. Transienti di corrente generati dalla SERCA dovuti ad un salto di concentrazione di ATP 100 μM . In assenza (linea grigia) e in presenza di una concentrazione di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] a concentrazione 10 μM (linea rossa). $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libero}} = 10 \mu\text{M}$, pH = 7.

In questo studio abbiamo poi verificato l'effetto del cis-platino in presenza di glutatione ridotto (GSH) e di ditione (DTT).

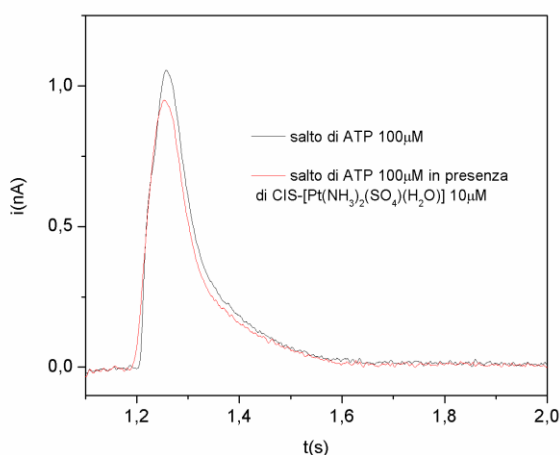


Figura 3.4 Transienti di corrente generati dalla SERCA dovuti ad un salto di concentrazione di ATP 100 μM . Questi sono stati ottenuti con la presenza nel buffer di GSH 1mM. La linea grigia indica il transiente ottenuto in assenza di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)], mentre quella rossa indica il transiente ottenuto con una concentrazione 10 μM di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libero}} = 10 \mu\text{M}$, pH = 7.

Nell'esperimento in presenza di GSH che, in condizioni fisiologiche, è presente nella cellula a concentrazione millimolare si vede che l'effetto del cis-platino è molto limitato. In figura 3.4 sono mostrati i transienti di corrente capacitiva ottenuti con una soluzione tampone contenente GSH 1 mM. Come si nota bene il segnale generato dalla SERCA in assenza di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] (linea grigia) o in presenza di una sua concentrazione 10 μM sono molto simili. Ciò vuol dire che in presenza di GSH a concentrazione 1mM il cis-

[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] non è in grado di inibire la SERCA. Il glutatione ridotto svolge pertanto un effetto protettivo sulla SERCA nei confronti dell'inibizione ad opera di cis-platino. Un simile effetto protettivo di specie a basso peso molecolare contenenti gruppi -SH è stato osservato in esperimenti di inibizione della Na, K-ATPasi e della SERCA con cis-platino^{[14][27]}.

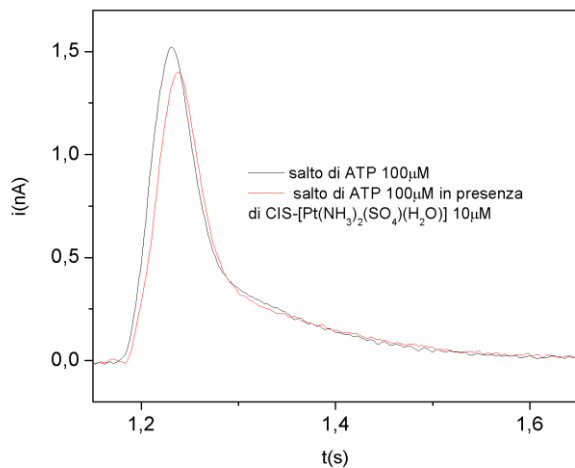


Figura 3.5. Transienti di corrente generati dalla SERCA dovuti ad un salto di concentrazione di ATP 100 µM. Questi sono stati ottenuti con la presenza nel buffer di DTT 1mM. La linea grigia indica il transiente ottenuto in assenza di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)], mentre quella rossa indica il transiente ottenuto con una concentrazione 10 µM di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]. [Ca²⁺]_{libero} = 10 µM, pH = 7.

10µM (fig.3.3), abbiamo studiato l'effetto del composto

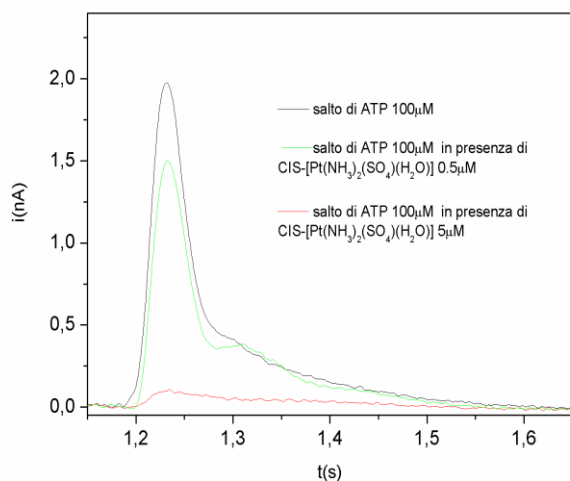


Figura 3.6. Transienti di corrente generati dalla SERCA dovuti ad un salto di concentrazione di ATP 100 µM. In assenza (linea grigia) e in presenza di varie concentrazioni di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]: 0,5 µM (linea verde) e 5 µM

Nell'esperimento con DTT 1 mM si vede che il cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] ha un effetto trascurabile sull'attività della proteina (fig. 3.5).

Questi esperimenti hanno confermato i dati di letteratura ottenuti con metodi diversi^[14-16]. Inoltre, nel nostro laboratorio, si era notato che il cis-diamminodichloroplatino non aveva un effetto rilevante sulla SERCA in presenza di DTT 1 mM nel buffer di lavoro^[13].

Visto il forte effetto inibitore sulla SERCA da parte del cis-platino a concentrazione a concentrazioni più basse.

La figura 3.6 illustra l'effetto di inibizione del cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] alle concentrazioni di 0,5 µM (linea verde) e 5 µM (linea rossa), in confronto al segnale ottenuto in assenza di cis-platino (linea grigia).

I transienti di corrente capacitiva sono stati misurati dopo un tempo di incubazione di 30 minuti ad ogni nuova concentrazione di cis-platino. Nella figura è ben visibile come l'intensità del segnale di corrente diminuisca con l'aumentare della concentrazione di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] usata.

Per determinare la costante di semi-inibizione (IC_{50}), che indica la concentrazione di inibitore necessaria affinché l'attività della proteina diminuisca del 50%, abbiamo fatto esperimenti a concentrazione di cis-platino da 0,05 a 20 μM .

Il valore IC_{50} può essere ricavato dalla curva di inibizione descritta in figura 3.5. Il grafico mostra l'andamento della carica normalizzata in funzione della concentrazione di cis-platino. La carica trasportata dalla proteina si ottiene dall'integrale del transiente

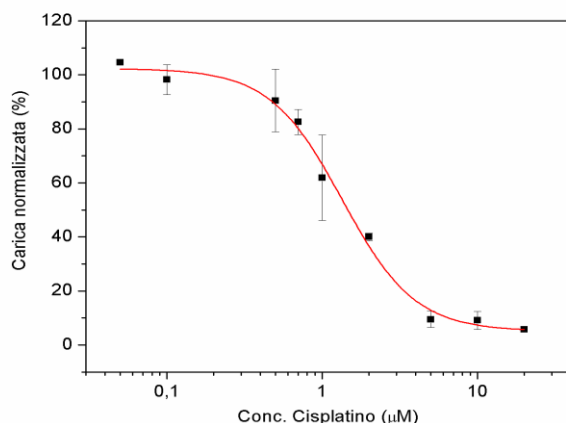


Figura 3.5. Curva di inibizione della SERCA in presenza di varie concentrazioni di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)]. $R^2 = 0.99426$, $IC_{50} = 1.3445 \pm 0.11342 \mu\text{M}$.

di corrente capacitiva (fig.3.1) che rappresenta la media di 5 misure fornite dallo strumento SURFE²R^{One}.

La normalizzazione della carica trasportata si effettua dividendo il valore dell'integrale del segnale di corrente, ottenuto ad una data concentrazione di cis-platino, per il valore dell'integrale del segnale di riferimento, ottenuto realizzando un salto di ATP 100 μM in assenza di cis-platino, sempre sullo stesso elettrodo. Per ogni diversa concentrazione di cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] sono

stati calcolati 2 o 3 valori di carica normalizzata, eccetto per le concentrazioni 0,05 μM e 20 μM , relative ad un singolo esperimento. In tabella II sono state riportate le medie dei valori di carica normalizzata risultanti da 2 o 3 misure alle varie concentrazioni di cis-platino, con annessi errori standard. Per quanto riguarda la costante di semi-inibizione, si è ottenuto un valore di: $IC_{50} = 1.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$. Per cui, alla luce di questo risultato si può dire che il cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] ha un'affinità molto elevata con la SERCA.

Tabella II

[cis-[Pt(NH ₃) ₂ (SO ₄)(H ₂ O)]] μM	Q (% di carica trasportata)	Errore standard
0,05	104,6	-
0,1	98,2	5,5
0,5	90,5	11,6
0,7	82,6	4,7
1	61,9	15,8
2	40,0	1,4
5	9,5	3,0
10	9,1	3,4
20	5,8	-

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata studiata l'interazione della SERCA con la tapsigargina (TG), che è un suo inibitore specifico e molto potente, e con il cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] (la specie monoidrata del cis-platino), un suo potenziale inibitore. La spiccata capacità di inibizione della SERCA da parte della tapsigargina, riconosciuta ampiamente in letteratura, è stata subito confermata notando un'inibizione praticamente completa già ad una concentrazione di TG sub-micromolare (100nM).

Procedendo con gli esperimenti di inibizione con il cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)], abbiamo osservato una notevole affinità di questa molecola con la SERCA. Infatti, come si può vedere dalla tabella II, si nota un'inibizione della carica trasportata dalla SERCA (10%) già ad una concentrazione di cis-platino di 0,5 μM.

Il valore della costante di semi-inibizione (IC₅₀) calcolato rende ben manifesto quello che si può evincere dai dati in tabella II. Dalle nostre misure si ricava un valore di IC₅₀ per il cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] pari a 1,3 μM. Possiamo pertanto concludere che il cis-platino è un inibitore ad alta affinità per la proteina SERCA.

A questo proposito, è interessante confrontare il valore di IC₅₀ del cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)], da noi determinato, con le costanti di semi-inibizione di alcuni inibitori specifici della SERCA determinate in altri studi svolti nel nostro laboratorio^[28].

Tabella III

Molecola	Tapsigargina (TG)	Acido Ciclopiazonico	DBHQ	TITU	Cis-[Pt(NH ₃) ₂ (SO ₄)(H ₂ O)]
IC ₅₀	0,3±0,03nM	5,1±0,5nM	0,25±0,02μM	15±3μM	1,34±0,11μM

Come mostrato in tabella, la tapsigargina è l'inibitore più specifico e potente della SERCA con una costante di semi-inibizione pari a 0,3 nM, ed in grado di inibire la proteina in modo irreversibile.

Abbiamo poi osservato che l'effetto inibitorio del cis-platino sulla SERCA è fortemente ridotto se nella soluzione tampone è presente la forma ridotta del glutatione a concentrazione mM. Il glutatione ridotto ha quindi un'azione protettiva nei confronti dell'inibizione della SERCA da parte del cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)].

Alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe interessante studiare in dettaglio il meccanismo di interazione del cis-platino con la proteina SERCA. Ad esempio, sarebbe importante verificare se il cis-platino è in grado di inibire, non solo il trasporto di ioni Ca²⁺, ma anche il legame di ioni calcio dal lato citoplasmatico della proteina. Sarebbe inoltre utile indagare se il cis-platino può interferire con la formazione dell'intermedio fosforilato dell'enzima.

In conclusione, lo studio dell'interazione del cis-[Pt(NH₃)₂(SO₄)(H₂O)] con la SERCA merita, senza dubbio, ulteriori approfondimenti al fine di evidenziare eventuali analogie o discordanze con altri inibitori della Ca-ATPasi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Yatime, M. J. Buch-Pedersen, M. Musgaard, J. Preben Morth, A. M. Lund Winther, B. P. Pedersen, C. Olesen, J. P. Andersen, B. Vilsen, B. Schiøtt, M. G. Palmgren, J. V. Møller, P. Nissen, N. Fedosova; “*P-type ATPase as drug targets: Tools for medicine and science*”; *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 207-220.
- [2] C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, H. Ogawa; “*Cristal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*”; *International weekly journal of science nature* 405 (2000), 647-655.
- [3] G. Inesi, C. Toyoshima; “*Catalytic and Transport Mechanism of the Sarco-(Endo)Plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)*”; da “*Handbook of ATPases*” a cura di M. Futani, Y. Wada, J. H. Kaplan, (2004) 63-87.
- [4] S.R. Denmeade, J.T. Isaacs; “*The SERCA pump as a therapeutic target. Macking a “smart bomb” for prostate cancer*”; *Cancer Biology & Therapy* 4 (2005) 14-22.
- [5] S. R. Denmeade, A. M. Mhaka, D. M. Rosen, W. N. Brennen, S. Dalrymple, I. Dach, C. Olesen, B. Gurel, A. M. DeMarzo, G. Wilding, M. A. Carducci, C. A. Dionne, J. V. Møller, P. Nissen, S.B. Christensen, J. T. Isaacs; *Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy*; *Sci Transl Med.* (2012), 4 140ra86.
- [6] A. Bergner, J. Kellner, A. Tufman, R. M. Huber; “*Endoplasmic reticulum Ca^{2+} -homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines*”; *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2009), 28:25.
- [7] E. Hughes, R. Edwards, D. A. Middleton; “*Heparin-derived oligosaccharides interact with the phospholamban cytoplasmic domain and stimulate SERCA function*”; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401 (2010), 370–375.
- [8] S. Krishna, S. Pulcini, C. M. Moore, B. H.-Y. Teo, H. M. Staines; “*Pumped up: reflections on PfATP6 as the target for artemisinins*”; *Trends in Pharmacological Sciences* (2014), Vol. 35 n°1.
- [9] F. Michelangeli, J. M. East; “*A diversity of SERCA Ca^{2+} pump inhibitors*”; *Biochemical Society Transactions* (2011) Volume 39, part 3, 789-797.
- [10] G.R. Monteith, D. McAndrew, H. M. Faddy, S. J. Roberts-Thomson; “*Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport*”; *Nature Publishing Group* (2007), volume 7, 519-530.
- [11] T. G. Cotter; “*Apoptosi: Morte Cellulare Programmata*”; *enciclopedia Treccani* (2007).

- [12] R. Rizzuto, P. Pinton, D. Ferrari, M. Chami, G. Szabadkai, P. J. Magalhães, F. Di Virgilio, T. Pozzan; “*Calcium and apoptosis: facts and hypotheses*”; *Oncogene*, Nature Publishing Group (2003) 22, 8619-8627.
- [13] F.Z. Sadafi, L. Massai, G. Bartolommei, M. R. Moncelli, L. Messori, F. Tadini-Buoninsegni; “*Anticancer ruthenium(III) complex KP1019 interferes with ATP-dependent Ca^{2+} translocation by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)*”; *ChemMedChem*, 9 (2014), 1660-1664.
- [14] M. Huličiak, J. Vacek, M. Šebela, E. Orolinová, J. Znaleziona, M. Havlikova, M. Kubala; “*Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na^+/K^+ -ATPase by binding to its cytoplasmic part*”; *Biochemical Pharmacology* 83 (2012) 1507–1513.
- [15] P. Souza dos Santos, D. F. Saraiva, D. C. Ferraz da Costa, H. M. Scofano, P. Cesar de Carvalho-Alves; “*TriXuooperazine protects brain plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from oxidative damaging*”; *Exp Brain Res* 177 (2007), 347–357.
- [16] P. Dell'Antone; “*Inactivation of H^+ -vacuolar ATPase by the energy blocker 3-bromopyruvate, a new antitumour agent*”; *Life Sciences* 79 (2006) 2049–2055
- [17] V. Schneider, M. L. Krieger, G. Bendas, U. Jaehde, G. V. Kalayda; “*Contribution of intracellular ATP to cisplatin resistance of tumor cells*”; *J Biol Inorg Chem* 18 (2013), 165-174.
- [18] H. Burger, W. J. Loos, K. Eechoute, J. Verweij, R. H.J. Mathijssen, E. A.C. Wiemer; “*Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance*”; *Drug Resistance Updates* 14 (2011), 22–34.
- [19] K. Leonhardt, R. Gebhardt, J. Mössner, S. Lutsenko, D. Huster; “*Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug*”; *the journal of biological chemistry* vol. 284, (2009), 7793–7802.
- [20] R. Safaei, S. Otani, B. J. Larson, M. L. Rasmussen, S. B. Howell; “*Transport of Cisplatin by the Copper Efflux Transporter ATP7B*”; *Mol. Pharmacol* 73 (2008), 461–468.
- [21] R. P. Miller, R. K. Tadagavadi, G. Ramesh, W. B. Reeves; “*Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity*”; *Toxins* 2 (2010), 2490-2518.
- [22] S. Eletr, G. Inesi; “*Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton MNR studies*”; *Biochim Biophys Acta* 202 (1972), 174-179.
- [23] O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall; “*Protein measurement with the folin phenol reagent*”; *J Biol Chem* 193 (1951), 265-275.
- [24] P. Schulz, J. J. Garcia-Celma, K. Fendler; “*SSM-based electrophysiology*”; *Methods* 46 (2008), 97–103.

- [25] F. Tadini-Buoninsegni, R. Herrero, M.R. Moncelli; “*Alkanethiol monolayers and alkanethiol phospholipid bilayers supported by mercury: An electrochemical characterization*”; *Journal of Electroanalytical Chemistry* 452 (1998),33-42.
- [26] P. Schulz, J. J. Garcia-Celma, K. Fendler; “*SSM-based electrophysiology*”; *Methods* 46 (2008), 97-103.
- [27] D. Jardim-Messeder, J. Camacho-Pereira, A. Galina; “*3-Bromopyruvate inhibits calcium uptake by sarcoplasmic reticulum vesicles but not SERCA ATP hydrolysis activity*”; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012), 801–807.
- [28] F. Tadini-Buoninsegni, G. Bartolommei, M.R. Moncelli, D. M. Tal, D. Lewis, G. Inesi; “*Effects of high-affinity inhibitors on partial reactions, charge movements, and conformational states of the Ca^{2+} transport ATPase (Sarco-Endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase)*”; *Molecular Pharmacology* 73 (2008), 1134-1140.