



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
TOR VERGATA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE,
FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

XXI CICLO

**Ruolo dell'ossido nitrico sintasi neuronale
(nNOS) nella modulazione dell'omeostasi redox
intracellulare**

Sara Baldelli

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. Maria Rosa Ciriolo

Coordinatore: Prof. Gianni Cesareni

*Se non puoi essere una via maestra, sii un sentiero.
Se non puoi essere il sole, sii una stella.
Sii sempre il meglio di ciò che sei.*

Martin Luther King

A Gianluca

INDICE

<u>ABSTRACT</u>	Pag. 9
INTRODUCTION	11
RESULTS	15
<u>INTRODUZIONE</u>	20
L'ossido nitrico sintasi (NOSs)	22
Struttura della NOSs	24
Reazioni catalizzate dalla NOS	26
Ruolo dell'NO nell'omeostasi cellulare	28
Sistema Immunitario	29
Sistema Cardio-Vascolare	30
Sistema Nervoso Centrale	31
Regolazione dell'espressione genica	34
Ruolo dell'NO nella morte cellulare	34
Effetto proapoptotico	35
Effetto antiapoptotico	37
Azione antiossidante dell'NO	39
Regolazioni delle NOSs	40
Stress ossidativo/nitrosativo e SOD1	43
Glutathione (GSH)	49
<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	51
<u>PROCEDURE SPERIMENTALI</u>	57
Materiali	59
Colture Cellulari	60
Trasfezioni	60
Trattamenti	61
Determinazione della morte e vitalità cellulare	63
Marcatura dei nuclei con ioduro di propidio	63
MTS Test	63
Conta diretta tramite Trypan Blue	63
Marcatura con BrdU	64
Lisi delle cellule	64
Determinazione delle proteine totali	65
Determinazione del GSH mediante HPLC	65
Determinazione dei ROS e dello stress ossidativo	66
Determinazione della concentrazione di $O_2^{\cdot -}$	66
Misura delle proteine carbonilate	66
Immunoelettroforesi (Western Blot)	67
Marcatura delle cellule per immunofluorescenza	68
Misura dell'attività della SOD1	69

Metodo polarografico	69
Gel di attività	70
Immunoprecipitazione	70
RT-PCR	71
Determinazione della produzione di NO	72
Misura della concentrazione dei nitriti e dei nitrati	73
Misura <i>in vivo</i> della produzione di NO	73
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	73
Analisi statistica dei dati	74
RISULTATI	76
L'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS) protegge le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y dallo stress ossidativo indotto dai derivati dell'aglio	78
I derivati dell'aglio sono in grado di modulare l'espressione della nNOS	78
Effetti dell'incremento dell'nNOS sulla produzione di ROS	83
Effetti di differenti chemioterapici sul contenuto proteico della nNOS in cellule NSC34	84
L'up-regolazione della nNOS inibisce l'apoptosi e lo stress ossidativo indotto dai derivati dell'aglio	87
La sovraespressione della nNOS riduce l'attivazione di JNK e di c-Jun mediata dal DADS	91
La nNOS blocca la produzione di ROS, il danno al DNA e l'ossidazione delle proteine	95
L'inibizione della nNOS provoca un aumento dell'O ₂ ⁻ intracellulare	95
Effetti della sovraespressione dell'nNOS sulla modulazione del GSH e della SOD1	96
Sovraespressione dell'nNOS in cellule SH-SY5Y	96
La sovraespressione della nNOS provoca un arresto della proliferazione cellulare	98
La sovraespressione della nNOS determina un incremento di p53	101
La sovraespressione della nNOS provoca un aumento intracellulare dell'antiossidante tripeptidico GSH	102

Il GSH gioca un ruolo protettivo nel contrastare la tossicità indotta dall'NO	105
La sovraespressione della nNOS provoca un decremento dell'enzima antiossidante SOD1	106
La down-regolazione della SOD1 sembra tipica delle cellule neuronali, non-neuronali, di origine umana e murina	107
La sovraespressione della nNOS non altera il contenuto proteico della catalasi	109
La diminuzione della SOD1 non sembra essere dovuta a danno nitrosativo	110
La diminuzione della SOD1 non sembra essere dovuta all'attività del proteasoma	111
La sovraespressione della nNOS induce un'alterazione del legame di AP1 e Sp1 al DNA	111
La diminuzione della SOD1 non è dipendente dall'aumento di NO	116
La nNOS interagisce con il fattore di trascrizione Sp1 a livello citosolico e nucleare	119
<u>CONCLUSIONI</u>	124
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	135

ABSTRACT

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are constantly generated under normal conditions as a consequence of aerobic metabolism. ROS include free radicals such as the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), the hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) and the non radical hydrogen peroxide (H_2O_2). They are particularly transient species due to their high chemical reactivity and can react with DNA, proteins, carbohydrates and lipids in a destructive manner. The cell is endowed with an extensive antioxidant defence system to combat ROS, either directly by interception or indirectly through reversal of oxidative damage. When ROS overcome the defence systems of the cell and redox homeostasis is altered, the result is oxidative stress. Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of several diseases including Huntington's, and Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and retinal degenerative disorders. Evidently, the brain is particularly vulnerable. This is not surprising as the central nervous system is highly aerobic and thus extremely susceptible to oxidative stress. Additionally, the antioxidant defences of the brain are relatively low having almost no catalase and very low levels of glutathione (Reynolds *et al.*, 2007).

The mitochondria are a major site of generation of free radicals. Under physiological conditions, electrons carried by the electron transport chain can leak out of the pathway and pass directly to oxygen, generating $O_2^{\cdot-}$. Other sources of $O_2^{\cdot-}$ include enzymes such as cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum (ER), lipoxygenases, cyclooxygenases, xanthine oxidase and NADPH oxidase. The dismutation of $O_2^{\cdot-}$ by superoxide dismutase (SOD) results in the generation of H_2O_2 , which can then react with Fe^{2+} to form hydroxyl radicals via the Fenton reaction.

Reactive nitrogen species (RNS) are now also recognised as important radicals. Nitric oxide (NO) is formed endogenously from the oxidation of L-arginine to L-citrulline by a family of NADPH-dependent enzymes, the NO synthases. All NOS enzymes function as homodimers. They catalyse a two-step oxidation of the amino acid L-arginine to citrulline and NO via the intermediate compound N-hydroxy-L-arginine (NHA). Three quite distinct isoforms of NOS have been identified: nNOS (also known as Type I, NOS-I or NOS-1) being the isoform first found (and predominating) in neuronal tissue; iNOS (also known as Type II, NOS-II or NOS-2) being the isoform which is inducible in a wide range of cells and tissue; eNOS (also known as Type III, NOS-e or NOS-3) being the isoform first found in vascular endothelial cells. Activation of NOS requires the binding of several co

factors. NO exists in different chemical forms (NO^- , $\text{NO}^\cdot$ and NO^+) and thus has a wide-ranging degree of chemical reactivity and functions in a variety of different biological roles (Bian *et al.*, 2008; Garthwaite, 2008). These include regulation of the cardiovascular system, smooth muscle relaxation, neurotransmission, coagulation and immune regulation.

Despite these beneficial functions, the molecule has a pivotal role in cell death having the ability to both induce and protect against apoptosis as well as driving an apoptotic response into a necrotic one. NO can also combine with O_2^- to form peroxynitrite (ONOO^-), which shares some of NO's properties in that it also can diffuse freely intra- and intercellularly and also acts as a powerful oxidant.

Anti-apoptotic effects of NO are associated with low levels (10 nM-1 μM) of exposure from the activation of endogenous NOS and from the slow release of NO from NO donors. NO either delivered by NO donors or endogenously produced by NOS enzymes induces apoptosis both *in vivo* and in several cell types *in vitro*, such as neuronal cells and endothelial cells. The mechanisms of NO-induced apoptosis include activation of the death receptor Fas through up-regulation of Fas ligand expression, generation of peroxynitrite, inactivation of several antioxidant enzymes.

NO has been reported to have protective effects against apoptosis in a variety of cell types. Several mechanisms have been proposed to elucidate the ability of NO to confer protection against cell death. The more accepted hypothesis is that it inhibits caspase activation through the prevention of cytochrome *c* release, S-nitrosylation of active cysteine and the induction of protective proteins such as Hsp70 and Bcl-2 (Jiang e Wang, 2004). Moreover, NO has also been reported to impair p53 function possibly through aminoacid modifications such as S-nitrosylation.

In addition to the protective effects against apoptosis, NO can also abate the oxidation chemistry mediated by ROS such as H_2O_2 and O_2^- that occurs at physiological levels of NO. Moreover, NO protects against cell death mediated by H_2O_2 e O_2^- , in fact, the reactive intermediates which are formed during the Fenton-type reaction, can alter biological substances such as protein, nucleic acid, and lipids, resulting in tissue injury and apoptosis. NO can abate Fenton mediated oxidative stress by direct scavenging of oxidants, prevention of peroxide reaction, and scavenging of reducing equivalents supplied by O_2^- . Furthermore, NO can protect different cell types from lipid peroxidation. This process results in formation of a variety of lipid-oxy and peroxy adducts (Wink *et al.*, 2001). Perpetuation of lipid oxidation by these species can result in cell membrane compromise. Reaction of NO with these

peroxy and oxy radicals terminates lipid peroxidation and results in protection against ROS (Hummel *et al.*, 2006). Chain termination also prevents oxidation of low density lipoproteins in both endothelial cells and macrophages. Thus, termination of lipid peroxidation may be one of the most important antioxidant properties of NO (Fujioka *et al.*, 2004).

In addition to these chemical and biochemical properties, NO can modulate cellular and physiological processes to limit oxidative injury. How example, pre-treatment with NO several hours prior to exposure can confer protection against H₂O₂ (Chae *et al.*, 2001). Hepatocytes also became resistant to peroxide injury following treatment with NO (Joshi *et al.*, 1999). In addition to stimulating expression of protective proteins, NO has a number of effects on cellular functions that may influence oxidative stress. For instance, the presence of NO may limit ROS production by preventing assembly of NADPH oxidase, which is one of the major contributors to oxidative stress in various immune responses (Shinyashiki *et al.*, 2004). In addition to limiting interfering with oxidative stress, NO has been shown to prevent the induction of some genes that are induced from ROS. For instance, oxidative stress can induce early growth response-1, which through the extracellular signal-regulated kinase pathway can activate a number of adhesion molecules. It has been shown that NO derived from a donor or eNOS, abates the up-regulation of this system (Chiu *et al.*, 1999).

NO can also inhibit oxidative stress processes at physiological levels, which can result in protection against tissue injury. NO has been shown to attenuate ischemia-reperfusion injury in numerous organs such as heart, intestine, liver, kidney, and lung. Endogenous NO can also attenuate lung damage after intestinal ischemia. These reports suggest that under different conditions where ischemia-reperfusion is involved NO can abate tissue damage.

These observations show that NO plays an important role in both physiological and pathophysiological mechanisms involving properties at the chemical, cellular, and physiological levels. The relatively low concentration of NO required being an antioxidant suggests that in addition to its involvement with cyclic GMP, this radical molecule serves to counterbalance oxidative stress. This balance between NO and oxidative stress provides an important regulatory mechanism in numerous physiological effects. Imbalance in this redox symbiotic relationship can lead to different pathophysiological conditions.

Here we demonstrate the neuroprotective role played by nNOS/NO in counteracting the ROS-mediate ciotoxicity, induced by treatment with garlic

derivatives. In particular, we found that, besides their role in promoting growth arrest and apoptosis, either oil-soluble derivatives DADS or water GE significantly increased the content of nNOS in neuronal cell lines.

Next to the antioxidant action of NO, each cell is equipped with an extensive antioxidant system to counteract their harmful properties directly by interception or indirectly through reversal of oxidative damage. Essentially, the antioxidants can be divided into primary or secondary defence mechanism. Components of the primary antioxidant defence function to prevent oxidative damage directly by intercepting ROS before they can damage intracellular targets. It consists of SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase and thioredoxin reductase. Three classes of SOD have been identified to date. These are Mn-SOD (SOD2), Cu,Zn-SOD (SOD1), and extracellular SOD (SOD3).

The primary defence mechanisms against H₂O₂ are catalase (Zamocky *et al.*, 2008) and GSH-Px through the glutathione (GSH) redox cycle (Townsend *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Anderson, 1998). The GSH system is probably the most important cellular defence mechanism that exists in the cell. The tripeptide GSH (γ -Glu-Cys-Gly), not only acts as a ROS scavenger but also functions in the regulation of the intracellular redox state. The system consists of GSH, GSH-Px and glutathione reductase. The ability of the cell to regenerate GSH (either by reduction of GSSG or new synthesis of GSH) is an important factor in the efficiency of that cell in managing oxidative stress. But, as mentioned earlier, in central nervous system, the antioxidant defences are very low and thus more susceptible to oxidative stress. Then the antioxidant defence system and nNOS may interact to ensure the integrity and homeostasis of neuronal cells. Especially in the nervous system the nNOS/NO may directly or indirectly modulate the activity and expression of antioxidant defence systems.

Indeed, we further analysed the influence of endogenous overproduction on NO on the intracellular antioxidants SOD1 and GSH in cell lines of neuronal and non-neuronal origin. We report that nNOS over-expression induced a NO-dependent increase in the concentration of GSH thus reinforcing the idea that it represents a protective agent against NO cytotoxicity. On the other hand, the nNOS over-expression causes a NO-independent down-regulation of SOD1 in terms of mRNA, protein and activity levels.

RESULTS

In the first part of this work, we investigated the capacity of both oil- and water soluble garlic derivatives (such as diallyl disulfide, DADS and garlic extract, GE) to induce ROS production and we examined the possible influences of these compounds on the activity and/or expression levels of nNOS. In particular, we demonstrated that ROS increase mediated by DADS or GE, is accompanied by an augmented expression of nNOS in different neuronal cellular models. However, this increase was not paralleled by a detectable raise in NO production. These results are not contradictory, as the lack of an increase of nitrites and nitrates has been suggested to be indicative of a prompt interception of oxyradicals by NO (Wink *et al.* 2001; Mohanakumar *et al.* 2002). This hypothesis was confirmed by experiments carried out in the presence of nNOS inhibitors where we demonstrated a higher increase in the concentration of superoxide upon DADS treatment. The experiments done with nNOS inhibitors and nNOS overexpressing cells also demonstrate the pivotal role played by NO in protecting cells from oxidative stress induced by garlic derivatives. In fact, pre-treatments with the nNOS inhibitors increased the percentage of apoptotic cells, whereas the over-expression of nNOS significantly counteracted toxicity of garlic derivatives. Our data show that the accumulation of nNOS represents a cellular response for limiting the oxidative damage mediated by DADS and GE. Actually, by monitoring the damage to DNA and proteins in nNOS overexpressing cells, we found an efficient buffering of protein oxidation produced upon GE treatment or an inhibition of the histone H2A.X phosphorylation upon DADS treatment.

We previously demonstrated that DADS is able to induce apoptosis *via* the ROS-mediated activation of the JNK/*c-Jun* signaling pathway; indeed, over-expression of the antioxidant enzyme SOD1 significantly protected against DADS cytotoxicity by preventing JNK and *c-Jun* phospho-activation (Filomeni *et al.* 2003). Similarly to SOD1 over-expressing cells, nNOS over-expression was able to inhibit the activation of JNK/*c-Jun* phosphorylation, thus reinforcing the idea that NO overproduction is able to neutralize the signal transduction pathways activated by ROS.

In the second part of this work, we examined the capacity of nNOS in modulating the intracellular content of two important antioxidants such as GSH and SOD1 by analyzing the effect of its over-expression in SH-SY5Y

neuroblastoma cells. The over-expression was performed through the use of a nNOS cDNA cloned into pME18S vector (*nNOS cells*). As controls, SH-SY5Y cells were transfected with the pME18S empty vector (*mock cells*). 48h after transfection we found that nNOS protein was under the limit of detection in *mock cells*, whereas it was highly expressed after nNOS cDNA transfection. The nNOS over-expression was accompanied by NO_x raise, which were significantly decreased to value close to *mock cells* by using 7-nitroindazole (7-Ni), which is a specific inhibitor of nNOS activity. Moreover, we demonstrated that NO overproduction leads to an arrest of cell proliferation without induce apoptosis, indicating that nNOS over-expression was not cytotoxic for neuroblastoma cells. According to literature (Zhou *et al.*, 2004), also in our experimental system NO overproduction can affect cell proliferation through the up-regulation of p53 transcription factor.

In order to further analyze the role played by nNOS overexpression on the intracellular content of GSH, we examined the levels of tripeptide in SH-SY5Y and CHP100 neuroblastoma cells. The levels of GSH were highly increased after transfection with nNOS both in SH-SY5Y and CHP100 cells, but the inhibition of this enzyme, using 7-Ni, prevented the GSH rise in *nNOS cells*. Furthermore, the uses of a drug which can deplete GSH antioxidant defence system - buthionine sulfoximine (BSO) - induce a significant decrease of the cell viability of *nNOS cells* respect to *mock cells*. Moreover, co-treatment with 7-Ni was able to significantly revert BSO-induced cell death both in *mock* and *nNOS cells*, suggesting that cell death was elicited in the absence of GSH by nNOS activity. Overall these data confirm that GSH plays a pivotal role in counteracting NO cytotoxicity produced both at physiological and non-physiological level. Our findings are in line with reports demonstrating the dependence of NO toxicity on GSH levels in other cell types exposed to exogenous flux of NO (Moellering *et al.*, 1998; Ridnour *et al.*, 2005).

Besides GSH, another antioxidant considered to be pivotal in protecting cells from oxidative/nitrosative damage is the SOD1. SOD1 may represent a protective factor against NO toxicity since by scavenging the radical O₂^{•-} prevents the formation of ONOO⁻, a highly reactive oxidant that might constitute the primary pathogenic event leading to nitrosative damage of cellular macromolecules (Rotilio *et al.*, 2002; Ciriolo *et al.*, 2000). Therefore the interplay between SOD1 and nNOS has been proposed to prevent nitrosative stress and the O₂^{•-}-mediated decrease of NO synthesis (Yoneyama *et al.*, 2001). Also a transcriptional correlation between the two

enzymes exists: many transcription factors regulate the expression of both nNOS and SOD1, in response to chemical and biological stimuli (e.g. C/EBP, Egr1) (Minc *et al.*, 1999). The presence of a cross-talk between nNOS and SOD1 has been also proposed in our previous work where we demonstrated that expression of the pro-oxidant G93A SOD1 mutant induces a decrease of nNOS protein and activity through proteasome activation (Rotilio *et al.*, 2002; Aquilano *et al.*, 2003). This event is indispensable for maintaining nervous cells integrity and efficiency. On the basis of this knowledge, we investigated the effect of nNOS over-expression on SOD1 protein content and activity in SH-SY5Y cell lines. Measurements of SOD1 activity and protein content demonstrated that it was significantly reduced in *nNOS* cells respect to *mock* cells. The phenomena of SOD1 decrease associated with nNOS over-expression seem to be effective not only in SH-SY5Y neuroblastoma cells, but also in other human and murine neuronal cell lines: CHP100 (human neuroblastoma cells) and NSC34 (hybridoma between motor neurons and neuroblastoma cells of mouse origin). Moreover, we demonstrated that nNOS over-expression in a non-neuronal cell line, such as human AGS, caused the same effects on SOD1.

To investigate if the SOD1 down-regulation was due to nitration damage or proteasome activity, we measured the content of nitrotyrosine (NO₂Tyr) and the protein content of SOD1, after treatment with the specific inhibitor of proteasome, MG132. Overall, these results demonstrated that SOD1 down-regulation was not to nitration damage, and neither to proteasome activity, in fact, treatment with MG132 did not restore SOD1 levels.

Finally we investigated the binding activity of two important transcription factor, Sp1 and AP1, which can act as activators or inhibitors of SOD1 gene (*sod1*) transcription, respectively. In particular, we showed by EMSA assays, that AP1 binding activity was significant increase in *nNOS* cells with respect to *mock* cells. This result suggests that AP1 may play a negative role in *sod1* promoter activation by interfering with the binding of other factors as suggested by Afonso *et al.* (2006). Furthermore, incubation of nuclear extracts with Sp1 consensus oligonucleotide revealed a specific retarded complex that was indicative of Sp1 binding. In particular, this complex was significantly decreased in nuclear extracts from *nNOS* cells.

It has been demonstrated that *sod1* promoter region located between nucleotides -59 and -48 is the region specific for the constitutive Sp1 binding. To investigate whether Sp1 binding to *sod1* promoter was affected in *nNOS* cells; we carried out a series of band shift experiments using the -60/-38 region of *sod1* promoter as probe.

Our data are in agreement with those of Afonso *et al.* (Afonso *et al.*, 2006) showing that SOD1 down-regulation was due to both the decreased binding of Sp1 and the increased binding activity of AP1 transcription factor, which likely acts as a transcriptional repressor of *sod1* gene.

Contrarily to GSH rise, SOD1 decrease seems not to be dependent on NO-induced overproduction. In fact, a series of treatments with different inhibitors of the NO pathway concomitantly to nNOS overexpression, were showed that the decrement of SOD1 protein was still evident in *nNOS* cells. Quindi, we hypothesized that SOD1 down-regulation could be modulated by undiscovered mechanism(s) that likely directly depends on the nNOS intracellular overload rather than on NO overproduction. We hypothesized that nNOS protein could inhibit Sp1 activity through a protein-protein interaction at nuclear and/or cytosolic level. The Sp1 immunoprecipitation followed by Western blot analysis of nNOS revealed that, in nuclear and cytosolic compartments a discernible Sp1/nNOS heterocomplex was detected. These result demonstrated that the specific repression of SOD1 expression that we found in our experimental model could be determined by the sum of two events: the Sp1 sequestration by nNOS and inhibition of Sp1 binding to *sod1* gene promoter by AP1. The discovery of a nNOS/Sp1 interaction opens new perspectives in the understand of the role of nNOS in modulating *sod1* gene transcription. In conclusion, our results give a further contribute to the comprehension of nNOS function, a protein that can be regarded as both a NO-producing enzyme and a regulator of gene expression.

INTRODUZIONE

L'ossido nitrico sintasi (NOSs)

La famiglia delle ossido nitrico sintasi (NOSs) è stata per la prima volta identificata nel 1989 e le tre maggiori isoforme sono state clonate e purificate tra il 1991 e il 1994. Da quando questa famiglia è stata scoperta, è stata pubblicata una media di circa 2800 lavori per anno. Un'idea di quanto sia importante e considerata la funzione delle NOSs e del loro prodotto ossido nitrico (NO) è fornita dall'assegnazione nel 1998 del premio Nobel a Furchgott R., Ignarro L. e Murad F. per il contributo dato alla scoperta dell'NO come mediatore fisiologico prodotto nelle cellule di mammifero e dalla nomina nel 1999 di Moncada S. come lo scienziato maggiormente citato negli ultimi dieci anni.

Le NOSs sono enzimi comunemente considerati dimerici allo stato attivo, ignorando che in realtà l'attività enzimatica dipende strettamente dall'interazione con la calmodulina (CaM). Le NOSs sono anche associate a una serie di co-fattori comprendenti la tetraidrobiopterina (BH_4), il FAD, l'FMN e l'eme e catalizzano la reazione di formazione dell'NO a partire dall'L-arginina, dall'NADPH e dall'ossigeno (O_2) (figura 1) (Alderton *et al.*, 2001).

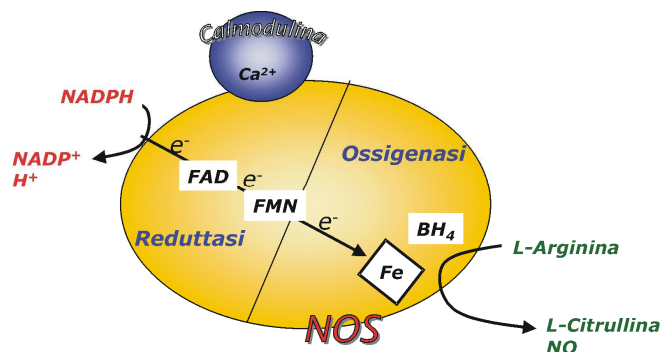


Figura 1. Schema della struttura e della reazione enzimatica della NOS.

L'ossido nitrico sintasi (NOS) è un enzima dimerico costituito da un dominio ossigenasico contenente eme e un dominio reduttasico. Per la sua attività sono richiesti numerosi cofattori: il flusso di elettroni parte dal NADPH e passa attraverso il FAD, l'FMN per poi ridurre il ferro (Fe) contenuto nel gruppo eme. La tetraidrobiopterina (BH_4) è un altro co-fattore utile alla reazione enzimatica. La NOS sintetizza NO attraverso l'ossidazione dell'L-arginina in L-citrullina con un meccanismo Ca^{2+} /calmodulina-dipendente.

Sono state identificate tre isoforme della NOS che sono prodotte da tre geni distinti e che hanno diverse localizzazioni, regolazioni, proprietà catalitiche, sensibilità agli inibitori. Esse presentano il 51-57% di omologia tra le forme umane e sono comunemente chiamate: 1) nNOS, nota anche come NOS-I e NOS-1 poiché identificata per prima e situata nei tessuti neuronali; 2) iNOS, conosciuta anche come NOS-II e NOS-2, essendo l'isoforma inducibile in una vasta gamma di cellule e tessuti; 3) eNOS chiamata anche NOS-III e NOS-3 poiché è stata identificata per la prima volta nel sistema vascolare. Queste isoforme sono state anche distinte in passato sulla base della loro espressione costitutiva (cNOS) o inducibile (iNOS) e della loro calcio-dipendenza (eNOS e nNOS) o calcio-indipendenza (iNOS). Inoltre per ciascun'isoforma, e specialmente per l'nNOS, sono state identificate anche delle varianti di splicing e non si può escludere che in futuro potranno essere identificati altri prodotti genici che estenderanno ulteriormente questa già vasta famiglia di proteine.

Oltre alle tre canoniche forme di NOSs, esiste anche un'altra isoforma dell'enzima denominata NOS mitocondriale (mtNOS), presente all'interno dei mitocondri ed espressa costitutivamente (Carreras e Poderoso, 2007). Recenti studi hanno dimostrato che la mtNOS è l'isoforma nNOS dell'enzima con successive modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione della Ser1412 e miristilazioni di alcuni residui interni alla proteina (Carreras *et al.*, 2007). La mtNOS è legata alla membrana interna dei mitocondri e interagisce attraverso il suo dominio PDZ (PSD-95 discs large/ZO-1 homology domain, dove PSD-95 rappresenta la proteina post-sinaptica 95) con la citocromo *c* ossidasi e con il complesso I della catena di trasporto mitocondriale. In condizioni fisiologiche la produzione di NO, da parte della mtNOS, ha importanti implicazioni nel mantenere il metabolismo cellulare, poiché è in grado di modulare il consumo di O₂ nei mitocondri, attraverso il suo legame reversibile con la citocromo *c* ossidasi (Bustamante *et al.*, 2007). Al contrario, elevate concentrazioni di NO o dei suoi derivati (perossinitrito, ONOO⁻; nitrosotioili, SNO) possono causare l'inibizione irreversibile della catena di trasporto mitocondriale, indurre stress ossidativo/nitrosativo e portare in ultimo alla morte cellulare (Brown, 2001).

Struttura delle NOSs

Nel genoma aploide umano esistono tre geni per ciascun'isoforma di NOS: *iNOS*, *nNOS*, *eNOS* (tabella I):

<i>Isoforme umane della NOS</i>	<i>Dimensione e struttura del gene</i>	<i>Locazione cromosomiale</i>	<i>Numero di aminoacidi e dimensione</i>
nNOS (NOS-1)	29 esoni, 28 introni, >200 kpb	12q24.2-12q24.3 del cromosoma 12	1434 aa, 161 kDa
iNOS (NOS-2)	26 esoni, 25 introni, 37 kpb	17cen-q11.2 del cromosoma 17	1153 aa, 131 kDa
eNOS (NOS-3)	26 esoni, 25 introni, 21-22 kpb	7q35-7q36 del cromosoma 7	1203 aa, 133 kDa

Tabella I. Ossido nitrico sintasi umane

I geni della NOS hanno una struttura genomica simile che suggerisce un comune gene ancestrale. Tutte le isoforme della NOS hanno una struttura costituita da due domini, mostrati nella *figura 2*. Il dominio ossigenasico all'N-terminale contiene i siti di legame per l'eme, la BH₄ e l'L-arginina ed è connesso al dominio reduttasico C-terminale dalla regione deputata al riconoscimento della CaM. Il dominio reduttasico contiene i siti di legame per il FAD, l'FMN e l'NADPH.

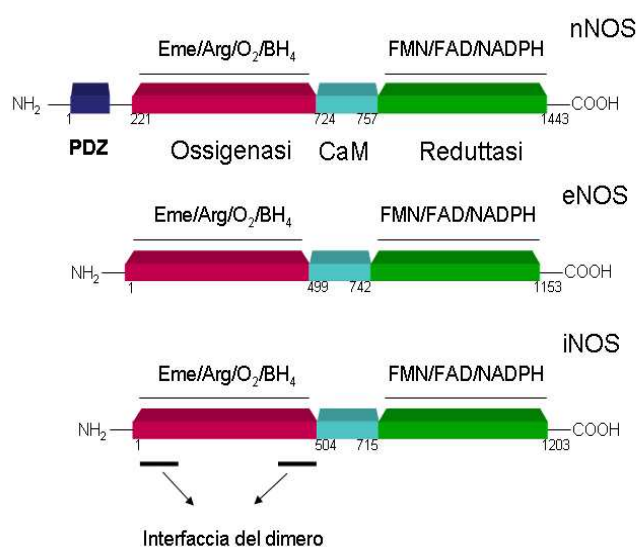


Figura 2. Struttura dei domini delle forme umane della nNOS, eNOS, iNOS.

PDZ: dominio di ancoraggio alla membrana cellulare; CaM: dominio legante la calmodulina.

Come accennato in precedenza, l'associazione dei monomeri della NOS è necessaria alla formazione dell'enzima attivo. L'interfaccia di associazione coinvolge il dominio ossigenasico e include il sito di legame per la BH₄, e favorisce la formazione della tasca del sito attivo che contiene l'eme e L-arginina. L'interfaccia include anche due residui di cisteina per monomero che sono responsabili sia della formazione di un ponte disolfuro tra i monomeri, sia del legame dello zinco ai due monomeri stessi (Alderton *et al.*, 2001). La BH₄, come anche l'L-arginina e l'eme, promuove e/o stabilizza la forma attiva dimerica di tutte e tre le isoforme. In particolare per l'nNOS, l'aggiunta di BH₄ e dell'L-arginina al dimero già formato lo converte in una forma dimerica ancora più stabile.

Reazioni catalizzate dalla NOS

La biochimica della NOS è particolarmente interessante, poiché rappresenta il primo pathway riconosciuto nei mammiferi di sintesi e di utilizzo di una molecola gassosa come molecola segnale. Comunque, questo enzima è anche interessante dal punto di vista enzimatico poiché catalizza una reazione nuova per un'emoproteina e conferisce al co-fattore BH_4 un ruolo unico. La *figura 3* mostra la sintesi dell'NO catalizzata dalla NOS come era stata descritta nel 1994 (Knowles e Moncada, 1994) ed ancora oggi rappresenta un buon modello per la comprensione del meccanismo di sintesi dell'NO. Infatti, l'L-arginina, il NADPH e l' O_2 sono ancora considerati i substrati e il NADP e la citrullina i prodotti. Inoltre, l'L-N- ω -idrossi-L-arginina (NHA) è ancora considerata il prodotto intermedio (*figura 3*).

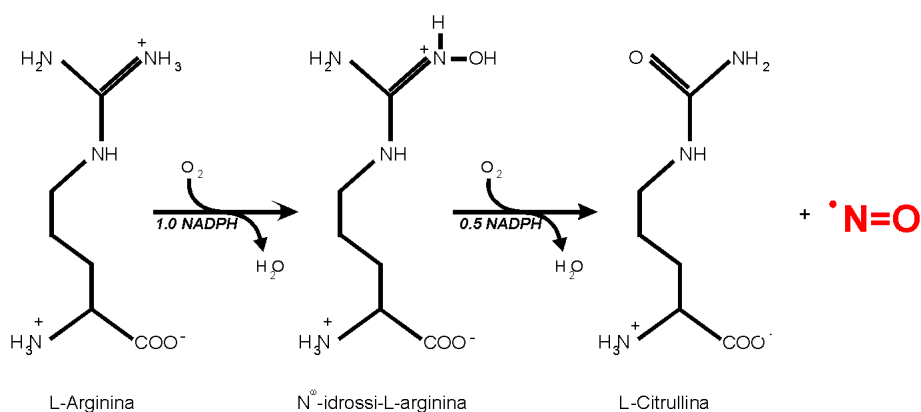


Figura 3. Sintesi dell'ossido nitrico.

La sintesi di NO si articola in due passaggi. Il primo porta alla formazione dell'intermedio stabile N $^{\omega}$ -idrossi-L-arginina attraverso l'ossidazione di 1.0 equivalente di NADPH; il secondo passaggio produce L-citrullina e NO attraverso l'utilizzo di 0.5 equivalenti di NADPH.

La biosintesi dell'NO operata dalla NOS si articola in due successivi passaggi: il primo consiste nell'ossidazione dell'L-arginina a NHA che utilizza, in analogia alla monossigenazione del citocromo P450, un

equivalente di NADPH e di O_2 ; nel secondo passaggio l'NHA viene convertita in NO e L-citrullina utilizzando 0.5 equivalenti di NADPH ed una molecola di O_2 .

Lo stesso prodotto della NOS, l'NO, può portare all'inibizione dell'attività dell'enzima. Infatti, data l'elevata stabilità del complesso Fe^{2+} -NO, non esiste enzima contenente eme, e che abbia nella sua reazione di catalisi la formazione dell'intermedio Fe^{2+} , che non sia inibito dall'NO. La NOS non rappresenta un'eccezione a questa regola. L'auto-inibizione può essere evitata dall'aumento del grado di dissociazione dell'NO o dalla modifica della reattività chimica del legame Fe^{3+} -NO attraverso la competizione con l' O_2 .

Mentre è ampiamente dimostrato che molte cellule e tessuti esprimono la NOS, rimane ancora oggetto di dibattito se, in tutti i casi, la NOS sintetizza o meno NO. Infatti, è stato suggerito che potrebbero inizialmente formarsi altre potenziali specie reattive che solo in un secondo momento si trasformerebbero in NO. Schmidt e co-autori, (Schmidt *et al.*, 1996) in una pubblicazione molto provocatoria intitolata "No NO dall'NO sintasi" ha dimostrato, attraverso studi condotti sulla nNOS purificata, che la nNOS non è in grado di sintetizzare NO a meno che non si aggiunga la superossido dismutasi (SOD), un enzima antiossidante intracellulare. Analogamente, altri autori hanno dimostrato che si può ottenere un incremento della sintesi di NO da parte della iNOS e dell'nNOS solo in presenza di SOD (Hobbs *et al.*, 1994). Inoltre, gli stessi autori hanno suggerito che il principale prodotto di reazione è l'anione nitrossido (NO^-) e che la SOD è necessaria per la trasformazione di questo prodotto in NO. Comunque la SOD può anche aumentare la produzione di NO, rimuovendo il superossido (O_2^-) che lo convertirebbe velocemente in $ONOO^-$ (Koppenol *et al.*, 1992). Anche il O_2^- è considerato come un altro prodotto della reazione di catalisi della NOS poiché può sia derivare dai co-fattori flavinici nel dominio reduttasico, sia essere prodotto nel dominio ossigenasico in assenza di BH_4 (Miller *et al.*, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Vasquez-Vivar *et al.*, 1999).

Ruolo dell'NO nell'omeostasi cellulare

Le informazioni tra l'ambiente intra-cellulare e quello extra-cellulare sono scambiate tramite piccoli ioni o molecole organiche come: ammine, acidi organici, nucleosidi, nucleotidi, polipeptidi, proteine e steroidi. Queste molecole messaggero sono trasportate attraverso pori o canali oppure agiscono legandosi a specifici recettori intracellulari o localizzati sulla membrana cellulare. Negli ultimi 15 anni è stato scoperto che, nei vertebrati e negli invertebrati, alcuni precursori organici come l'arginina o l'eme sono trasformati enzimaticamente in piccole molecole inorganiche (NO e monossido di carbonio, CO) che possono, allo stesso modo dei composti inorganici, fungere da molecole segnale (Knipp e Bicker, 2009). Queste scoperte sono state piuttosto rivoluzionarie, poiché entrambe le molecole sono gas diffusibili e, in base alla loro chimica, non in grado di interagire con uno specifico sistema recettoriale.

L'NO, è una molecola ad elevata reattività che pur essendo potenzialmente tossica è implicata in una vasta gamma di processi fisiologici. L'NO ha una funzione importante già all'inizio della vita, quando la produzione di NO nei gameti maschili è richiesta per l'attivazione delle uova immediatamente dopo la fecondazione (Kuo *et al.*, 2000). Più tardi è coinvolto nei processi di sviluppo (Wingrove e O'Farrel, 1999) e governa un vasto numero di reazioni fisiologiche come la neurotrasmissione, la regolazione del sistema immunitario, la regolazione del sistema cardiovascolare, il rilassamento della muscolatura involontaria, l'aggregazione piastrinica (Zago e Zanesco, 2006; Cengel e Sahinarslan, 2006; Kleinbongard *et al.*, 2007; Feletou *et al.*, 2008; Garthwaite, 2008). Questi processi condividono fondamentalmente i seguenti meccanismi biochimici: 1) la sintesi enzimatica dell'NO da parte delle NOSs, a partire dall'aminoacido L-arginina; 2) la formazione di un complesso ferro-NO nell'eme di una proteina bersaglio allo scopo di promuovere la sua funzione.

L'NO ha anche un ruolo fondamentale nell'induzione della morte cellulare in dipendenza della sua concentrazione. Questa poliedricità nella modulazione dei processi che regolano la vitalità cellulare deriva fondamentalmente dalla sua complessa chimica. L'NO può esistere in diverse forme redox dotate di proprietà distinte e di elevata reattività: NO⁺, NO[•], NO⁻. Queste specie ricordano inevitabilmente le specie reattive dell'ossigeno (ROS) con tutte le loro implicazioni biochimiche ormai ben conosciute.

L'NO è una molecola che ha un elettrone nel suo orbitale $2p-\pi$ ($\text{NO}^\bullet$) (Marletta *et al.*, 1990) e può quindi trasformarsi, attraverso la rimozione o l'aggiunta di un elettrone, rispettivamente nell' NO^+ e nell' NO^- . Queste specie, oltre a possedere diverse lunghezze di legame e differenti energie vibrazionali, sono dotate di cariche diverse.

L'ossido nitrico ($\text{NO}^\bullet$). L' $\text{NO}^\bullet$ è una specie neutra che ha, di conseguenza, la capacità di diffondere velocemente attraverso mezzi acquosi e di attraversare le membrane cellulari. Inoltre essa da un lato strettamente biologico, reagisce principalmente con l' O_2 nelle sue varie forme redox e con i metalli di transizione, soprattutto quelli appartenenti alle metalloproteine contenenti l'eme, come l'emoglobina (Thomas *et al.*, 2003), o anche ad altre metalloproteine con centri Fe-S come l'aconitasi o la citocromo *c* ossidasi appartenente alla catena di trasporto mitocondriale (Giuffrè *et al.*, 2002; Kim e Ponka, 2003; Brunori *et al.*, 2004).

Il nitroso (NO^+). La chimica dell' NO^+ è caratterizzata da reazioni di addizione o sostituzione con molecole nucleofile, come le basi ricche di elettroni ed i gruppi aromatici. La nitrosazione nella fase acquosa può interessare i centri delle molecole organiche contenenti -S, -N, -O e -C. Un esempio importante di tali addotti è costituito dai tionitriti (RSNO) e dalle nitrosoamine (RNHNO).

L'anione nitrossido (NO^-). La chimica dell' NO^- è meno importante poiché questa molecola, in ambiente acquoso, si trasforma rapidamente in N_2O attraverso la dimerizzazione e la deidratazione. Quest'ultima specie può reagire con l'eme, come accade per l' $\text{NO}^\bullet$, ma può anche formare degli addotti con molecole tioliche a basso peso molecolare, o con le proteine portando all'ossidazione dei gruppi sulfidrilici con la formazione dell'intermedio RSNOH (Turk e Hollocher, 1992).

Ruolo dell'NO nel sistema immunitario

L'NO è parte integrante della risposta infiammatoria contro agenti patogeni, virus e cellule tumorali. Nel sistema immunitario, l'NO è prodotto in vari tipi cellulari dalla iNOS, la quale è attivata da una serie di citochine infiammatorie come $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor alpha) o i lipopolisaccaridi (LPS), attraverso una regolazione di tipo trascrizionale. Infatti, il promotore del gene per la iNOS contiene siti di legame per il

fattore di trascrizione NF- κ B (Nuclear Factor-kappaB), il quale è in grado di avviare la trascrizione della iNOS per azione dei macrofagi. La cascata del segnale che porta alla sintesi della iNOS può avvenire anche in cellule non macrofagiche (cellule muscolari, cellule epatiche, astroglia) ed è cellula-specifica. L'iNOS una volta espressa, diventa costitutivamente attiva e i suoi livelli vengono abbassati per mezzo dei sistemi proteolitici intracellulari (Musial e Eissa, 2001).

Ruolo dell'NO nel sistema cardio-vascolare

L'NO prodotto dalla eNOS è il più importante vasodilatatore endogeno (Zago e Zanesco, 2006; Cengel e Sahinarslan, 2006). Il meccanismo attraverso cui si esplica la sua azione è l'attivazione della guanilato ciclasi solubile (GCs) e il conseguente accumulo della guanosina 3'5' monofosfato (GMPc). La eNOS può essere regolata attraverso differenti processi post-trascrizionali o post-traduzionali che ne modulano sia l'espressione, sia l'attività, sia la localizzazione cellulare (Fleming e Busse, 2003). In condizioni fisiologiche, la eNOS è regolata dalla concentrazione di Ca^{2+} intracellulare ed è attivata da acetilcolina e bradichinina.

L'NO che diffonde dalle cellule endoteliali, stimulate in modo opportuno, induce il rilassamento della muscolatura del vaso sanguigno, attraverso l'attivazione della GCs: una proteina eterodimerica formata da una subunità α e una β , ciascuna con un gruppo eme che è in grado di legarsi all'NO formando un complesso Fe-NO (*figura 4*). La formazione di tale complesso induce un cambiamento conformazionale dell'enzima tale da attivarlo e portare all'accumulo di GMPc, un noto secondo messaggero in grado di stimolare la protein-chinasi G (PKG) ed i canali ionici GMPc-dipendenti, coinvolti nel rilassamento muscolare (Bellamy *et al.*, 2000).

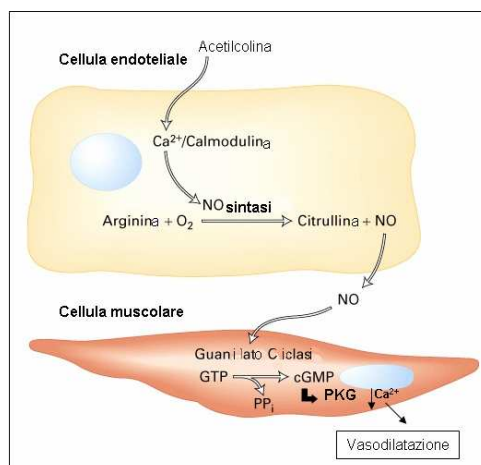


Figura 4. L'ossido nitrico nella regolazione della vasodilatazione.

Nella cellula endoteliale l'attivazione della eNOS attraverso uno stimolo chimico o fisico è dovuta all'aumento del Ca^{2+} intracellulare. L'NO prodotto diffonde verso le cellule della muscolatura del vaso dove attiva la guanilato ciclasti solubile (GCs). Il GMPc attiva la protein chinasi G (PKG) che causa una diminuzione dei livelli di Ca^{2+} e la conseguente vasodilatazione.

Ruolo dell'NO nel sistema nervoso centrale

La prima evidenza che ha portato a includere l'NO nella famiglia dei messaggeri che mediano la trasmissione nervosa nel sistema nervoso centrale, deriva dall'osservazione che il glutammato, che agisce attraverso i recettori NMDA (N-methyl D-aspartate), aumenta rapidamente la conversione dell'arginina in citrullina e NO nei tessuti cerebellari (Garthwaite *et al.*, 1989). La stessa stimolazione provoca anche un aumento rilevante nella produzione di GMPc che è invece sfavorita dagli inibitori della nNOS. La spiegazione di tale fenomeno deriva dal fatto che la stimolazione dei recettori NMDA favorisce l'entrata del Ca^{2+} nell'ambiente intracellulare e porta all'aumento della produzione di NO da parte della nNOS, che è un'enzima Ca^{2+} -dipendente. Una volta prodotto, l'NO è in grado di diffondere liberamente e raggiungere tutte le sue molecole

bersaglio. Queste sono principalmente proteine contenenti eme, come ad es. la GCs, o cisteine reattive, come ad es. lo stesso NMDA. L'NO è in grado di legarsi promuovendo rispettivamente la formazione di complessi Fe^{2+} -NO e la S-nitrosilazione (Choi e Lipton, 2000) (figura 5). L'interazione con queste proteine porta essenzialmente a un loro cambiamento conformazionale e a una successiva modulazione della loro funzione (attivazione o inattivazione).

L'NO, nel sistema nervoso esercita le sue funzioni di neuromodulatore attraverso due meccanismi:

1. La promozione della sintesi di GMPc, che è un importante secondo messaggero i cui principali bersagli sono la PKG, le fosfodiesterasi dei nucleotidi ciclici (PDE) e i canali dipendenti dai nucleotidi ciclici (CNGCs).
2. La S-nitrosilazione dei residui di cisteina proteici, una reazione chimica che avviene spontaneamente in presenza di alte concentrazioni di NO senza l'assistenza di enzimi. Le proteine principalmente regolate da tale reazione sono alcuni canali ionici, compreso l'NMDA (Ahern *et al.*, 2002).

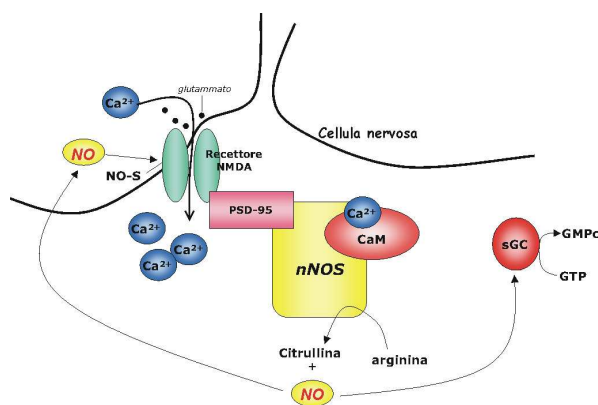


Figura 5. L'ossido nitrico nella neuromodulazione.

La nNOS interagisce con il recettore del glutammato (NMDA) attraverso la proteina PSD-95. Alla stimolazione del recettore si ha l'aumento del Ca^{2+} intracellulare e l'attivazione della nNOS con un meccanismo Ca^{2+} -Calmodulina (CaM)/dipendente. L'NO prodotto si lega all'eme della guanilato ciclasi (GCs) stimolando la produzione del secondo messaggero

GMPc. L'NO è in grado di inattivare l'NMDA attraverso la S-nitrosilazione dei residui di cisteina.

L'NO nel sistema nervoso centrale ha un ruolo fondamentale non solo come neuromodulatore ma anche come neurotrasmettitore. La neurotrasmissione mediata da NO, in analogia con la neurotrasmissione adrenergica e colinergica, è definita nitrgica. Come le prime due, quest'ultima media il rilassamento della muscolatura liscia dei sistemi respiratorio e gastrointestinale, e del tratto urogenitale (Takahashi, 2003; Zochodne e Levy, 2005).

Il modello correntemente accettato per la neurotrasmissione mediata dall'NO è mostrato nella *figura 6*.

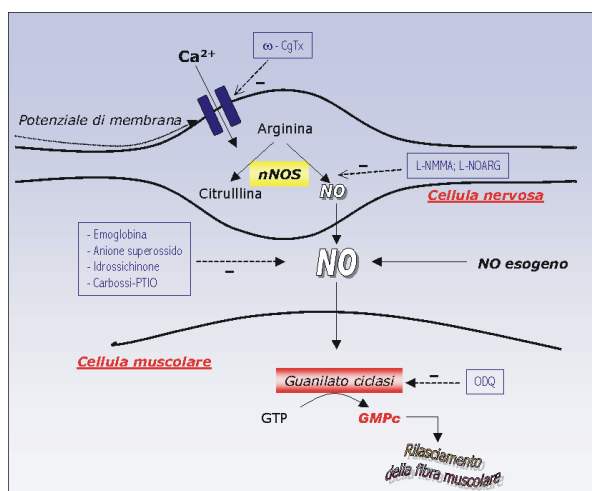


Figura 6. L'ossido nitrico nella neurotrasmissione nitrgica.

Quando il potenziale d'azione raggiunge le terminazioni nervose, l'entrata del Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti porta all'attivazione della nNOS localizzata a livello citoplasmatico. Al contrario degli altri neurotrasmettitori (ad es. acetilcolina), l'NO conseguentemente prodotto non viene depositato nelle vescicole sinaptiche ma è immediatamente rilasciato. Per questo motivo, l'NO è sintetizzato dalla

nNOS all'insorgenza di un opportuno stimolo. Il meccanismo del suo rilascio non prevede la formazione di vescicole poiché questo neurotrasmettitore è sufficientemente piccolo, sia idro- sia lipo-solubile e per questo facilmente diffusibile attraverso la membrana cellulare dei neuroni. Comunque, i nervi nitrgici contengono vescicole nella regione sinaptica probabilmente contenenti co-neurotrasmettitori (o forse molecole che proteggono l'NO) che vengono rilasciati in concomitanza del rilascio di NO (Takahashi, 2003; Zochodne e Levy, 2005).

Il modello della trasmissione nitrgica è stato proposto sulla base di studi condotti mediante utilizzo di inibitori che agiscono a vari livelli. La trasmissione nitrgica può essere sfavorita dalla ω -conotossina (ω -CgTx), un inibitore del canale del Ca^{2+} , dall'L-N^G-monometil-arginina e dall'L^G-NO nitro-arginina (L-NMNA e L-NOARG), inibitori della NOS, dall'ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), un inibitore della GCs. Inoltre, l'NO aggiunto esogenamente con opportuni donatori mima gli effetti del rilassamento muscolare prodotto dalla trasmissione nitrgica. Esistono poi altre sostanze che sono in grado di sequestrare l'NO e sfavorire la neurotrasmissione nitrgica (emoglobina, O_2^- , idrossichinone, carbossi-PTIO).

Regolazione dell'espressione genica

La regolazione della trascrizione genica come risposta a segnali extracellulari è iniziata da interazioni ligando-recettore e mediata da un ampio e articolato meccanismo di trasduzione del segnale cellulare. E' stata dimostrata l'esistenza di una stretta interazione tra l'NO e le componenti di questa via di trasduzione del segnale. Esempi di bersagli dell'NO sono i canali ionici, le proteine G (p21^{ras}), le protein tirosin-chinasi, le protein chinasi attivate dai mitogeni (Erk, p38 MAPK, c-Jun, JNK), le caspasi (caspasi 1 e 3), le metallo-proteasi e le protein fosfatasi. Inoltre l'NO regola l'attività di molti fattori trascrizionali (Ace 1, NF κ B, AP 1, HIF-1) tra cui anche quelli contenenti dita di zinco (p53, Sp1) (Contestabile, 2008).

Ruolo dell'NO nella morte cellulare

L'apoptosi è un meccanismo essenziale per il normale sviluppo dell'organismo e per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. E' oramai chiaro che l'NO svolge un duplice ruolo nella modulazione del processo

apoptotico: può, infatti, in base alla sua forma, alla concentrazione e al tipo cellulare, sia promuovere sia inibire la morte cellulare.

Effetto proapoptotico

La tossicità dell'NO è data soprattutto dall'interazione con altre specie reattive, tra cui ricordiamo il $O_2^{\cdot-}$, dando vita ad una mistura di intermedi tossici: le specie reattive dell'ossido nitrico (RNS), fra i quali il ONOO⁻ ed il diossido di azoto (NO_2). Gli RNS, allo stesso modo dei ROS, possono reagire con tutte le biomolecole: il DNA, i tioli, gli aminoacidi ed i metalli portando all'ossidazione e alla nitrificazione (figura 7). Se prodotto ad elevate concentrazioni (dell'ordine di 1-3 μM), l'NO con i suoi derivati può avere effetti deleteri per tutte le funzioni cellulari, portando per esempio alla perdita di funzioni enzimatiche, all'alterazione dell'integrità di membrana e alle mutazioni del DNA (Chung *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002; Yung *et al.*, 2004; Fabbri *et al.*, 2005).

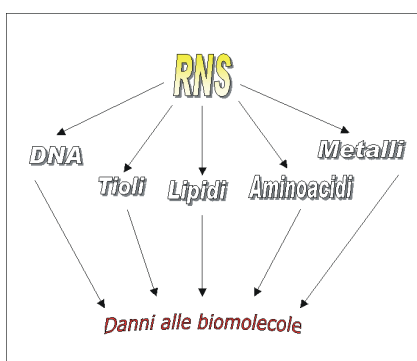


Figura 7. Effetti tossici degli RNS.

Gli RNS possono interagire con tutte una serie di molecole: il DNA, i tioli, i lipidi, gli aminoacidi, i metalli. L'interazione con queste specie porta al danneggiamento delle

biomolecole cellulari: il DNA, le proteine strutturali, le metallo-proteine, le membrane.

La produzione elevata di RNS e quindi lo stress nitrosativo sono stati osservati in numerosi stati patologici. Infatti, i prodotti di ossidazione stabile dell'NO, i nitriti ed i nitrati, sono stati riscontrati ad elevate concentrazioni nella fibrosi cistica, nell'AIDS e nelle malattie neurodegenerative.

La capacità dell'NO di produrre apoptosi è stata osservata per la prima volta nei macrofagi (Albina *et al.*, 1993). Da allora è stato dimostrato che molti altri tipi cellulari possono essere indotti all'apoptosi in seguito ad esposizione a flussi elevati di NO o di ONOO⁻. Un tessuto particolarmente sensibile all'effetto citotossico dell'NO è il sistema nervoso: infatti, assieme

ai ROS, gli RNS sembrano essere i principali responsabili della morte delle cellule nervose nelle malattie neurodegenerative.

In genere, l'induzione all'apoptosi richiede dosi elevate di NO e l'effetto proapoptotico è indipendente dall'accumulo di GMPc. L'induzione all'apoptosi sembra essere mediata soprattutto dai danni arrecati al DNA. Le alterazioni a livello del DNA producono l'accumulo di p53 e la conseguente stimolazione dell'espressione della proteina p21, direttamente coinvolta nell'arresto del ciclo cellulare. Se il danno non può essere riparato dai sistemi cellulari preposti, la cellula, che inizialmente aveva arrestato la crescita in attesa del riparo, è indotta all'apoptosi.

L'effetto citotossico dell'NO può essere mediato anche dall'interazione con i mitocondri a tre livelli (figura 8):

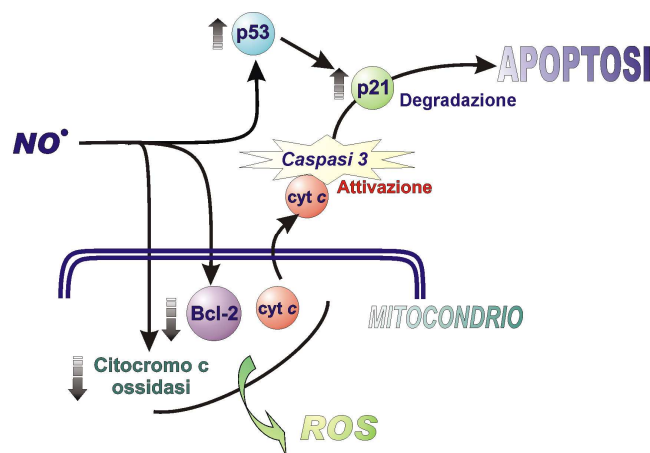


Figura 8. Meccanismo dell'apoptosi indotta da NO.

L'NO a dosi elevate provoca il danneggiamento del DNA e l'arresto del ciclo cellulare attraverso l'attivazione del pathway di p53/p21. Nel mitocondrio si ha il calo della proteina Bcl-2 ed il rilascio del citocromo *c* nel citosol che porta all'attivazione della caspasi 3 e all'esecuzione del programma apoptotico. Bersaglio della tossicità dell'NO è anche la citocromo *c* ossidasi, membro della catena di trasporto mitocondriale. Il danneggiamento della funzione mitocondriale porta all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

1. Inibizione reversibile della respirazione mitocondriale. In quest'ambito il principale bersaglio dell'NO è l'enzima citocromo *c* ossidasi cui si lega a livello dell'eme inattivandolo
2. Inattivazione irreversibile degli enzimi mitocondriali. Tra questi si hanno i complessi I, II, e III della catena respiratoria e gli enzimi del ciclo di Krebs, come l'aconitasi, cui l'NO si lega a livello dei centri ferro-zolfo.
3. Induzione del "mitochondrial permeability transition pore" (PTP) che media il rilascio del contenuto della matrice mitocondriale nel citoplasma.

Effetto antiapoptotico

L'effetto antiapoptotico dell'NO si distingue essenzialmente da quello proapoptotico in quanto si ottiene in presenza di basse concentrazioni (dell'ordine del nM). L'NO esercita gli effetti citoprotettivi attraverso la sua diretta o indiretta interazione con il macchinario apoptotico (Kim *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002; Manucha e Vallés, 2008) (*figura 9*).

Induzione delle proteine da stress. L'NO può ossidare il glutathione ridotto (GSH) intracellulare e quindi cambiare i livelli dell'antiossidante all'interno della cellula, provocando stress nitrosativo o ossidativo. Il calo dei livelli di GSH disponibili per la difesa allo stress ossidativo stimola l'induzione di proteine da shock termico (HSP) come l'HSP32 e l'HSP70, note proteine antiapoptotiche. Esse, infatti, sembrano mediare l'inibizione dell'attivazione delle caspasi (direttamente o indirettamente) attraverso il sequestro del citocromo *c* rilasciato nel citosol.

Accumulo del GMPc. L'NO è in grado di stimolare l'attività della GCs ed indurre l'accumulo del secondo messaggero GMPc. Il GMPc induce un calo della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare che rappresenta un segnale chiave utile all'instaurarsi del processo apoptotico. I meccanismi molecolari alla base dell'inibizione dell'apoptosi NO/GMPc-dipendente coinvolgono l'attivazione delle protein chinasi e l'inibizione dell'attivazione delle caspasi (Kim *et al.*, 1997). Quest'ultima favorirebbe poi l'aumento della proteina antiapoptotica Bcl-2.

Soppressione dell'attività delle caspasi. Tutte le caspasi contengono una singola cisteina nel sito catalitico che è essenziale per la loro attività. Il tiolo

della cisteina è suscettibile alle modificazioni redox e può essere S-nitrosilato in presenza di NO (Kim *et al.*, 1997). La reazione della cisteina con l'NO può prevenire efficacemente le attivazioni anomale delle caspasi.

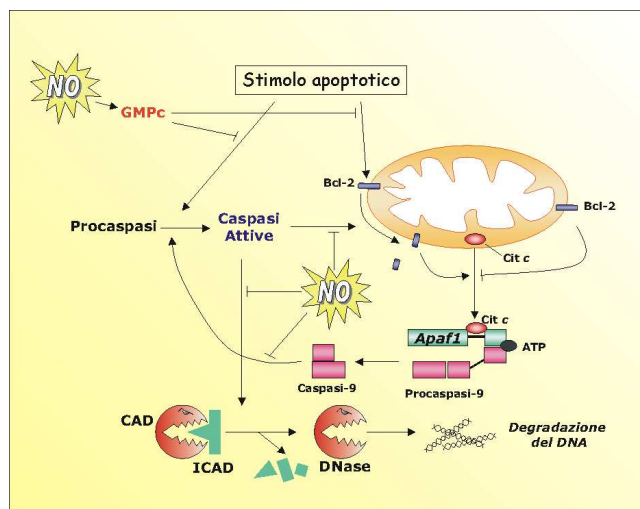


Figura 9. Effetto antiapoptotico dell'NO.

L'NO è in grado di S-nitrosilare la cisteina del sito attivo delle caspasi esecutrici del programma apoptotico portando alla loro inattivazione. Questo fenomeno impedisce la degradazione della proteina antiapoptotica Bcl-2 ed il rilascio dal mitocondrio del citocromo *c* utile all'attivazione delle caspasi.

Inibizione del rilascio di citocromo *c*. Il rilascio di citocromo *c* è un fattore essenziale nell'attivazione delle caspasi (Jiang e Wang, 2004) ed è notoriamente impedito dall'azione antiapoptotica della proteina Bcl-2. Assieme a Bcl-2 anche l'NO sembra essere direttamente coinvolto nell'inibizione del rilascio di citocromo *c* nel citosol. Poiché la stessa Bcl-2 è substrato delle caspasi, la S-nitrosilazione di quest'ultime previene

l'inattivazione della funzione antiapoptotica di Bcl-2 e conseguentemente il rilascio di citocromo *c* nel citosol.

Azione antiossidante dell'NO

Contrariamente agli effetti dannosi che l'NO e i suoi derivati (RSNO) possono apportare alle macromolecole biologiche, è stata dimostrata anche, la forte capacità antiossidante che questa molecola può esercitare a livello cellulare. Infatti, l'NO può funzionare da antiossidante intracellulare in molti sistemi biologici.

Uno dei determinanti fondamentali nell'azione antiossidante dell'NO è la sua "chimica", che può essere suddivisa in due diverse categorie di effetti: diretti e indiretti. Gli effetti diretti comprendono tutte quelle reazioni durante le quali, l'NO interagisce direttamente con il suo target biologico, mentre quelle indirette sono mediate dai RSNO che si formano dalle reazioni dell'NO con O_2 o con $O_2^{\cdot-}$. Inoltre, ciascuno di questi effetti dipende dalla concentrazione dell'NO: gli effetti diretti richiedono basse concentrazioni (range del nM), quelli indiretti avvengono quando i suoi livelli sono alti (range del μM -mM). E' noto, infatti, come elevate concentrazioni (range del μM -mM) di donatori di NO, come il sodio nitroprusside (SNP), possono indurre morte per apoptosi o necrosi (Pytlowany *et al.*, 2008). Tuttavia, alcuni studi effettuati *in vivo* ed *in vitro*, hanno mostrato come concentrazione nel range del μM di NO possono agire come antiossidanti (Suschek *et al.*, 1999).

L'NO svolge la sua funzione di antiossidante principalmente contro tre tipi di specie reattive: il perossido di idrogeno (H_2O_2), il $O_2^{\cdot-}$ e contro gli idroperossidi. Come noto, la reazione di Fenton avviene tra l' H_2O_2 e i metalli di transizione, risultando nella formazione di ione ferrico (III), di un radicale idrossilico e di un anione idrossilico. Il ferro (III) è poi ridotto, dall' H_2O_2 , a ione ferroso (II), un radicale perossido e un protone. Questi intermedi reattivi possono alterare le macromolecole biologiche quali, proteine, DNA e lipidi, provocando numerosi danni cellulari. L'NO può bloccare lo stress ossidativo a livello della reazione di Fenton, prevenendo la formazione di H_2O_2 e eliminando gli equivalenti riducenti prodotti a partire dall' $O_2^{\cdot-}$.

Per quanto riguarda il $O_2^{\cdot-}$ questo può reagire con l'NO portando alla formazione di $ONOO^{\cdot-}$, il quale rapidamente può essere convertito in nitrato in assenza di altre specie reattive. In questo modo l'NO inibisce la riduzione dello ione ferro e previene la formazione di ROS.

Infine, l'NO è in grado di proteggere le cellule anche dal danno ossidativo, mediato dalla perossidazione lipidica, che consiste nella formazione di una varietà d'idroperossidi (Wink *et al.*, 2001; Hummel *et al.*, 2006;), i quali provocano numerosi danni alle membrane cellulari. La reazione di questi radicali con l'NO avviene mediante la seguente reazione: $\text{LOO}^\cdot + \text{NO} \rightarrow \text{LOONO}$ e provoca l'inibizione della perossidazione lipidica.

Oltre a contrastare chimicamente lo stress ossidativo, l'NO è in grado anche di prevenirlo a livello cellulare. Per esempio, pre-trattamenti con donatori di NO, conferiscono protezione nei confronti della tossicità indotta dall' H_2O_2 (Chae *et al.*, 2001). Anche gli epatociti diventano resistenti all' H_2O_2 , dopo aver subito pre-trattamenti con l'NO (Kim *et al.*, 1995).

Inoltre, l'NO influenza lo stress ossidativo anche modulando l'espressione di alcuni enzimi antiossidanti: può prevenire l'assemblaggio della NADPH ossidasi, una delle maggiori fonti di ROS, limitando così la loro produzione (Shinyashiki *et al.*, 2004).

Un altro aspetto delle proprietà antiossidanti dell'NO è la sua capacità di prevenire l'induzione di molti geni attivati dai ROS. Lo stress ossidativo può indurre la trascrizione del gene che codifica per EGR-1 (early growth response-1), il quale mediante la via di ERK1/2 è in grado di attivare un gran numero di molecole di adesione. E' stato dimostrato che l'NO prodotto dalla eNOS, è in grado di inibire l'up-regolazione di tale pathway.

Per concludere, l'NO a basse concentrazioni, può bloccare lo stress ossidativo sia a livello fisiologico che pato-fisiologico. L'equilibrio tra NO e specie reattive, rappresenta un importante meccanismo regolatorio in molti processi fisiologici. Una perdita di tale equilibrio può, quindi, portare all'istaurarsi di differenti condizioni patologiche.

Regolazione delle NOSs

Data l'importanza dell'NO nei processi pato-fisiologici, la sua produzione attraverso le NOSs deve essere finemente controllata. L'attività delle NOSs, infatti, può essere controllata a livello trascrizionale (Geller and Biliar, 1998; Forsterman *et al.*, 1998), ma senza dubbio i processi di regolazione più frequenti e importanti sono quelli post-trascrizionali o post-traduzionali. Questi includono: 1) la regolazione dell'attività; 2) la regolazione della localizzazione; 3) lo splicing alternativo.

Regolazione dell'attività. L'attività delle NOSs può essere regolata fondamentalmente da interazioni proteina-proteina o da modificazioni

covalenti. La CaM è stata la prima proteina ad essere identificata come fattore in grado di modulare l'attività attraverso un'interazione diretta con la NOS. La Ca^{2+} -dipendenza della sintesi di NO distingue le isoforme costitutive della NOS (nNOS ed eNOS) che richiedono una maggiore presenza del Ca^{2+} , al contrario di quanto accade per la isoforma inducibile (iNOS). E' stato proposto che nella iNOS la presenza di un loop di 40-50 aminoacidi destabilizza l'interazione con la CaM a basse concentrazioni di Ca^{2+} ed inibisce il trasporto degli elettroni (Nischida *et al.*, 1999; Daff *et al.*, 1999).

Un altro meccanismo in grado di regolare l'attività enzimatica della NOS è quello che prevede la fosforilazione. Mentre per la eNOS è stato dimostrato che la fosforilazione sulla Ser1179, mediata dalla chinasi Akt, favorisce il flusso di elettroni durante il processo catalitico (Dimmeler *et al.*, 1999), la fosforilazione della nNOS sulla Ser847, da parte della chinasi CaM-dipendente, porta al calo dell'attività (Komeima *et al.*, 2000).

La nNOS presenta nella porzione N-terminale una regione costituita da 89 aminoacidi che è deputata al legame della proteina inibitrice dell'nNOS (PIN) (Fan *et al.*, 1998) con una stechiometria di 1:2 (PIN : nNOS). Il ruolo svolto da PIN è piuttosto controverso e dibattuto. Uno studio iniziale aveva proposto che il suo legame con la nNOS destabilizzasse il dimero attivo (Jaffrey e Snyder, 1996). Comunque, in studi recenti, è stato proposto che PIN, che in realtà è una proteina citoscheletrica, riveste un ruolo importante nel trasporto assonale dell'nNOS (Rodriguez-Crespo, 1998).

Lo chaperone Hsp90 sembra invece essere un regolatore esclusivo per l'attività della eNOS, probabilmente attraverso una modulazione allosterica che aumenta di circa tre volte la sintesi dell'NO. Le prove di una modulazione dell'nNOS da parte dell'Hsp90 sono sicuramente minori nonostante sia stato isolato l'eterocomplesso nNOS/Hsp90, che favorirebbe l'inserzione dell'eme nel dominio reduttasico in condizioni limitanti (Harris *et al.*, 2008).

Regolazione della localizzazione. La miristilazione e la palmitilazione sono delle modificazioni covalenti, che si verificano esclusivamente per la eNOS, che favoriscono l'attività promuovendo l'interazione della membrana plasmatica con la struttura delle caveole presenti nelle cellule endoteliali (Dudzinski e Michel, 2007). Le caveole sono microdomini proteici complessi del plasmalemma implicati in una vasta serie di funzioni cellulari che includono anche eventi di trasduzione del segnale.

La porzione N-terminale di 220 amminoacidi è, invece, esclusiva della forma neuronale della NOS e contiene il dominio PDZ (*figura 10*) che ancora la nNOS ai siti sinaptici nel muscolo scheletrico e nel cervello. L'interazione attraverso il PDZ con la PSD-95, che è a sua volta associata ai recettori NMDA, correla la funzione della nNOS ai recettori NMDA (Cristopherson *et al.*, 1999).

Espressione delle varianti di splicing. La nNOS è codificata da uno dei geni strutturalmente più complessi del genoma umano, specialmente in termini di utilizzo del promotore (Saur *et al.*, 2002; Boissel *et al.*, 2003; Bros *et al.*, 2006). La regolazione post-trascrizionale della nNOS avviene attraverso l'uso di uno splicing alternativo dell'mRNA (*figura 10*). Ancora oggi non è stato stabilito quali sono i meccanismi che determinano l'espressione di una o dell'altra variante e qual è il loro significato biologico.

Le prime varianti di splicing a essere identificate, nel tentativo di produrre un topo knock-out per l'nNOS, furono l'nNOS- β e - γ . La delezione dell'esone 2 nel gene della nNOS non portava, infatti, alla perdita completa dell'attività della nNOS (Huang *et al.*, 1993). Sia la nNOS- β sia la nNOS- γ mancano del dominio PDZ che è codificato proprio dall'esone 2 e che non può permetterne l'associazione con la PSD-95 sulla membrana a livello della sinapsi. Lo splicing dell'esone 2 fa parte di un processo fisiologico non ancora chiarito che porta alla formazione di proteine troncate all'N-terminale e che, oltre a non essere associate alla membrana, presentano anche una perdita di attività. Le attività catalitiche della nNOS- β (136 kDa) e della nNOS- γ (125 kDa) sono rispettivamente dell'80% e del 5% rispetto alla forma completa di 160 kDa (nNOS- α).

Esistono altre forme di nNOS: la nNOS- μ (165 kDa) (Ihara *et al.*, 2006) è la forma predominante nel muscolo scheletrico e contiene un inserto di 34 amminoacidi; la nNOS-2 (144 kDa) (Ogura *et al.*, 1993) è una forma cataliticamente inattiva che presenta una delezione nel dominio ossigenasico e che funziona da dominante negativo della nNOS.

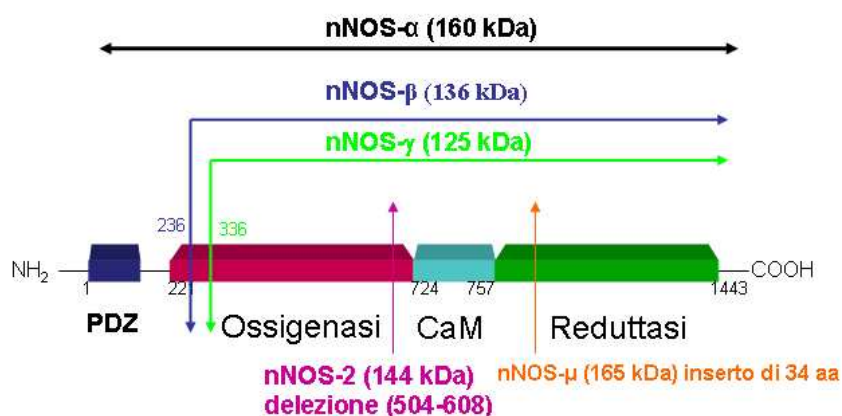


Figura 10. Varianti di splicing dell'nNOS.

Esistono ancora scarse informazioni a riguardo delle varianti di splicing della iNOS e non sono state ancora identificate quelle per la eNOS.

Stress nitrosativo/ossidativo e SOD1

Il sistema nervoso centrale è caratterizzato da un continuo flusso di ROS generato durante le reazioni neurochimiche, inoltre, è altamente aerobico e contiene un alto livello di substrati facilmente ossidabili (lipidi polinsaturi delle membrane cellulari). Oltre a ciò, il sistema nervoso possiede bassi livelli di difese antiossidanti, come la catalasi, (Reynolds *et al.*, 2007), pertanto la sopravvivenza delle cellule nervose è associata ad un delicato equilibrio fra produzione di specie ossidanti e difesa antiossidante. Lo stress ossidativo sopraggiunge quando questo delicato equilibrio viene alterato dall'attivazione impropria di alcuni processi metabolici o dalla diminuzione della difesa antiossidante e ciò può portare a neurodegenerazione che caratterizza diverse malattie come la malattia di Huntington, la malattia di Parkinson, l'Alzheimer e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Aslan e Ozben, 2004; Nicholls, 2008; Kaur e Ling, 2008; Danielson e Andersen, 2008). Queste specie ossidanti, i ROS, sono il risultato delle successive

riduzioni monoelettroniche fino alla completa riduzione dell'O₂ ad H₂O e possono essere suddivise in due categorie:

1. I radicali liberi dell'O₂ (ad es. il O₂^{•-} e il radicale idrossilico, OH[•]), che contengono uno o più elettroni spaiati (Nordberg e Arnér, 2001)
2. Le specie non radicaliche (ad es. H₂O₂).

I ROS possono essere generati in diversi distretti cellulari sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a vari stimoli. Le maggiori fonti di ROS sono i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare e il citosol. La catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, associata alla fosforilazione ossidativa, rappresenta la maggiore fonte cellulare di ATP. Durante questo processo metabolico l'1-2% degli elettroni che fluiscono lungo la catena di trasporto, sfuggono dai complessi proteici ed interagendo con l'O₂, generano O₂^{•-} soprattutto a livello dei Complessi I e III. Il O₂^{•-} può inoltre generarsi anche nella matrice mitocondriale a livello dell'ubichinone (Raha *et al.*, 2000).

L'H₂O₂ sembra giocare un ruolo importante in molti eventi cellulari come ad esempio nella biosintesi dell'ormone tiroideo e nell'attività microbica dei macrofagi. Essenzialmente non è una molecola in grado di provocare grossi danni, ma la sua tossicità deriva dalla facile reazione con i metalli di transizione a formare il OH[•], che è al contrario molto reattivo e capace di danneggiare irreversibilmente le macromolecole cellulari.

Altra fonte di ROS è la NADPH ossidasi localizzata principalmente sul plasmalemma delle cellule fagocitiche. L'assemblaggio e l'attivazione di questo enzima avviene in risposta ad una serie di stimoli che si realizzano nel corso della risposta infiammatoria.

La produzione di ROS può avvenire anche a livello recettoriale. Il fattore di necrosi tumorale (TNF α) è una citochina pro-infiammatoria che può legarsi ai recettori del TNF (TNFR1 e TNFR2). Il legame di TNF α al TNFR1 è associato all'induzione dell'apoptosi attraverso l'incremento intracellulare dei ROS (Woo *et al.*, 2000).

Nel reticolo endoplasmatico i ROS sono prodotti a livello del citocromo P450, nel citosol a livello della lipossigenasi, della ciclossigenasi e della xantina ossidasi. Fonti minori di ROS sono poi alcune molecole endogene o esogene che generano radicali in seguito a reazioni enzimatiche. Un esempio è rappresentato dall'aminoacido prolina: durante le prime fasi del processo apoptotico, mediato dall'accumulo della proteina p53, si evidenzia

l'attivazione della prolina ossidasi il cui potenziale riducente è poi scaricato sulla catena di trasporto degli elettroni generando ROS (Donald et al., 2001).

Oltre a tali processi i radicali liberi possono essere prodotti anche ad opera di molecole organiche esogene come xenobiotici e farmaci (Rotilio et al., 1985). Queste molecole vengono metabolizzate da reduttasi intracellulari ad intermedi con carattere radicalico, i quali successivamente riducono l'O₂ ritornando alla forma ossidata e producendo O₂⁻. Tale ciclo ossido-riduttivo, innescato da molecole esogene può generare un flusso di ROS.

Oltre ai ROS, il sistema nervoso centrale è a rischio ossidativo da parte dell'NO prodotto dalla nNOS. Infatti, la reazione dell'NO radicale con il O₂⁻ porta alla formazione di ONOO⁻, un RNS, con una velocità di reazione pari a $1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ che supera la costante di dismutazione del O₂⁻ da parte della superossido dismutasi a Cu,Zn (SOD1) ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Gli RNS, allo stesso modo dei ROS, hanno un ruolo importante nel sistema nervoso centrale, infatti, possono reagire con varie specie molecolari: il DNA, i tioli, gli amminoacidi ed i metalli, portando per esempio alla perdita delle funzioni enzimatiche, all'alterazione dell'integrità di membrana e alle mutazioni del DNA (Duncan et al., 2005). La nitratura delle tirosine è uno dei primi marker trovati nei tessuti cerebrali dei malati di Alzheimer, nelle placche caratteristiche della sclerosi multipla e nei motoneuroni dei pazienti affetti da SLA (Reynolds et al., 2007). Questi markers potrebbero semplicemente dipendere da fenomeni secondari e non essere la causa della degenerazione. Non esiste ancora una dimostrazione inequivocabile di una relazione causa-effetto fra la presenza dei segni dell'ossidazione e la neurodegenerazione, ma un numero sempre maggiore di dati sperimentali indica che gli agenti ossidanti inducono conseguenze patologiche che amplificano e propagano il danno, portando alla degenerazione irreversibile del tessuto nervoso (Perry et al., 2002).

Sperimentalmente, l'importanza dell'equilibrio tra specie ossidanti e antiossidanti nei processi neurodegenerativi è stata testata attraverso due approcci: eliminando o aumentando le difese antiossidanti.

Nel primo caso, è stato effettuato il silenziamento di vari enzimi antiossidanti in sistemi cellulari e animali. Ad esempio, l'eliminazione della SOD1 sia nei topi che nei sistemi cellulari, è associata ad un aumento dei danni e della morte a carico dei neuroni in presenza di ischemia (Troy et al., 1996). Conseguenze molto più importanti derivano dall'eliminazione della superossido dismutasi a manganese (SOD2) mitocondriale, letale già a livello embrionale per l'impatto sullo sviluppo del sistema cardiaco e del sistema nervoso centrale (Huang et al., 2001). Inoltre, per quanto riguarda le

difese non enzimatiche, si è dimostrato che topi mancanti di un trasportatore (ApoE) per l' α -tocoferolo (vitamina E) mostrano stress ossidativo e maggiore suscettibilità alla neurodegenerazione (Butterfield, 2002).

Nel secondo tipo di approccio, modificazioni genetiche e biochimiche attuate al fine di aumentare le difese antiossidanti, supportano l'idea che lo stress ossidativo è un meccanismo critico e comune nella neurodegenerazione. La sovraespressione della SOD1 protegge i ratti e i topi dall'ischemia (Endo *et al.*, 2007; Sugawara *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2003) e promuove la sopravvivenza delle cellule in coltura in presenza di stress ossidativo (Ciriolo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Anche la sovraespressione della glutatione perossidasi (GPx), come la somministrazione di molecole con attività superossido dismutasica, protegge il sistema nervoso centrale da una varietà d'insulti tossici (Barkats *et al.*, 2000; Mollace *et al.*, 2003). Parallelamente, in uno studio effettuato da Desnuelle e collaboratori, si dimostra come un aumento dell'apporto di vitamina E nei malati di SLA in associazione all'assunzione del farmaco anti-eccitotossico riluzolo, rallenta la progressione della malattia (Desnuelle *et al.*, 2001) e offre piccoli ma significativi benefici nei malati di Alzheimer (Sano *et al.*, 1997).

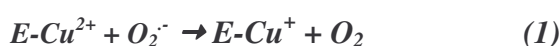
Per quanto invece riguarda la reattività degli RNS e in particolare dell' ONOO^- questa può essere in parte bloccata dall'azione della SOD1 che dismutando il $\text{O}_2^{\cdot-}$ ad O_2 e H_2O_2 , determina una diminuzione della sua formazione. Infatti, la SOD1 è un enzima deputato all'eliminazione del $\text{O}_2^{\cdot-}$ ed è presente fondamentalmente in tre forme: la SOD1 (localizzata nel citosol e nello spazio intermembrana mitocondriale), la SOD2 (localizzata nel mitocondrio) e la SOD extracellulare (SOD3). Questi enzimi dismutano il $\text{O}_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 e O_2 attraverso la seguente reazione:



In particolare, l'attività superossido dismutasica negli eucarioti è dovuta all'enzima citosolico contenente rame e zinco in quanto la sua concentrazione *in vivo* ammonta a circa 10 μM . Nell'uomo quest'enzima è costituito da 153 amminoacidi e da due subunità identiche di 16.5 kDa, unite da interazioni deboli non covalenti, ciascuna contenente uno ione zinco e uno ione rame. La struttura secondaria della SOD1 è costituita da foglietti β antiparalleli e presenta due anse che costituiscono il sito di legame allo zinco

e il canale elettrostatico attraverso il quale il $O_2^{\cdot-}$ è guidato verso il sito attivo. Studi di omologia tra enzimi provenienti da specie diverse, indicano che numerose regioni sono altamente conservate. Tra queste, oltre al già citato canale elettrostatico, vi è chiaramente la regione legante i metalli. Lo ione Cu^{2+} è legato a quattro imidazoli (His 46, 48, 63, 120) in una struttura tetraedrica in cui il quinto legame è occupato da una molecola di solvente (Gralla e Kosman, 1992). L'His 63 fa da ponte tra gli ioni Cu^{2+} e Zn^{2+} , legando di fatto entrambi. Lo ione Zn^{2+} sembra avere unicamente un ruolo strutturale e i due siti attivi della proteina dimerica sembrano essere ad una distanza tale (30Å) da non interagire l'uno con l'altro.

Lo ione Cu^{2+} rappresenta il sito catalitico della SOD1, durante le successive interazioni con l' $O_2^{\cdot-}$ alternativamente si riduce e si ossida secondo il seguente meccanismo:



Durante la catalisi si ha la formazione di H_2O_2 , pertanto la funzione antiossidante della SOD1 è legata all'attività degli enzimi a valle della dismutazione: la catalasi e la GPx. Dato il ruolo centrale della SOD1 nella protezione contro l' $O_2^{\cdot-}$, molti studi sono stati effettuati per cercare di comprendere la regolazione dell'enzima. Da questi risulta che la SOD1 è altamente influenzata dalla presenza del metallo che ne costituisce il sito attivo.

La disponibilità del rame per specifiche proteine intracellulari è mediata da trasportatori proteici denominati "chaperon" (Culotta *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 2008). La presenza di una proteina trasportatrice del rame (CCS) è indispensabile per l'incorporazione di questo metallo nel sito catalitico della SOD1 (Barry *et al.*, 2008). In questo studio è stato dimostrato che esiste una stretta omologia tra la sequenza amminoacidica della SOD1 e della CCS compresa la sequenza della SOD1 responsabile dell'interazione tra le due subunità. Inoltre, da studi condotti sia *in vitro* sia *in vivo* è stato scoperto un meccanismo d'incorporazione del rame che prevede un'interazione proteina-proteina tra la SOD1 e il CCS (Casareno *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2008). Infatti, studi di cinetica effettuati in precedenza, avevano dimostrato che il Cu^{2+} , una volta entrato nella cellula è in grado di legarsi al GSH, il quale in seguito lo trasferisce alla metallotioneina (MT) e infine alla SOD1, la quale,

quindi, può ricevere il Cu^{2+} anche attraverso una via alternativa al CCS (Ciriolo *et al.*, 1990).

La SOD1 umana è codificata da un gene (*sod1*) localizzato sul cromosoma 21q22. Questa regione è implicata nella più comune forma di malattia genetica: la sindrome di Down. In questa patologia, il corredo cromosomico risulta alterato dalla presenza della trisomia di tutto o parte del cromosoma 21. I soggetti affetti da questa sindrome sono, perciò, portatori di una copia accessoria della SOD1 che, paradossalmente, sembra indurre stress ossidativo ed essere responsabile della morte dei neuroni durante lo sviluppo embrionale e causa del ritardo mentale dei soggetti adulti. E' stato, inoltre, dimostrato che la forma familiare di sclerosi laterale amiotrofica (SLA), una malattia neurodegenerativa, è associata a differenti tipi di mutazioni nel gene *sod1* (Vandenberghe, 2006). La causa della SLA sembra essere dovuta a una mutazione "gain of function" (acquisto di funzione) del gene, piuttosto che un difetto di attività della SOD1. In accordo con tale osservazione, topi knock-out per la SOD1 (*SOD1*^{-/-}) sono vitali e non mostrano sintomi patologici della SLA. Tuttavia, questi topi presentano un'aumentata morte cellulare dei neuroni solo in seguito a ischemia-riperfusione, suggerendo che la presenza della SOD1 è indispensabile in condizioni di stress (Kondo *et al.*, 1997). Benché l'attività della SOD1 sia stata trovata alterata in diverse condizioni come nelle cellule tumorali, nel differenziamento delle cellule ematopoietiche, il gene *sod1* è spesso considerato un "housekeeping gene" e la sua espressione è regolata da una serie di fattori di trascrizione che riconoscono specifiche sequenze sul promotore del gene (Zelko *et al.*, 2002). Differenti analisi di delezione dimostrano l'esistenza di parecchie sequenze *cis*-agenti regolatrici posizionate al 5' del gene *sod1*: la regione del promotore situata tra i nucleotidi -59/-48 è considerata il sito di legame del fattore Sp1, mentre la C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) riconosce la sequenza tra i nucleotidi -64 al -55. Sp1 è un membro di una famiglia di fattori di trascrizione che si legano al DNA, caratterizzati da tre domini a dita di zinco che gli permettono di riconoscere sequenze ricche in guanosina e citosina (Yang *et al.*, 2000). Questa famiglia include anche altri membri omologhi a Sp1: come Sp2 Sp3 e Sp4. Anche C/EBP fa parte di una famiglia di fattori trascrizionali che include sia regolatori positivi (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ) che negativi (C/EBP γ , LIP, CHOP-10). Alcuni di questi fattori mostrano un'espressione e una regolazione tessuto-specifica. La regione di 1,5 Kb cui si legano questi fattori, può mediare la transattivazione non solo di Sp1, ma anche del fattore Egr-1 e della proteina WT1 del tumore di Wilms

(soppressore tumorale), suggerendo che lo stesso sito di legame potrebbe giocare un ruolo importante nel regolare l'espressione del gene *sod1*, in risposta ad una varietà di segnali biologici. Il ruolo della proteina WT1 nella regolazione del gene *sod1* non è ancora del tutto chiaro, ma sembra che riesca a stabilizzare p53, inibendo la sua capacità di indurre apoptosi (Minc *et al.*, 1999). Studi più recenti, hanno dimostrato che il sito di attacco della proteina C/EBP è parzialmente sovrapposto e coincide con la sequenza cui si legano Sp1 ed Egr-1 (posizioni -59/-48), suggerendo l'esistenza di una complessa rete d'interazioni tra i fattori che regolano l'espressione del gene *sod1* (Afonso *et al.*, 2006).

Glutatione (GSH)

Accanto alla SOD1 anche il GSH svolge un importante ruolo di attenuare e/o bloccare gli effetti tossici dei ROS. Il GSH è considerato il principale sistema tampone ossido-riduttivo cellulare appartenente alla famiglia dei tioli (Anderson, 1998; Townsend *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Mediamente, la concentrazione citosolica del GSH varia da 1 a 10 mM (Smith *et al.*, 1996) ed è di gran lunga più elevata rispetto a molti altri composti redox attivi fisiologici.

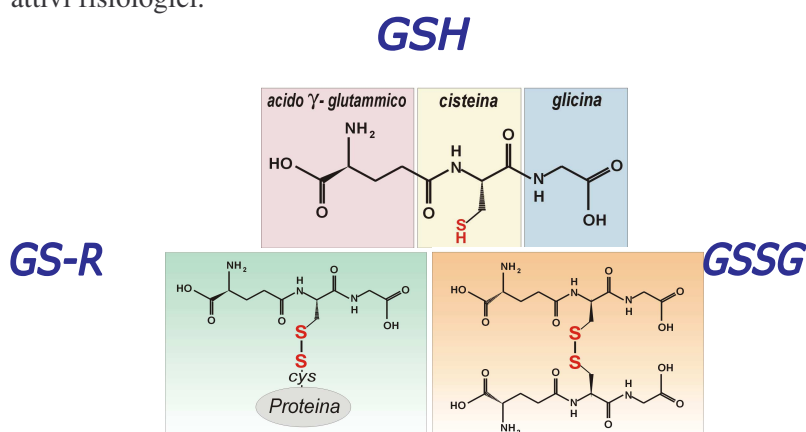


Figura 11. Il Glutatione

Forme redox in cui può presentarsi il tripeptide: ridotta o tiolica (GSH); ossidata a disolfuro (GSSG) e a disolfuro misto a proteine (GS-R).

Sovente si cerca di dare una stima dello stato redox di un sistema cellulare prendendo in esame il rapporto [GSH]/[GSSG].

All'interno delle cellule il GSH si può presentare sotto forma ridotta, o tiolica, (GSH); sotto forma ossidata, in cui due molecole sono unite da un ponte disolfuro, (GSSG); come disolfuro misto con proteine, in cui il legame si instaura tra l'atomo di zolfo del tripeptide ed un residuo di cisteina della proteina, (GS-S-Prot o GS-SP o GS-R) (*figura 11*). La reazione di ossidazione che porta alla formazione del GSSG è mediata dall'enzima glutatione perossidasi (GSH-Px) e da alcune transidrogenasi. La riduzione del GSSG a GSH è invece catalizzata dall'enzima glutatione reduttasi (GSSG-Red), flavoproteina che utilizza NADPH come fonte di elettroni (Filomeni *et al.*, 2002).

SCOPO DEL LAVORO

Nonostante la nNOS sia stata ritrovata in molti tessuti e in differenti tipi cellulari, la sua espressione è predominante a livello del sistema nervoso, dove il suo prodotto, l'NO, gioca un ruolo chiave come neuromodulatore e neurotrasmettitore. La sua sintesi è finemente controllata e mediata dalla stimolazione dei recettori NMDA, in grado di indurre l'aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} e stimolando così la conversione di arginina in citrullina e NO (Frade *et al.*, 2008). Benchè il sistema nervoso rappresenti una regione dell'organismo altamente aerobia, i livelli della sua difesa antiossidante sono relativamente bassi, quindi si ipotizza che la nNOS con il suo prodotto NO e gli antiossidanti intracellulari, interagiscano allo scopo di mantenere l'equilibrio della cellula nervosa. La SOD1 e il GSH rappresentano due degli antiossidanti che potrebbero interagire in modo diretto o indiretto con la nNOS o con l'NO, a livello del sistema nervoso. Inoltre, recenti studi condotti *in vitro*, hanno evidenziato lo stretto sinergismo tra la SOD1 e la nNOS, anche dal punto di vista trascrizionale, e l'importanza della loro corretta funzionalità per mantenere l'integrità e l'efficienza della cellula nervosa. E' stato, infatti, dimostrato che l'NO non è l'unico prodotto della reazione di catalisi della nNOS poiché, in particolari condizioni (come l'assenza del cofattore BH_4), il suo dominio ossigenasico può generare O_2^- , determinando così l'inattivazione dell'enzima (Yoneyama *et al.*, 2001). Recenti dati in letteratura, mostrano, inoltre, una correlazione tra i due enzimi, anche dal punto di vista trascrizionale, infatti, sembra che alcuni fattori di trascrizione regolano l'espressione di entrambe le proteine, in risposta a diversi segnali biologici (Minc *et al.*, 1999; Saur *et al.*, 2002;). Ad esempio Sp1, insieme ad altri fattori come Egr-1 e WT1, sembra regolare la trascrizione del gene *sod1*, legandosi ad una sequenza del suo promotore. Recenti dati in letteratura, mostrano, inoltre, che la S-nitrosilazione di gruppi tiolici presenti in alcuni fattori di trascrizione, tra i quali Sp1, può impedire il loro legame a DNA (Martínez-Ruiz e Santiago Lamas, 2004). In particolare per Sp1 la S-nitrosilazione del gruppo tiolico determinerebbe un cambiamento conformazionale della struttura *zinc finger* impedendo il riconoscimento delle sequenze conservate sul DNA da parte del fattore di trascrizione. Attraverso questo meccanismo la nNOS potrebbe inibire il fattore di trascrizione Sp1 impedendogli di legare il promotore del gene *sod1*.

Infine, come dimostrazione dell'esistenza di questo cross-talk tra SOD1 e nNOS, alcuni studi hanno mostrato che cellule trasfettate con la forma mutata, pro-ossidante della SOD1, G93A, presentano un decremento dell'attività e del contenuto proteico della nNOS (Rotilio *et al.*, 2002;

Aquilano *et al.*, 2003). Questo sembra essere un evento indispensabile per mantenere l'omeostasi della cellula nervosa.

Inoltre, come accennato in precedenza i livelli di GSH possono essere modulati dall'interazione con l'NO/nNOS. Alcuni autori hanno, infatti, dimostrato che il GSH, oltre a proteggere le cellule dallo stress ossidativo (Schafer and Buettner, 2001; Filomeni *et al.*, 2004; Aquilano *et al.*, 2006), è in grado di bloccare la citotossicità mediata dall'NO, in una varietà di tipi cellulari. In particolare, è stato dimostrato che sotto esposizione di donatori di NO, si osserva un aumento dei livelli intracellulari di GSH (Moellering *et al.*, 1998).

Oltre a tali funzioni, negli ultimi anni è stata rivalutata e sottolineata anche la funzione antiossidante svolta dall'NO. E' stato, infatti, dimostrato che l'NO a basse concentrazioni, può esercitare un ruolo protettivo nei confronti del danno ossidativo mediato dai ROS, funzionando come una molecola antiossidante che direttamente è in grado di eliminare le specie reattive come il OH[•], oppure provocando un aumento delle difese antiossidanti intracellulari.

Sulla base di queste conoscenze l'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare se la nNOS potesse avere un ruolo nella protezione dallo stress ossidativo o nell'induzione della morte cellulare indotta dai derivati dell'aglio: disolfuro di diallile (DADS) e garlic extract (GE). Inizialmente, abbiamo incentrato la nostra attenzione sugli effetti del DADS e del GE, in differenti modelli cellulari neuronali (SH-SY5Y e NSC34). Successivamente, ci siamo interessati agli effetti del trattamento con DADS e GE sui livelli di nNOS e di NO, e al loro ruolo da antiossidanti. E' stato delineato il *pathway* molecolare alla base degli effetti pro-ossidanti e pro-apoptotici indotti dai derivati dell'aglio ed il meccanismo alla base della sopravvivenza della cellula nervosa mediato dalla nNOS. E' stato quindi analizzato l'effetto della sovraespressione della nNOS nel bloccare il danno indotto dallo stress ossidativo.

Nella seconda fase di questo studio è stato approfondito, invece, come un flusso endogeno di NO, dovuto a sovraespressione dell'enzima nNOS, possa influenzare l'omeostasi cellulare e l'espressione di due antiossidanti intracellulari, quali la SOD1 e il GSH. Sono stati, quindi, esaminati, i cambiamenti di espressione di questi due antiossidanti, l'aumento di produzione dell'NO e i possibili eventi di nitrificazione in differenti linee cellulari di origine neuronale e non. Infine, basandoci su alcuni studi presenti in letteratura, abbiamo analizzato i meccanismi trascrizionali attraverso i

quali la nNOS sembra regolare la trascrizione di alcuni geni tra i quali quello della SOD1.

PROCEDURE SPERIMENTALI

Materiali

Disolfuro di diallile (DADS), dimetilsulfossido (DMSO), NBT (nitro blu di tetrazolio), ditioneitrato (DTT), Triton X-100, acido retinico, cocktail degli inibitori delle proteasi, ioduro di propidio, proteina A-agarosio, IgG secondarie coniugate alla perossidasi anti-anticorpi di coniglio e topo, acrilammide/bis-acrilammide, anticorpi monoclonali anti-GAP43, anti- α -tubulina, anti-catalasi, anti-p53, tutti gli altri reagenti chimici necessari a costituire i tamponi (lisi, corsa e trasferimento), i terreni di coltura (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DME-F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture, Ham's F12 Medium e RPMI: Roswell Park Memorial Institute) e tutti i reagenti necessari sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). L'anticorpo anti p-H2A.X è stato acquistato dall'Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA). L'anticorpo monoclonale anti-lamina A/C è stato acquistato dall'UCS Diagnostic (Morlupo, Roma, Italia). Gli anticorpi monoclonali anti-Sp1, anti-nNOS, anti-p-c-Jun, anti-p-c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK) e policlonali anti-Sp1, anti-SOD1 sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorpo monoclonale anti-nNOS è stato acquistato dalla Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), le membrane di nylon provengono, invece, dall'Amersham Biosciences (Piscataway, NY, USA). 7-Nitroindazolo (7-Ni), carbobenzossi-L-leucil-L-leucil-L-leucinale (MG132), 6-anilino-5,8-chinolinechinone (LY83583), N^G-nitro-L-arginina-metil-estere (L-NAME), L-NG-metilarginina (L-NMA), 2-(4-carbossifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-ossil-3-osside (carbossi PTIO), N^o-Propil-L-arginina (NPA), 4,5 diamminofluoresceina diacetato (DAF2/DA), Hoechst 33342 provengono dalla Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA). La FITC e gli anticorpi secondari Alexa Fluor488[®] e Alexa Fluor568[®] sono stati acquistati dalla Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Il Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit e l'inibitore delle RNasi (RNasin) sono stati acquistati presso la Promega (Madison, WI), il substrato chemiluminescente ChemoGlow proviene dalla Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA, USA). Il kit per la marcatura con BrdU è stato acquistato dalla GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Trizol, Platiumum Taq Polymerase, M-MLV, i primer per l'RT-PCR, Opti-MEM, DHE (diidroetidio) dalla Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Il Kit Oxybloy kit è stato acquistato dall'Intergen (Purchase, NY, USA). L'anticorpo policlonale anti-nitrotirosine c'è stato gentilmente donato dal Dr. A.G. Estevez (Burke

Medical Research Institute, White Plains, New York, USA). Tutti gli altri reagenti chimici sono stati acquistati dalla Merck (Darmstadt, Germany).

Culture cellulari

Le linee cellulari di neuroblastoma umano SH-SY5Y e di adenocarcinoma gastrico AGS (gastric adenocarcinoma cells) sono state ottenute dalla European Collection of Cell Culture. L'ibridoma NSC34, ottenuto dalla fusione di cellule di neuroblastoma con neuroni motori di topo, è stato donato dal Dr. Neil R. Cashman (University of Toronto, Canada). Le cellule di neuroblastoma umano CHP100 sono state gentilmente donate dal Prof. Spinedi (Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Italia). La linea SH-SY5Y è stata coltivata in terreno D-MEM-F12 supplementato con FCS (Fetal Calf Serum) al 10%, glutammina 2 mM e 100 U/ml di una soluzione antibiotica costituita da penicillina e streptomycin. La linea cellulare CHP100 è stata coltivata in RPMI, la linea AGS in F12 e le NSC34 in DMEM, tutti supplementati con FCS al 10%, glutammina 2 mM e 100 U/ml di una soluzione antibiotica costituita da penicillina e streptomycin. I monostrati cellulari venivano mantenuti a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO₂ e arrivati a confluenza, venivano staccati con una soluzione di tripsina allo 0.25% e la sospensione cellulare centrifugata e riseminata in terreno fresco. L'uso della tripsina è stato sostituito con il distacco meccanico, mediante l'impiego di scraper sterili, solo nel caso in cui le cellule venivano utilizzate per il dosaggio del glutathione. È dimostrato, infatti, che l'uso della tripsina altera il contenuto intracellulare del tripeptide innalzandone i valori e falsando le misure.

Trasfezioni

Prima della trasfezione, le cellule venivano piastrate alla concentrazione di 4×10^5 cell/ml. 24h dopo il piastramento, le cellule erano staccate mediante una soluzione di tripsina allo 0,25%, lavate in Opti-MEM, centrifugate e risospese in una soluzione di Opti-MEM, D-glucosio 6 mM e β -mercaptoetanololo 0,11 mM cui erano aggiunti i seguenti plasmidi transienti: PME18S vuoto o contenente il cDNA codificante per la nNOS di ratto, gentilmente donato dal Prof. Watanabe Y. (University of Kagawa, Facoltà di Medicina, Kida-gun, Japan). Le cellule venivano subito elettroporate in apposite cuvette tramite l'elettroporatore Gene Pulser xcell system (Bio-Rad). Successivamente, le cellule venivano ripiastrate in terreno

fresco, rispettando la proporzione di 1:1,33 rispetto al volume iniziale. Le cellule sono state utilizzate a 48h dalla trasfezione, tempo necessario per ottenere una buona sovraespressione della proteina e dell'attività della nNOS. L'efficienza di trasfezione è stata determinata co-trasfettando i plasmidi con il vettore p-Tracer GFP, e in seguito analizzando la fluorescenza della GFP tramite microscopia. Solo esperimenti con un'efficienza di trasfezione superiore all'80% sono stati presi in considerazione.

Trattamenti

Il disolfuro di diallile (DADS) è un solfuro organico estraibile dall'aglio e in grado di indurre apoptosi attraverso l'attivazione di differenti protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK). Per questa ragione è stato utilizzato per indurre stress ossidativo in cellule SH-SY5Y e NSC34. Prima di ciascun esperimento, una soluzione di DADS 50 $\mu\text{mol/L}$ è stata preparata disciogliendo 5.5 mmol/L di DADS in DMSO. Le cellule sono state trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ di DADS, concentrazione ottimale per indurre un significativo grado di arresto della crescita cellulare e di induzione dell'apoptosi, ed è inoltre la concentrazione usata per studi effettuati *in vivo* (Wu *et al.*, 2001). Nel controllo, è stata aggiunta la medesima concentrazione di DMSO.

Per quanto riguarda l'estrazione del GE: gli spicchi di aglio erano omogenizzati in tampone fosfato (1:3 w/v), centrifugati, filtrati e il supernatante è stato suddiviso in aliquote e conservate a -20°C . Per ciascun trattamento il GE è stato aggiunto alle cellule alla concentrazione dell'1% v/v (corrispondente alla concentrazione di DADS presente nell'1% v/v dell'estratto oleoso) (Amagase *et al.*, 2001). Come accennato precedentemente, questa concentrazione è la più significativa nell'indurre arresto della crescita cellulare e induzione di apoptosi (De Martino *et al.* 2006).

Sono stati inoltre utilizzati i seguenti chemioterapici: idrossiurea (4 mmol/L), un agente chemioterapico il cui meccanismo d'azione si basa sull'inibizione della Ribonucleotide Reduttasi; doxorubicina (1 $\mu\text{mol/L}$), un'antraciclina utilizzata nella cura di vari tipi di cancro che agisce intercalandosi al DNA e bloccando la progressione della Topoisomerasi II; etoposide (10 $\mu\text{mol/L}$), anch'essa un agente chemioterapico in grado di inibire l'attività della Topoisomerasi II; staurosporina (0,15 $\mu\text{mol/L}$) isolata dal batterio *Streptomyces staurosporeus*, viene usata come anti-tumorale in

quanto è in grado di inibire l'attività di alcune protein chinasi, bloccando il sito di legame dell'ATP; *cis*-platino (7 $\mu\text{mol/L}$), un chemioterapico che legandosi al DNA causa delle rotture al doppio filamento portando le cellule all'apoptosi. Le concentrazioni dei seguenti chemioterapici sono state scelte, tramite degli esperimenti di dose-risposta, per ottenere il maggior tasso di apoptosi a 24 h dal trattamento.

NPA (N(omega)-Propyl-L-arginine), un inibitore delle NOSs (sciolto in acqua) e il 7-Ni, un inibitore specifico della nNOS (dissolto in DMSO), sono stati utilizzati alla concentrazione di 1 e 0.2 mmol/L, rispettivamente, e aggiunti 1h prima del trattamento con DADS o GE e mantenuti per tutto l'esperimento.

Per il differenziamento, le cellule sono state trattate per 5 giorni con 30 $\mu\text{mol/L}$ di acido retinoico (RA), tempo sufficiente per indurre l'arresto della proliferazione cellulare, l'acquisizione della tipica morfologia (arborizzazione dendritica) e la sovraespressione di proteine tipiche del differenziamento (per es. la proteina associata alla crescita, GAP43).

I trattamenti con 7-Ni, L-NAME, un inibitore delle NOSs (sciolto in acqua), carbossi PTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, potassium salt), scavenger di NO (dissolto in DMSO) e LY83583, inibitore della GCs e della produzione di GMPc (dissolto in etanolo), sono stati eseguiti alle concentrazioni di 10 μM , 100 μM , 25 μM e 2 μM rispettivamente, che non sono tossiche per le cellule. I trattamenti sono stati aggiunti alle cellule subito dopo trasfezione transiente e mantenuti per tutto l'esperimento.

La butionina sulfossimina (BSO) è una molecola in grado di ostacolare la sintesi del GSH attraverso l'inibizione dell'enzima γ -glutammina cisteina sintetasi. La BSO è stata aggiunta alle colture cellulari alla concentrazione di 1 mM subito dopo la trasfezione e mantenuta per i tempi sperimentali.

L'MG132 è una molecola in grado di inibire l'attività del proteasoma, complesso multienzimatico responsabile della degradazione delle proteine cellulari. È stata utilizzata alla concentrazione di 10 μM per i tempi sperimentali indicati nelle figure riportate nella sezione dei "Risultati".

Determinazione della morte e della vitalità cellulare

Marcatura dei nuclei con ioduro di propidio

Le cellule apoptotiche sono state identificate tramite tecniche di citofluorimetria a flusso che permettono di stabilire non solo il tipo di morte cellulare, ma anche la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo. Le cellule sono state trattate con una soluzione di Triton X-100 allo 0.1% e ioduro di propidio (5 µg/ml); il detergente solubilizza la membrana plasmatica, lasciando intatta quella nucleare, mentre il fluoroforo si intercala nel DNA evidenziando, a seconda dell'intensità di fluorescenza emessa, i nuclei diploidi (fase G1), tetraploidi (fase G2/M) e ipodiploidi (Nicoletti *et al.*, 1991). Questi ultimi rappresentano i nuclei apoptotici tardivi caratterizzati dal fatto di possedere DNA tagliato in frammenti da 200bp o multipli di questi.

MTS-test

La vitalità cellulare è stata determinata attraverso il metodo colorimetrico MTS-test. La metodica si avvale del Kit *CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) contenete un composto tetrazolico [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H tetrazolio, MTS] noto anche come reagente di Owen. Questo composto, in seguito ad un processo di riduzione, si trasforma in un sale di formazano solubile e colorato. La riduzione, nelle colture cellulari, avviene, probabilmente, grazie alla presenza di NADPH e NADH, prodotti dalle deidrogenasi in cellule metabolicamente attive. Il saggio è stato eseguito seminando le cellule in piastre da 96 pozzetti e aggiungendo la soluzione in concentrazione 1:10 rispetto al volume di terreno. Dopo 4h di incubazione a 37°C, il terreno risulta colorato in proporzione al numero di cellule vitali presenti in coltura. Aliquote di terreno sono state prelevate e utilizzate per la determinazione dell'assorbanza mediante spettrofotometro a $\lambda=490\text{nm}$.

Conta diretta mediante Trypan blue

Il numero di cellule vitali e di quelle morte è stata anche determinata attraverso conta diretta mediante esclusione da Trypan blue. Le cellule venivano risospese in una soluzione di Trypan blue (0,016%) e contate

utilizzando un emocitometro di Thoma. La vitalità era determinata tramite la capacità delle cellule vitali di escludere il Trypan blue. Questo composto, infatti, è in grado di attraversare la membrana plasmatica solo nel caso in cui vi sono delle alterazioni a suo carico, evidenziando in questo modo le cellule morte.

Marcatura con BrdU

Un altro metodo utilizzato per analizzare la proliferazione cellulare è stato l'uso del "Cell Proliferation kit" (Buckinghamshire, UK) basato sull'incorporazione della 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) nel DNA delle cellule in fase S. Per far ciò le cellule sono state fatte crescere in piastre per colture cellulare da 6 pozzetti contenenti un vetrino coprioggetti sterile. Successivamente le cellule sono state marcate con BrdU seguendo i tempi e le concentrazioni indicate dalla casa produttrice. I vetrini, sui quali erano in aderenza le cellule, sono stati prelevati e sciacquati una volta in PBS e ricoperti con una soluzione di paraformaldeide a 4% per 10min, in modo da fissare le cellule. A ogni passaggio successivo e tra un passaggio e un altro i vetrini verranno risciacquati con PBS. Nel passaggio successivo, i vetrini sono stati trattati con una soluzione di anticorpo secondario coniugato con la FITC anti-IgG2a (monoclonale). L'ultimo passaggio prevede l'aggiunta di un marcatore del DNA, l'Hoechst 33342, 1:1000 in PBS/FCS 10% per 10min. Il vetrino coprioggetti verrà poggiato su un portaoggetti interponendo una goccia di una soluzione di PBS/glicerolo 1:1 ed è così pronto per essere osservato al microscopio a fluorescenza (Nikon). Essendo quest'ultimo collegato a una videocamera digitale (CoolSnap) abbiamo la possibilità di ottenere delle immagini digitalizzate da analizzare, attraverso l'uso di un software (Adobe Photoshop CS4).

In questo modo si contava il numero di cellule positive alla BrdU rapportandole al numero di cellule totali presenti nello stesso campo scelto come rappresentativo.

Lisi delle cellule

Per ottenere i lisati totali, i pellet cellulari venivano risospesi in Tampone di Lisi contenente 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% IGEPAL CA-630, cocktail d'inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (40 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄).

La frazione nucleare è stata ottenuta lisando i pellet in Tampone di Lisi contenente 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (40 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄). I nuclei venivano successivamente centrifugati a 2000g per 5min a 4°C, risospesi in 50 µl di tampone HSB (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% TritonX-100, 0,5% NP-40, 10% glicerolo, inibitori delle proteasi e inibitori delle fosfatasi (40 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) e incubati 30min su un piano rotante a 4°C. Gli estratti venivano centrifugati a 22000g per rimuovere i detriti nucleari e il supernatante veniva conservato a -80°C.

Per la determinazione del contenuto di GSH, i pellet cellulari erano lisati tramite cicli di congelamento in azoto liquido e riscongelo lento a temperatura ambiente.

Determinazione delle proteine totali

La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Il metodo consiste nella riduzione, in una soluzione alcalina con ioni Cu²⁺, di alcuni residui, per mezzo del reattivo di Folin-Ciocalteu. Gli amminoacidi principalmente ridotti sono il triptofano, la tirosina, la cisteina e l'istidina. Il triptofano e la tirosina reagiscono per mezzo dei loro gruppi fenilici particolarmente reattivi, la cisteina attraverso il gruppo -SH e l'istidina con l'anello imidazolico. Il prodotto della reazione di riduzione è evidenziato dalla formazione di composti colorati in azzurro che hanno il massimo di assorbimento a 695nm. La concentrazione proteica è stata calcolata in base ad una retta di taratura ottenuta utilizzando varie concentrazioni di BSA come standard.

Determinazione del glutatione mediante HPLC

Il dosaggio del glutatione è stato effettuato in seguito alla formazione di S-carbossimetil derivati dei tioli liberi con acido iodoacetico, seguita dalla conversione dei gruppi -NH₂ terminali a 2,4-dinitrofenil derivati, dopo la reazione con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (Reed *et al.*, 1980).

Le cellule sono state accuratamente lavate con PBS, centrifugate a 700g per 7min e conservate a -80°C. Al momento della determinazione del glutatione, le cellule sono state risospese in tampone riducente costituito da PBS/HCl 0.01 M 1/1. Il lisato cellulare era ottenuto mediante cicli ripetuti di congelamento in azoto liquido. Le proteine sono state precipitate in acido

metafosforico al 5%. Dopo centrifugazione a 22300g per 30min, i tioli a basso peso molecolare presenti nel supernatante, venivano derivatizzati con acido iodoacetico al 10% v/v (15 mg/ml) e neutralizzati con NaHCO₃. Dopo 1h di incubazione al buio veniva aggiunta una soluzione di 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene all'1.5% v/v (1.5 ml/98.5 ml di etanolo assoluto). Dopo aver aggiunto il reattivo di Sanger, i campioni venivano incubati per 12h al buio e la separazione dei tioli era eseguita su una colonna da HPLC μ Bondpack NH₂, 3.9×300 mm (Waters). GSH e GSSG purificati sono stati usati come standard. I risultati sono espressi come nmoli di GSH/mg di proteine presenti nel campione lisato.

Determinazione dei ROS e dello stress ossidativo

Determinazione della concentrazione di superossido

Il superossido è considerato come una delle specie ROS più abbondanti. La sua concentrazione intracellulare è stata determinata tramite l'uso del *diidroetidio* (DHE), un marcatore specifico per questo radicale. Il diidroetidio, una volta ossidato, si trasforma in etidio, esibendo fluorescenza nel rosso. Lo spostamento è direttamente proporzionale al quantitativo di O₂⁻ contenuto nelle cellule. L'incubazione avveniva con 5 μ M DHE per 30min a 37°C. Dopodiché, le cellule venivano centrifugate, lavate con cura e risospese in PBS. Le cellule sono state analizzate con citofluorimetria a flusso previa marcatura con la sonda DHE. La quantità di radicale superossido valutata su 10.000 cellule per ogni campione, veniva quantificata in base allo spostamento dell'intensità di fluorescenza della popolazione cellulare marcata con diidroetidio.

Misura delle proteine carbonilate

Le proteine carbonilate sono state identificate a partire da estratti totali ottenuti come descritto nella sezione "Lisi delle Cellule", derivatizzando i carbonili, eventualmente formati sui gruppi laterali delle proteine, con dinitrofenilidrazina (DNP) per 15min a 37°C. In seguito i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12% e le proteine carbonilate sono state identificate mediante immunoblot attraverso l'uso di un anticorpo policlonale anti-DNP. Come controlli negativi sono stati utilizzati campioni,

non derivatizzati. La derivatizzazione è stata possibile grazie al kit *OxyBlot®*.

Immunolettroforesi (Western blot)

Per tutte le proteine prese in esame in questo studio, la quantità di proteine immunoreattive è stata determinata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in fase denaturante (SDS-PAGE), seguita da trasferimento su membrana di nitrocellulosa.

- L'elettroforesi in sodio dodecil solfato (SDS) è un metodo analitico che permette di separare, grazie all'azione di un campo elettrico costante e dell'"effetto setaccio" dovuto alle maglie di acrilammide, molecole diverse in base al peso molecolare. L'SDS è un denaturante proteico dotato di una testa polare a carica negativa grazie alla quale rende omogenea la carica netta delle singole proteine. Il suo utilizzo durante il trattamento del campione, nel tampone di corsa e nel gel di poliacrilammide, assicura quindi una separazione delle proteine solo in base al peso molecolare.
- All'elettroforesi è seguito il trasferimento delle proteine, contenute nel gel, su membrana, supporto più o meno poroso, capace di mantenere adsorbite le molecole separate in precedenza. Il trasferimento avviene in presenza di tampone contenente TRIS 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 e metanolo al 20% ed ottimizzato mediante l'applicazione di corrente (100mA) per una notte. In alternativa al trasferimento classico si può applicare una corrente molto più elevata (fino a 500mA) per un periodo di tempo limitato (2h) mantenendo l'apparecchiatura a temperature basse (4°C) per evitare il surriscaldamento della membrana. L'efficienza di trasferimento è verificata colorando il gel con blue Coomassie e/o la membrana con rosso Ponceau (colorante labile che può essere allontanato mediante semplici lavaggi in acqua o PBS).
- La rilevazione immunoenzimatica delle proteine adsorbite viene condotta mediante incubazione della membrana con specifici anticorpi (anticorpo primario); per mantenere integra l'immunoglobulina utilizzata per il dosaggio, si può scegliere tra un tempo di incubazione lungo a basse temperature (tutta la notte a 4°C) o più breve (2-3h) a temperatura ambiente. Dopo opportuni lavaggi si opera aggiungendo un secondo anticorpo (anticorpo secondario) che riconosce il primario e che lega l'enzima perossidasi. Avvalendosi dell'uso del luminolo come substrato

della perossidasi, si ottiene un prodotto chemiluminescente, la cui radiazione luminosa viene impressionata su lastra fotografica.

- La densità delle bande immunoreattive è stata calcolata utilizzando il Software Quantity one (Bio-Rad) e normalizzata per il controllo di caricamento (α -tubulina o catalasi) e riportata come unità arbitrarie (a.u.).

Le concentrazioni di anticorpo primario usate sono state le seguenti: anti-nNOS (1:500), anti-p-JNK (1:1000), anti-p-c-Jun (1:1000), anti- α -tubulina (1:5000), anti-catalasi (1:2000), anti-SOD1 (1:2000), anti-nitrotirosina (1:500), anti-Sp1 (1:500), anti-lamina A/C (1:2000), anti-p53 (1:1000), anti-H2B (1:2000). Gli anticorpi secondari HRP-coniugati sono stati, invece, usati in un range di concentrazione da 1:3000 a 1:10000 a seconda del tipo e della concentrazione di anticorpo primario utilizzato.

Marcatura delle cellule per immunofluorescenza

La determinazione del quantitativo e della localizzazione delle proteine intracellulari può essere effettuata anche per immunofluorescenza. La tecnica si avvale di anticorpi secondari marcati con molecole fluorescenti e perciò in grado di emettere luce se eccitate con raggi di opportuna lunghezza d'onda. Le cellule devono essere precedentemente fissate e opportunamente permeabilizzate.

Il protocollo usato prevede il fissaggio delle cellule su vetrino. Per far ciò, le cellule sono state fatte crescere in piastre per colture cellulari da 6 pozzetti contenenti un vetrino coprioggetti sterile. I vetrini, sui quali erano in aderenza le cellule, sono stati prelevati e sciacquati una volta in PBS e successivamente ricoperti con una soluzione di paraformaldeide al 4% per 10min, in modo da fissare le cellule. A ogni passaggio successivo e tra un passaggio e un altro i vetrini verranno risciacquati con PBS. Nel passaggio successivo, i vetrini sono stati ricoperti con una soluzione di PBS/Triton X-100 0.4% per 10min, in modo da permeabilizzare le membrane cellulari. In seguito sono stati sottoposti a un'operazione di bloccaggio delle interazioni aspecifiche per 30min con una soluzione di PBS/FCS 10%. A questo punto si lasciano asciugare i vetrini e poi si trattano con una soluzione di anticorpo primario (1:50 in PBS/FCS 10%) per 30min. Poi i vetrini vengono trattati ancora per 30min con una soluzione di anticorpo secondario marcato con un fluorocromo (1:1000 in PBS/FCS 10%). L'ultimo passaggio prevede

l'aggiunta di un marcatore del DNA, l'Hoechst 33342, 1:1000 in PBS/FCS 10% per 10min. Il vetrino coprioggetti verrà poggiato su un portaoggetti interponendo una goccia di una soluzione di PBS/glicerolo 1:1 ed è così pronto per essere osservato al microscopio a fluorescenza (Nikon). Essendo quest'ultimo collegato a una videocamera digitale (CoolSnap) abbiamo la possibilità di ottenere delle immagini digitalizzate da analizzare, attraverso l'uso di un software (Adobe Photoshop CS4).

Misura dell'attività della SOD1

Metodo polarografico

Per la determinazione dell'attività dell'enzima SOD1 è stato utilizzato il metodo polarografico (Rigo, 1975). Attraverso questo metodo è possibile misurare direttamente la concentrazione di $O_2^{\cdot -}$ prodotto per la riduzione monoelettronica dell' O_2 a un elettrodo a goccia di mercurio sotto l'azione di un campo elettrico. In ambiente acquoso la riduzione dell' O_2 proseguirebbe ulteriormente per aggiunta di un secondo elettrone. Per limitare la riduzione alla fase monoelettronica, nella soluzione tampone utilizzata per la misurazione, viene aggiunto un tensioattivo idrofobico: il trifenilfosfinossido (TPO). La corrente limite è controllata dalla diffusione di O_2 alla superficie dell'elettrodo ed è proporzionale alla concentrazione di O_2 in soluzione. La SOD1 eventualmente presente nel campione aggiunto alla soluzione di misurazione, dismutando il $O_2^{\cdot -}$ fa aumentare la concentrazione di O_2 . Viene perciò registrata una corrente che è direttamente proporzionale alla concentrazione di SOD1 nel campione. La misurazione è stata effettuata in una soluzione tampone di sodio tetraborato a pH 9.8, contenente 300 mg/L e EDTA 20 μ M, applicando un potenziale di $-0.9V$. Queste condizioni consentono di misurare, in modo diretto, solo l'attività della SOD1 giacché l'attività della SOD2 diminuisce sopra il pH neutro, mentre quella della SOD1 è stabile fino a pH 10.0. La concentrazione dell'enzima attivo nel campione, si calcola attraverso la sua costante cinetica, determinata su un campione di SOD1 purificata e a concentrazione nota (per la SOD1 umana purificata la K_{cat} è pari a $1.1 \times 10^{-9} M^{-1} s^{-1}$). Quindi, dal peso molecolare dell'enzima (32.7 kDa) si può risalire alla sua concentrazione.

Gel di attività

L'attività della SOD1 è stata anche misurata qualitativamente separando gli estratti proteici (50 µg) su gel di poliacrilammide al 7.5% e in condizioni native. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato incubato per 30min in una soluzione contenente NBT (2.5 mM) e in seguito in una soluzione contenente tetrametilenediammina e riboflavina (10 µg/ml) che, esposta alla luce, genera $O_2^{\cdot-}$ in grado di ridurre l'NBT a formazano. Dopo esposizione alla luce il gel si colora omogeneamente di viola scuro. La SOD1, eventualmente presente nel gel, dismutando il $O_2^{\cdot-}$, previene la riduzione dell'NBT. Per questo motivo l'attività della SOD1 s'identifica sul gel come una banda a-cromatica la cui intensità riflette la quantità di enzima presente.

Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è una tecnica che permette di evidenziare l'esistenza d'interazioni dirette o indirette tra proteine. Dato che le interazioni fra proteine non sono sempre forti, come quelle mediate da legami covalenti, ma anzi spesso sono deboli e temporalmente limitate, le cellule devono essere lisate in un tampone idoneo a preservarle. Per questo, spesso si utilizza il RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 12 mM acido deossicolico, inibitori delle protease e inibitori delle fosfatasi 40 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4). I lisati cellulari vengono incubati con anticorpo primario che riconosce una sola delle proteine in esame. Dopo alcune ore di incubazione in rotazione (da 2 a 24h) a 4°C, in presenza dell'anticorpo primario, i lisati vengono incubati 2 h con proteina A legata a delle beads di agarosio o sefarosio. Questo è in grado di interagire con l'anticorpo, che a sua volta avrà riconosciuto e legato la proteina di interesse. Dopo una breve centrifugazione, le beads vengono recuperate, lavate con RIPA buffer e risospese in un volume noto di Sample Buffer. Dopo bollitura, gli immunoprecipitati vengono caricati su SDS-PAGE e sottoposti a Western blot. A questo punto, per vedere se esiste l'interazione tra la proteina immunoprecipitata e un'altra presa in esame, si marcano le lastrine con anticorpi idonei a riconoscere quest'ultima. Per evitare cross-reattività tra l'anticorpo usato per l'immunoprecipitazione e quello utilizzato per l'immunoblot, si usa immunoprecipitare con un anticorpo prodotto in topo e rilevare con uno prodotto in coniglio.

Nel nostro caso, 400 µg di estratti citosolici e nucleari sono stati incubati tutta la notte a 4°C con un anticorpo policlonale per Sp1 o monoclonale per la nNOS (1 µg/ml). Gli anticorpi sono stati poi precipitati con 10 µl di proteina A agarosio per 30min. Le beads sono state lavate per tre volte con RIPA buffer risospeso in Laemmli buffer (Sample Buffer) e bollite per 5min. Gli immunoprecipitati sono stati caricati su un gel di acrilammide al 6% e dopo Western blot, le lastrine sono state incubate con un anticorpo monoclinale anti-Sp1 o policlonale anti-nNOS.

RT-PCR

Per determinare la concentrazione degli RNA di SOD1 e β-actina, ci siamo avvalsi della tecnica dell'RT-PCR. La tecnica si basa sulla retrotrascrizione degli RNA estratti dalle cellule (RT) e successiva amplificazione di alcuni di essi mediante l'uso di specifici oligonucleotidi primer (PCR, *polymerase chain reaction*). La tecnica si valuta come semiquantitativa, poiché, come i western blot, si utilizza un marker di caricamento che è anche un riferimento della parità di condizioni di amplificazione in PCR.

Gli RNA totali sono stati preparati tramite l'uso del reagente Trizol (Invitrogen) seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. Al termine dell'estrazione, l'RNA estratto veniva quantificato mediante risospensione in H₂O sterile e determinazione dell'assorbanza allo spettrofotometro alle $\lambda=260$ e $\lambda=280$. La seconda determinazione dell'assorbanza veniva effettuata per determinare la purezza dell'RNA estratto. In particolare, si consideravano delle estrazioni di buona qualità il cui rapporto delle assorbanze (A_{260}/A_{280}) era maggiore di 1.6. 3 µg di RNA così, preparato venivano sottoposti a RT in presenza della trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen) condotta in presenza di inibitori delle RNasi (RNasin, Promega) a 37°C per 1h. Il retrotrascritto così ottenuto veniva sottoposto a 35 cicli di PCR (composti da: 15 sec melting a 95°C, 30 sec annealing a 55°C, 1 min 20 sec estensione a 72°C) in presenza di Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e dei seguenti primer:

SOD1 forward: 5'-ATGGCGACGAAGGCCGTGTG-3'

SOD1 reverse: 5'-GATCCCAATTACACCACAAGCC-3'

β-actina forward: 5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGC-3'

β-actina reverse: 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACG-3'

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati caricati sul gel di agarosio all'1% in presenza dell'intercalante del DNA: Bromuro di Etidio e usando marker di pesi molecolari adeguati a riconoscere le lunghezze dei DNA amplificati. L'amplificazione dava, come atteso, dei prodotti di lunghezza di 495bp per la SOD1 e di 1128bp per la β -actina.

Determinazione della produzione di NO

Misura della concentrazione dei nitriti e dei nitrati

L'NO può essere convertito sia in nitrito sia in nitrato ma a diversi livelli a seconda delle condizioni e dello stato redox del fluido biologico. Per cui la misurazione della concentrazione del solo nitrito non necessariamente riflette un cambiamento nella produzione di NO. Per questo motivo è stato ideato un saggio che sfrutta la reazione di Griess in combinazione con una tecnica (Schmidt *et al.*, 1990) che aumenta la sensibilità e la riproducibilità della misura simultanea dei nitriti e dei nitrati.

Secondo questa tecnica il terreno della coltura cellulare, da sottoporre all'analisi, deve essere preventivamente centrifugato a 1000g per 10min allo scopo di allontanare le cellule morte. I nitrati eventualmente presenti nel mezzo vengono poi convertiti in nitriti attraverso una reazione di riduzione in presenza dell'enzima nitrato reduttasi e dei cofattori FAD e NADPH. In seguito, ad un'aliquota del mezzo di coltura viene aggiunta sulfanilammide ed HCl rispettivamente ad una concentrazione finale di 1 mM e 0.6 M. Questi reagenti consentono la formazione di un composto diazotato prodotto dalla reazione della sulfanilamide con il nitrito. Eventuali precipitati possono essere rimossi mediante una centrifugazione a 3000g per 5min. Successivamente, deve essere prodotto un nuovo composto mediante l'aggiunta di N-(1-naftil)-etilendiamina (NEDA) alla concentrazione di 1mM finale. Questo nuovo prodotto di reazione presenta assorbimento ad una lunghezza d'onda di 548nm. La concentrazione di nitriti e nitrati nel campione può essere determinata mediante la lettura dell'assorbanza del campione con riferimento ad una retta standard ottenuta misurando le assorbanze di soluzioni a concentrazioni note di nitriti o nitrati in un intervallo compreso tra 0.1 e 40 μ M.

Misura in vivo della produzione di NO

La produzione di NO può essere misurata direttamente tramite l'utilizzo del fluorocromo 4,5 diaminofluoresceina diacetata (DAF-2/DA). Il monostrato cellulare viene incubato per 30min a 37°C con DAF-2/DA alla concentrazione di 2.5 μ M. Questo composto, liberamente permeabile alla membrana plasmatica, nel citosol viene convertito in DAF-2 dalle diesterasi cellulari. A pH neutro tipico dell'ambiente citoplasmatico, il DAF-2 reagendo con l'NO gassoso è in grado di trasformarsi in un addotto fluorescente verde. Le cellule così marcate possono essere sottoposte sia a un'analisi citofluorimetrica utilizzando il FACScalibur e poi analizzando i dati attraverso l'uso del Software WinMDI2.9, sia ad un'indagine con microscopio a fluorescenza tramite l'uso di opportuni filtri e poi analizzando in modo qualitativo i dati utilizzando il Software Adobe Photoshop CS4.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

L'EMSA è una tecnica usata per studiare le interazioni DNA-proteina. Tale tecnica si basa sul fatto che i complessi DNA-proteina in un gel di poliacrilammide nativo, migrano più lentamente rispetto al DNA non legato producendo uno "shift" nella migrazione delle bande del DNA marcato. Nel nostro caso, gli esperimenti di EMSA sono stati condotti sugli estratti nucleari ottenuti come precedentemente descritto nel paragrafo "Lisi delle Cellule". Sono stati, inoltre, utilizzati degli oligonucleotidi doppio filamento marcati al 5' con biotina e contenenti le sequenze target per il fattore di trascrizione Sp1 (oligonucleotide antisenso: 5'-Biotina-GCTCGC CCGCCCCGATCGAAT-3' e un oligonucleotide senso: 5'-Biotina-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'), per AP1 (oligonucleotide antisenso: 5'-Biotina-TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG-3' e un oligonucleotide senso: 5'-Biotina-CGCTTGATGATCTAGCCGGAA-3') e per il promotore della SOD1 (oligonucleotide antisenso: 5'-Biotina-CTCCGCGCCTCGCCCACTCTGGC-3' e un oligonucleotide senso: 5'-Biotina-GCCAGAGTGGGCGAGGCGCGGAG-3') (Invitrogen, Carsband, CA, USA). I campioni sono stati sottoposti inizialmente a una *Binding reaction* per 20min a temperatura ambiente durante i quali 8 μ g di estratto nucleare, 20 ng di DNA biotinilato, 10 ng di poly dI(dC) erano disciolti in un tampone di binding (13 mM HEPES pH7.9, 13% glicerolo, 80 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT). Nel caso in cui l'esperimento lo richiedesse, nella reazione di binding si aggiunge anche l'oligonucleotide non marcato

(competitore) alla concentrazione di 2000 ng. I campioni così preparati sono stati caricati su un gel di poliacrilammide nativo al 6% e trasferiti su una membrana di Nylon. La membrana è stata poi marcata con streptavidina coniugata con la perossidasi (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) e le bande proteiche sono state rilevate usando il substrato chemiluminescente ChemiGlow. Come controllo positivo sono stati effettuati degli esperimenti di competizione utilizzando nella *Binding reaction* un eccesso di oligonucleotide non marcato.

Analisi statistica dei dati

Tutti i dati presentati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (S.D.). Per determinare la significatività dei dati è stato utilizzato il test ANOVA seguito dal test di Bonferroni. Tali sistemi statistici permettono, dopo il calcolo della media e della S.D., considerando il numero di misure effettuate (n), di calcolare la probabilità che le differenze osservate siano dovute al caso; le differenze si dicono significative quando tale probabilità è minore del 5% ($p < 0.05$).

RISULTATI

L'Ossido Nitrico Sintasi Neuronale (nNOS) protegge le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y dallo stress ossidativo indotto dai derivati dell'aglio

I derivati dell'Aglio sono in grado di modulare l'espressione della nNOS

E' ormai noto come molte patologie sono associate con differenti disfunzioni nel metabolismo dell'NO. Un'aumentata produzione di NO, infatti, è stata ritrovata in molti tipi di tumori (Jadeski *et al.* 2003), durante l'infiammazione (Liu *et al.* 2002) e in alcune malattie neurodegenerative (Calabrese *et al.* 2000; Kawanishi *et al.* 2006); mentre una diminuita quantità di NO è stata riscontrata in anomalie cardiovascolari e in taluni disordini gastrointestinali. Da qui nasce l'interesse nel manipolare le vie di segnalazione dell'NO al fine di limitare o addirittura risolvere tali patologie.

Negli ultimi anni, è notevolmente aumentato l'interesse nei confronti di molecole derivanti dalla dieta, nella cura di diverse malattie e di vari tipi di cancro. Di particolare interesse sono gli estratti d'aglio (GE) contenenti molecole organosulfuriche (DADS e trisolfuro di diallile, DATS) (*figura 1*). Tali molecole possiedono una grande quantità di effetti benefici, come la diminuzione dell'incidenza di alcuni tipi di tumore allo stomaco (You *et al.*, 1989).

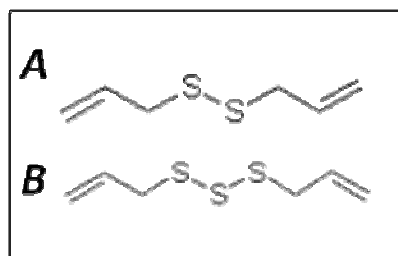


Figura 1. Struttura chimica del disolfuro di diallile (DADS) (A) e del trisolfuro di diallile (DATS) (B).

Le proprietà benefiche degli estratti d'aglio sono state dimostrate anche sul sistema cardiovascolare e immunitario, dove sono in grado di incrementare la sintesi dell'NO attraverso l'up-regolazione della eNOS (Kim *et al.* 2001) e prevenire l'infiammazione inibendo il fattore di trascrizione NF- κ B (Kim *et al.* 2001; Ippoushi *et al.*, 2002; Chang e Chen 2005) sia in cellule macrofagiche che endoteliali. Fino ad oggi non sono ancora stati riportati dati riguardanti la modulazione della nNOS da parte degli estratti d'aglio, ma è stata dimostrata una modulazione del contenuto proteico di questo enzima sotto flusso di ROS (Andoh *et al.* 2000; Aquilano *et al.*, 2003). Oltre a tali proprietà, gli estratti d'aglio hanno, anche, la capacità di indurre un aumento di produzione dei ROS e un aumento dell'apoptosi (Filomeni *et al.*, 2003). Per queste ragioni, abbiamo voluto esaminare la capacità di queste molecole di modulare l'attività e il contenuto proteico della nNOS. Infatti, nel nostro laboratorio è stato in precedenza dimostrato come il DADS o il DATS fossero in grado di incrementare la produzione di ROS e di NO in cellule di neuroblastoma umano, SH-SY5Y (Filomeni *et al.*, 2003). L'incremento di questi radicali determinava danni a livello nucleare, ossidazione delle proteine e perossidazione lipidica, portando in ultima analisi alla morte per apoptosi. Le cellule SH-SY5Y esprimono costitutivamente la nNOS, quindi l'NO prodotto può rappresentare sia una molecola potenzialmente dannosa per le macromolecole biologiche, sia un modulatore delle vie di segnalazione cellulare e dell'apoptosi. Per testare se 50 μ mol/L di DADS potesse alterare la produzione di NO e soprattutto il contenuto proteico della nNOS, ne sono stati analizzati i livelli intracellulari attraverso Western blot. La *figura 2* riporta il risultato dell'immuno-elettroforesi condotta a parità di concentrazione proteica, utilizzando un anticorpo contro la nNOS: il trattamento con il DADS porta all'aumento dei livelli proteici dell'enzima, già ad 1h di trattamento, raggiungendo il picco massimo a 3h (1.13 ± 0.05 rispetto al valore del controllo, 0.40 ± 0.10) e rimanendo up-regolata fino alle 24h (1.20 ± 0.10), suggerendo che la nNOS rappresenta il primo sensore della tossicità mediata dal DADS.

Per capire se l'incremento della nNOS fosse causato solo dal DADS o anche ad altri derivati dell'aglio, le cellule SH-SY5Y sono state trattate con 1% v/v GE, concentrazione che è in grado di provocare un arresto della crescita e della vitalità delle cellule HepG2 (epatomi umani) (De Martino *et al.*, 2006).

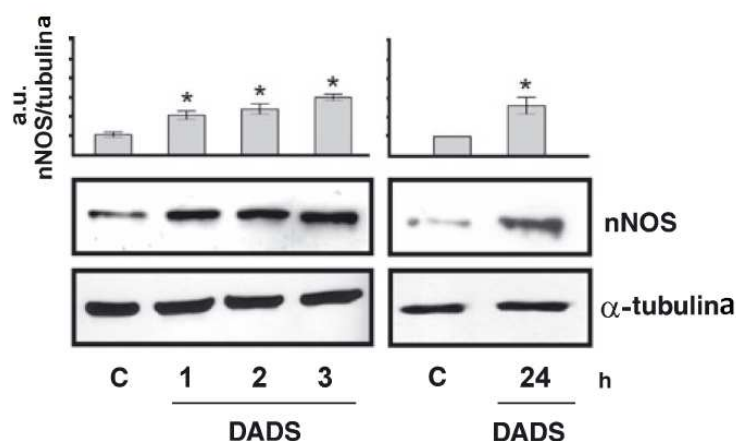


Figura 2. Analisi del contenuto proteico della nNOS dopo trattamento con il DADS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 24h con 50 $\mu\text{mol/L}$ di DADS. 20 μg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.001$, $n = 3$.

La figura 3 mostra un incremento della percentuale di cellule arrestate nella fase G2/M, dopo trattamento con 1% v/v GE per 12h. Questo fenomeno è, inoltre, accompagnato da un concomitante aumento delle cellule apoptotiche a 12 e 24h di trattamento con GE.

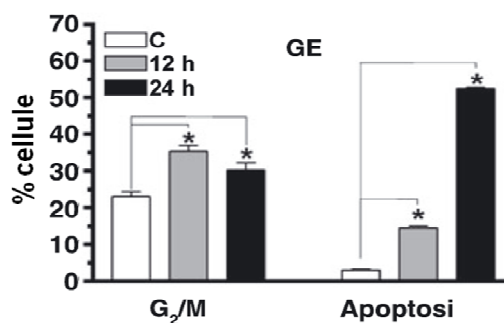


Figura 3. Analisi dell'apoptosi dopo trattamento con GE.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con 1% v/v GE per 24h, lavate con PBS e marcate con ioduro di propidio. L'analisi del ciclo cellulare e dell'apoptosi è stata effettuata con il FAC-Scalibur e la percentuale di cellule è stata calcolata utilizzando il software WinMDI versione 2.8 (the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.001$, $n = 5$.

Sulla base di questi risultati siamo andati a misurare il contenuto proteico della nNOS, dopo trattamento con GE. Come mostra la *figura 4* il GE, è in grado di indurre un aumento del contenuto proteico della nNOS, la quale raggiunge il valore massimo a 3h di trattamento (0.92 ± 0.04 rispetto al valore di controllo, 0.38 ± 0.05), rimanendo up-regolata fino a 24h (0.78 ± 0.12).

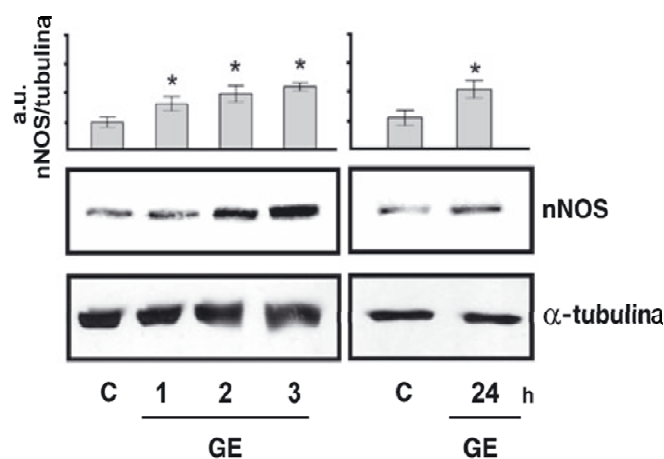


Figura 4. Analisi del contenuto proteico della nNOS dopo trattamento con GE.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con 1% v/v GE per 24h. 20 µg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L'α-tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α-tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie ± S.D.; * $p < 0.001$, $n = 4$.

Nonostante ciò, la produzione di NO non è aumentata. Infatti, la *figura 5* mostra i livelli di NO_x accumulati durante incubazione delle cellule in HBSS, un mezzo che non produce grosse interferenze nel dosaggio e che è stato utilizzato allo scopo di rendere più sensibile la misura. Il dosaggio dell'attività dell'nNOS ha rilevato che la produzione di NO non subisce modulazioni in cellule SH-SY5Y trattate con DADS e GE rispetto ai controlli.

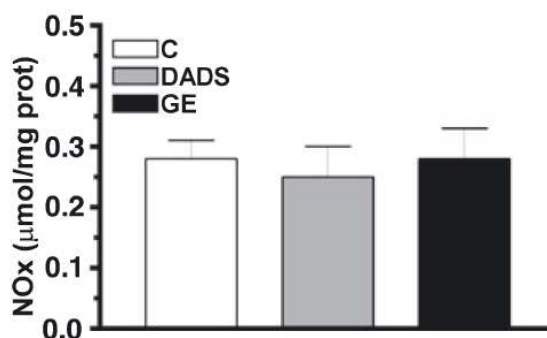


Figura 5. Effetti del trattamento con DADS e GE sulla produzione di NO.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con 50 μmol/L DADS e con 1% v/v GE per 24h. La produzione di NO è stata valutata misurando i livelli di nitriti e nitrati (NO_x) rilasciati nel mezzo di coltura, mediante il metodo di Griess. Il grafico riportato è rappresentativo di sei esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie ± S.D.; n=6.

Il medesimo risultato è stato ottenuto marcando le cellule con la sonda fluorescente DAF-2/DA e poi analizzate al citofluorimetro (dati non mostrati). Questi dati non sono discordanti tra loro in quanto, come accennato in precedenza, sotto flusso di ROS si osserva un aumento dei livelli di nNOS e l'NO prodotto potrebbe intercettare i ROS eliminandoli ed espletando così la sua funzione di *scavenger*.

Effetto dell'incremento della nNOS sulla produzione di ROS

L'incremento della nNOS potrebbe avere un doppio ruolo nel nostro sistema cellulare: l'NO prodotto potrebbe contribuire a mantenere l'equilibrio tra le forze pro e anti-apoptotiche, funzionando da soppressore dell'apoptosi a vari livelli, oppure, potrebbe svolgere un ruolo protettivo per la cellula spostando l'equilibrio verso il processo apoptotico (Li e Wogan 2005). Per chiarire il ruolo giocato dall'nNOS in risposta alla citotossicità indotta dal DADS, sono stati effettuati dei trattamenti con 50 μmol/L DADS in presenza dell'inibitore specifico dell'nNOS, N^G-propil-L-arginina (NPA).

Nella *figura 6* sono riportati i dati ottenuti dal doppio trattamento con DADS e 1 mmol/L NPA a 24h. E' possibile notare che l'inibizione dell'attività della nNOS provoca un aumento della citotossicità del DADS, incrementando così la percentuale di cellule apoptotiche. Lo stesso risultato è stato ottenuto utilizzando un altro specifico inibitore della nNOS, il 7-nitroindazolo (7-Ni) (dati non mostrati).

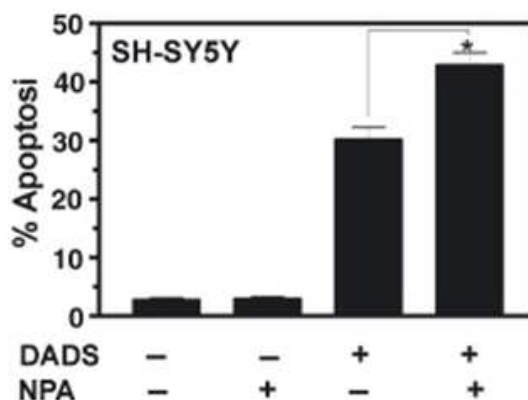


Figura 6. Analisi dell'apoptosi in seguito ad inibizione della nNOS in cellule SH-SY5Y.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con 50 μ mol/L DADS per 24h, lavate con PBS e marcate con ioduro di propidio. L'inibitore della nNOS N^G-propil-L-arginina (NPA) è stato aggiunto alla concentrazione di 1 mmol/L prima del trattamento con il DADS e mantenuto per tutto l'esperimento. L'analisi dell'apoptosi è stata compiuta con il FAC-Scalibur e la percentuale di cellule è stata calcolata utilizzando il software WinMDI versione 2.8 (the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Il grafico riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n = 4$.

Inoltre, per testare la specificità dell'aumento dell'nNOS ai derivati dell'aglio, sono stati effettuati dei trattamenti con il DADS su una differente linea cellulare, le NSC34, un ibridoma ottenuto dalla fusione di un neuroblastoma murino N18TG2 con motoneuroni (Cashman *et al.*, 1992). Essi mostrano un fenotipo neuronale multipolare e sono ampiamente utilizzati come modello di cellula moto-neuronale. Come per le SH-SY5Y, il trattamento con 50 μ mol/L di DADS promuove la morte cellulare per

apoptosi e il pre-trattamento con NPA incrementa la percentuale di cellule apoptotiche (figura 7).

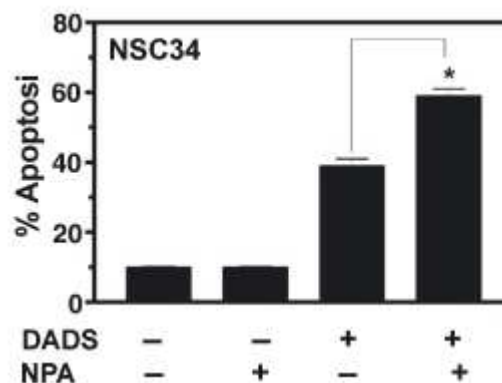


Figura 7. Analisi dell'apoptosi in seguito ad inibizione della nNOS in cellule NSC34.

Le cellule NSC34 sono state trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 24h, lavate con PBS e marcate con ioduro di propidio. L'inibitore della nNOS N^G -propil-L-arginina (NPA) è stato aggiunto alla concentrazione di 1 mmol/L prima del trattamento con il DADS e mantenuto per tutto l'esperimento. L'analisi dell'apoptosi è stata effettuata con il FAC-Scalibur e la percentuale di cellule è stata calcolata utilizzando il software WinMDI versione 2.8 (the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=5$.

Il nostro secondo obiettivo è stato quello di verificare se il contenuto di nNOS fosse variato in queste cellule come per le SH-SY5Y. La figura 8 mostra che dopo aggiunta di DADS anche in questa linea cellulare si osserva un incremento dei livelli proteici della nNOS già ad 1h di trattamento. Questi risultati dimostrano, in parte, come l'NO prodotto dall'nNOS protegge entrambe le linee cellulari dallo stress ossidativo indotto dai derivati dell'aglio.

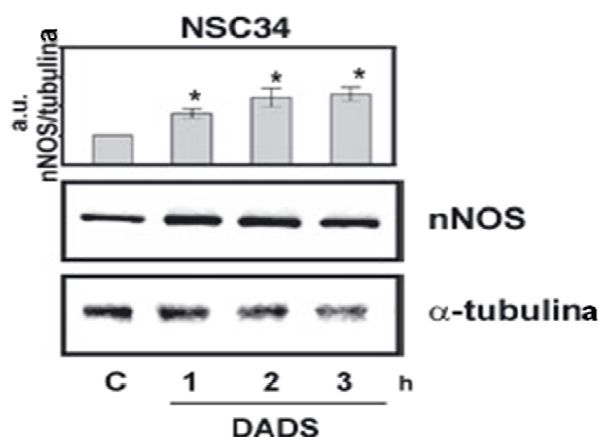


Figura 8. Analisi del contenuto proteico della nNOS nelle cellule NSC34.

Le cellule NSC34 sono state trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 24h. 20 μg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=3$.

In conformità a questi risultati abbiamo analizzato se l'aumento della nNOS, indotto dai derivati dell'aglio, fosse effettivo anche dopo differenziamento delle cellule. Per indurre il differenziamento, è stato quindi impiegato l'acido retinoico (RA) alla concentrazione di 30 $\mu\text{mol/L}$. I risultati di quest'esperimento sono riportati in *figura 9a* e dimostrano che il trattamento con l'RA protegge completamente le NSC34 dalla citotossicità indotta dal DADS, allo stesso tempo si osserva una maggiore up-regolazione della nNOS già ad 1h di trattamento (*figura 9b*). Inoltre, l'inibizione della nNOS con l'inibitore NPA, abolisce completamente la protezione delle NSC34 differenziate dal trattamento con DADS (*figura 9a*). Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche sulle SH-SY5Y differenziate (dati non mostrati).

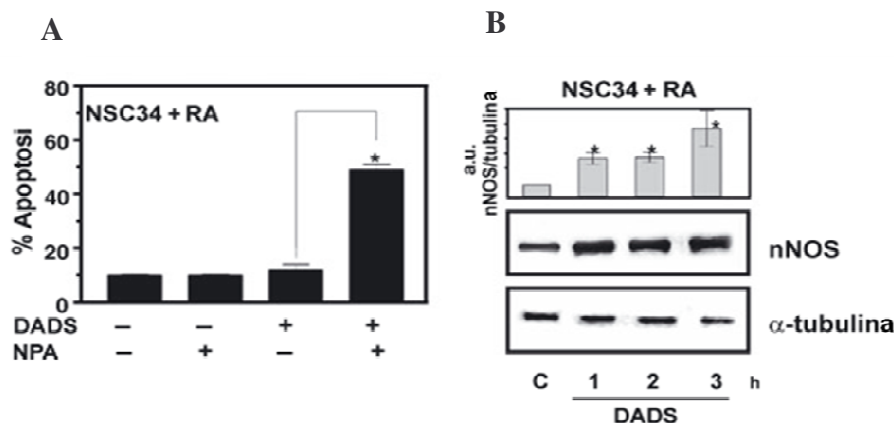


Figura 10. Analisi dell'apoptosi e del contenuto di nNOS dopo differenziamento delle cellule NSC34.

A) Le cellule NSC34 sono state differenziate con 30 $\mu\text{mol/L}$ di RA, trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 24h, lavate e marcate con ioduro di propidio. L'NPA è stato aggiunto alla concentrazione di 1 mmol/L prima del trattamento con il DADS e mantenuto per tutto l'esperimento. L'analisi dell'apoptosi è stata effettuata con il FAC-Scalibur e la percentuale di cellule è stata calcolata utilizzando il software WinMDI versione 2.8 (the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Il grafico riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=4$.

B) Le cellule NSC34 sono state differenziate con 30 $\mu\text{mol/L}$ di RA e trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 3h. 20 μg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=3$.

Effetti di differenti chemioterapici sul contenuto proteico della nNOS in cellule NSC34

Al fine di confermare se l'up-regolazione della nNOS fosse un evento specificatamente associato al trattamento con i derivati dell'aglio o un fenomeno di risposta ai chemioterapici, le cellule NSC34 sono state trattate con differenti tipi di sostanze scelte sulla base del loro meccanismo di azione (doxorubicina/ROS-dipendente e etoposide/ROS-indipendente). Dopo 24h di trattamento con etoposide (10 $\mu\text{mol/L}$) o doxorubicina (1 $\mu\text{mol/L}$), è stata

misurata la morte cellulare per apoptosi con un'analisi al citofluorimetro. Entrambe i composti sono stati in grado di indurre citotossicità in maniera molto simile al trattamento con DADS e GE (etoposide $31 \pm 3\%$ e doxorubicina $25 \pm 5\%$). Tuttavia, analizzando il contenuto proteico della nNOS attraverso Western blot, è stato provato che entrambe i chemioterapici non sono in grado di up-regolare la proteina (*figura 10*).

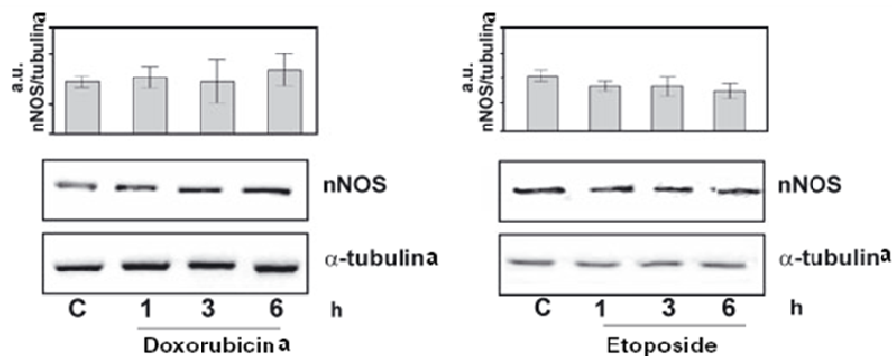


Figura 10. Analisi del contenuto proteico della nNOS dopo trattamento con doxorubicina ed etoposide.

Le cellule NSC34 sono state trattate con etoposide ($10 \mu\text{mol/L}$) o con doxorubicina ($1 \mu\text{mol/L}$) per 6h. $20 \mu\text{g}$ di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=3$.

Lo stesso risultato è stato ottenuto con altri tipi di chemioterapici come idrossiurea ($4 \mu\text{mol/L}$), staurosporina ($0.15 \mu\text{mol/L}$) e *cis*-platino ($7 \mu\text{mol/L}$) (dati non mostrati). Infatti, il pre-trattamento con differenti inibitori della nNOS non portano a nessun incremento nella percentuale di cellule apoptotiche (dati non mostrati).

L'up-regolazione della nNOS inibisce l'apoptosi e lo stress ossidativo indotto dai derivati dell'aglio

Per rafforzare il ruolo della nNOS nella protezione dalla morte cellulare indotta dai derivati dell'aglio, è stata effettuata una sovraespressione della nNOS in cellule SH-SY5Y, mediante una trasfezione transiente, utilizzando un plasmide nel quale è stato clonato il cDNA codificante per la nNOS (cellule *nNOS*). Come cellule di controllo sono state utilizzate le cellule SH-SY5Y trasfettate con lo stesso vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione, sono stati valutati i livelli proteici della nNOS attraverso Western blot e il grado di attività dell'enzima, misurando i livelli di nitriti e nitrati rilasciati nel mezzo di coltura. Queste analisi hanno rilevato che sia il contenuto sia l'attività della nNOS sono significativamente aumentati in seguito alla trasfezione (figura 11).

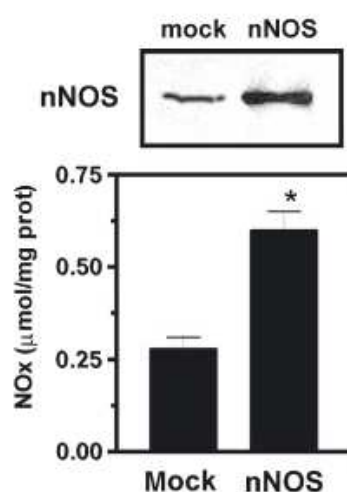


Figura 11. Contenuto proteico e attività della nNOS dopo trasfezione transiente.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). *Pannello in alto*: 20 μg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. *Pannello in basso*: La produzione di NO è stata valutata misurando i livelli di nitriti e nitrati (NO_x) rilasciati nel mezzo di coltura, mediante il metodo di Griess. Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono riportati come μmol/mg prot e sono espressi come medie

$\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n=5$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

In seguito, le cellule trasfettate sono state trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS o con 1% v/v GE e la percentuale di cellule apoptotiche è stata misurata al citofluorimetro, dopo marcatura con ioduro di propidio. Come riportato in *figura 12*, la sovraespressione della nNOS protegge in modo significativo le cellule *nNOS* dalla tossicità indotta dal DADS o dal GE, infatti, una riduzione del 50% delle cellule nella fase sub-G1 era osservabile sia a 12 che a 24h. Quindi la sovraespressione della nNOS è in grado di bloccare la citotossicità indotta dal DADS e dal GE. Questi ultimi dati, insieme con quelli descritti in precedenza, suggeriscono come l'accumulo della nNOS rappresenti una risposta cellulare per limitare il danno ossidativo.

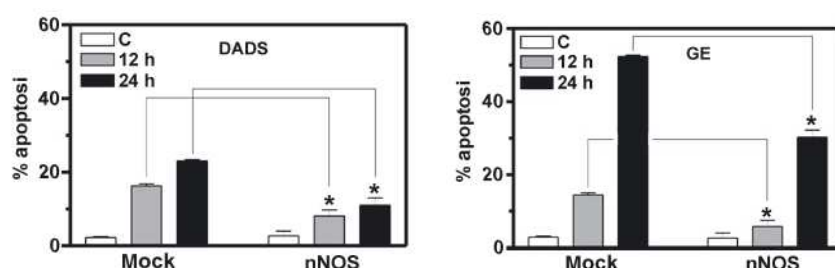


Figura 12. Analisi dell'apoptosi dopo sovraespressione della nNOS e dopo trattamento con DADS e GE.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*) e successivamente trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS o con 1% v/v GE per 24h, lavate con PBS e marcate con ioduro di propidio. L'inibitore della nNOS N^G-propil-L-arginina (NPA) è stato aggiunto alla concentrazione di 1 mmol/L prima del trattamento con il DADS e mantenuto per tutto l'esperimento. L'analisi dell'apoptosi è stata compiuta con il FAC-Scalibur e la percentuale di cellule è stata calcolata utilizzando il software WinMDI versione 2.8 (the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). I grafici riportati sono rappresentativi di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.001$, $n=5$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La sovraespressione della nNOS riduce l'attivazione di JNK e c-Jun mediata dal DADS

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio avevano dimostrato come il DADS sia in grado di indurre apoptosi nelle cellule SH-SY5Y, attraverso un'aumentata produzione di ROS e mediante l'attivazione della via di segnalazione JNK/c-Jun (Filomeni *et al.*, 2003). Per capire se nel nostro sistema sperimentale l'NO potesse interferire con l'attivazione di JNK e/o c-Jun sono state analizzate, attraverso Western blot, le loro forme fosforilate nelle cellule *mock* e *nNOS*. La *figura 13* mostra che, nelle cellule *mock*, p-JNK si accumula già nella prima ora di trattamento (1.60 ± 0.2 rispetto al valore del controllo 0.3 ± 0.1). Inoltre, dalla *figura 13* è possibile anche osservare un accumulo di p-c-Jun a partire dalle 3h di trattamento per raggiungere il massimo grado di attivazione a 24h (6.0 ± 0.8 rispetto al valore del controllo, 0.6 ± 0.1). Questa differenza nei tempi di fosforilazione riflette la posizione gerarchica di queste proteine nella sequenza di eventi che portano all'apoptosi, con JNK che rappresenta la proteina-sensore a monte e c-Jun l'effettore della via fosforilativa, a valle. Al contrario, nelle cellule *nNOS*, si osserva un minor grado di attivazione di queste proteine, confermando un più basso livello di morte per apoptosi nelle cellule che sovraesprimono la nNOS.

La nNOS blocca la produzione di ROS, il danno al DNA e l'ossidazione delle proteine

Per capire se, nel nostro sistema sperimentale, i ROS, prodotti sotto trattamento con DADS e GE, potessero provocare un danno ossidativo cellulare, sono stati condotti una serie di esperimenti per individuare possibili danni al DNA e alle proteine. Per questa ragione, è stato analizzato, attraverso microscopia a fluorescenza, l'istone H2A.X fosforilato sulla Ser139 (p-H2A.X). L'accumulo di p-H2A.X nel nucleo è indicativo di una rottura del doppio filamento di DNA (D'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). La *figura 14* mostra come le cellule *mock* trattate con DADS presentano un maggior accumulo di p-H2A.X nel nucleo rispetto alle cellule non trattate. Al contrario, nelle cellule *nNOS* trattate con DADS, tale fenomeno non si manifesta, avvalorando così il ruolo protettivo della nNOS contro la citotossicità indotta dal DADS.

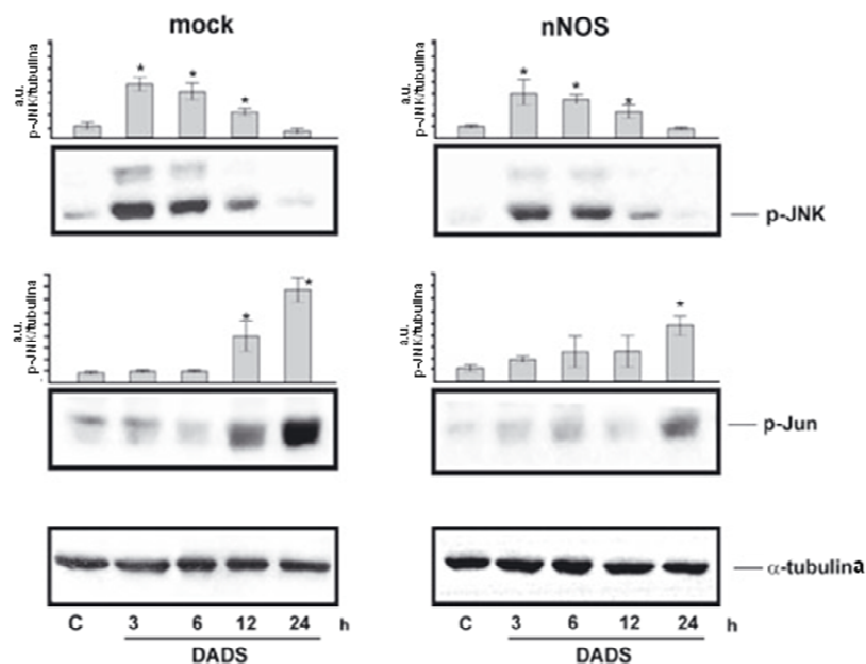


Figura 13. Analisi del contenuto di p-JNK e p-Jun, dopo trasfezione transiente e trattamento con DADS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*) e successivamente trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 24h. 20 μg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di p-JNK e p-Jun è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-p-JNK e anti-p-Jun. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra gli immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.001$, $n=4$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

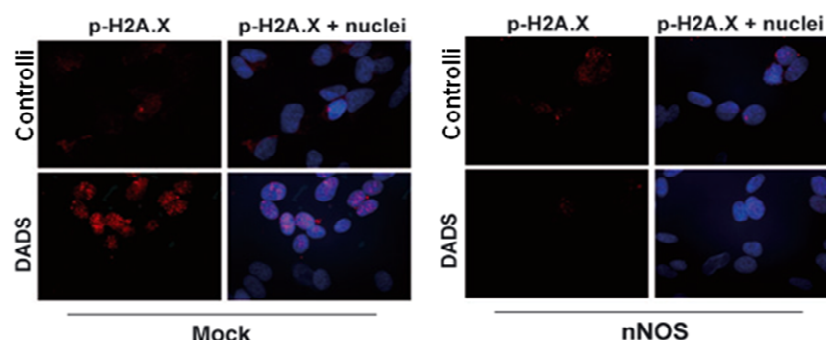


Figura 14. La sovraespressione della nNOS inibisce l'accumulo di p-H2A.X nel nucleo.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*) e successivamente trattate con 50 $\mu\text{mol/L}$ DADS per 12h. Le cellule sono state fissate in paraformaldeide e sottoposte a marcatura con un anticorpo fluorescente rosso anti-p-H2A.X. I nuclei sono stati marcati con Hoechst 33342. Le immagini riportate sono rappresentative di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

Come parametro dello stress ossidativo, invece, è stato misurato l'accumulo delle proteine carbonilate. Infatti, tra i prodotti di ossidazione delle proteine, i carbonili proteici sono quelli maggiormente rappresentati. Normalmente solo un amminoacido su 3000 presenta un gruppo carbonilico; tuttavia, in condizioni di stress ossidativo, questo valore aumenta fino a circa otto volte (Stadtman e Berlett, 1998). Abbiamo quindi eseguito il dosaggio delle proteine carbonilate sugli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y trattate con 1% v/v GE. A questo scopo, i carbonili eventualmente presenti nelle proteine degli estratti sono stati derivatizzati con dinitrofenilidrazina (DNP). I prodotti stabili ottenuti in seguito alla derivatizzazione sono stati poi identificati mediante immunoelettroforesi utilizzando un anticorpo anti-DNP. Le bande immunoreattive rappresentate in *figura 15* corrispondono alle proteine carbonilate. Com'è possibile constatare, i GE causano un aumento rilevante delle proteine carbonilate nelle cellule *mock*, indicando che i GE sono in grado di provocare una massiccia produzione di ROS. Al contrario, la sovraespressione della nNOS inibisce efficacemente il danno alle proteine, infatti non si osserva nessun cambiamento delle proteine

carbonilate dopo trattamento con GE, rispetto alle condizioni basali (figura 15).

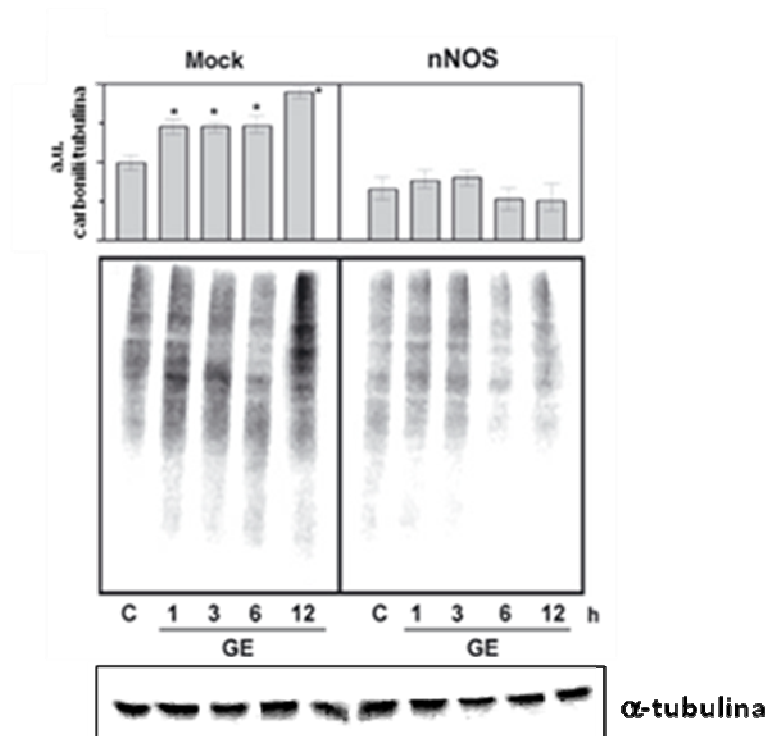


Figura 15. Carbonilazione delle proteine dopo trasfezione transiente e trattamento con GE.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*) e successivamente trattate con 1% v/v GE per 12h. Le cellule sono state lisate e trattate per la rilevazione dei gruppi carbonili come descritto nella Sezione delle Procedure Sperimentali. 5 μ g di proteine derivate da estratti totali sono state derivatizzate identificate negli estratti proteici cellulari mediante derivatizzazione dei gruppi carbonilici con DNP. Il contenuto di proteine carbonilate è stato evidenziato mediante western blot usando un anticorpo anti-DNP. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α -tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.001$, $n = 4$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

L'inibizione della nNOS provoca un aumento del $O_2^{\cdot-}$ intracellulare

Da molti anni è ormai noto come l'NO sia in grado di ostacolare il danno ossidativo attraverso l'intercettazione dei radicali dell' $O_2^{\cdot-}$ (Wink *et al.*, 2001; Mohanakumar *et al.*, 2002). Sulla base di queste conoscenze, abbiamo voluto verificare se la produzione di ROS dovuta al trattamento con il DADS potesse essere modulata dal trattamento con gli inibitori della nNOS. Per questo fine, le cellule sono state pre-incubate con una specifica sonda fluorescente DHE (diidroetidio) in grado di intercettare il $O_2^{\cdot-}$ e in seguito trattate con DADS e/o NPA. L'analisi citofluorimetrica, riportata in *figura 16*, mostra che l'inibizione dell'attività della nNOS tramite l'uso dell'NPA, porta ad un significativo incremento della concentrazione intracellulare di $O_2^{\cdot-}$ rispetto alle cellule trattate solamente con DADS. Questi ultimi dati confermano per l'NO un ruolo di efficiente *scavenger* di ROS.

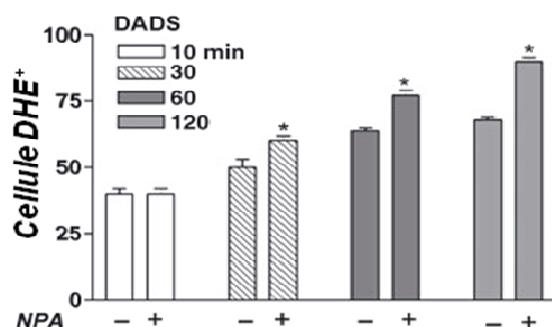


Figura 16. Analisi della concentrazione di $O_2^{\cdot-}$ in seguito a trattamento con DADS e inibizione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state pre-marcate con diidroetidio (DHE) e la concentrazione di $O_2^{\cdot-}$ è stata analizzata al citofluorimetro. L'inibitore della nNOS N^G -propil-L-arginina (NPA) è stato aggiunto alla concentrazione di 1 mmol/L prima del trattamento con il DADS e mantenuto per tutto l'esperimento. Il grafico riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. La concentrazione di $O_2^{\cdot-}$ è stata riportata come percentuale di cellule DHE positive (DHE+) ed espresse come medie $\pm$ S.D.; * $p < 0.01$, $n = 3$.

Effetti della sovraespressione dell'nNOS sulla modulazione del GSH e della SOD1

Come spiegato nell'introduzione, l'NO è una molecola dalla doppia attività: se ad elevate concentrazioni l'NO danneggia le macromolecole biologiche provocando morte per apoptosi, a basse concentrazioni può funzionare da antiossidante, proteggendo le cellule dai danni indotti dai ROS. Basandoci sui dati presenti in letteratura e sui risultati prima descritti, sono stati condotti degli studi per comprendere come un flusso endogeno di NO possa influenzare l'omeostasi cellulare, modulando i livelli di due antiossidanti intracellulari quali la SOD1 e il GSH in differenti linee cellulari di origine neuronale e non-neuronale.

Sovraespressione della nNOS in cellule SH-SY5Y

A questo scopo sono state utilizzate le cellule *nNOS* e *mock*, ottenute come precedentemente descritto, trasfettando un vettore contenente il cDNA codificante per la nNOS ed un vettore vuoto di controllo, rispettivamente. L'avvenuta sovraespressione della nNOS è stata controllata sia mediante analisi Western blot (*figura 11*, Pannello in alto), sia attraverso microscopia a fluorescenza. In quest'ultimo caso le cellule, prima fissate con paraformaldeide e permeabilizzate con il detergente Triton X-100, sono state incubate con un anticorpo monoclonale per la nNOS e con il colorante nucleare Hoechst 33342 per evidenziare i nuclei. I pannelli riportati in *figura 17*, rappresentano le immagini delle cellule *mock* (in alto), nelle quali i livelli basali di nNOS sono molto bassi rispetto alle cellule *nNOS* (nei pannelli in basso), nelle quali, invece, si osserva un aumento di espressione della proteina e una buona efficienza di trasfezione.

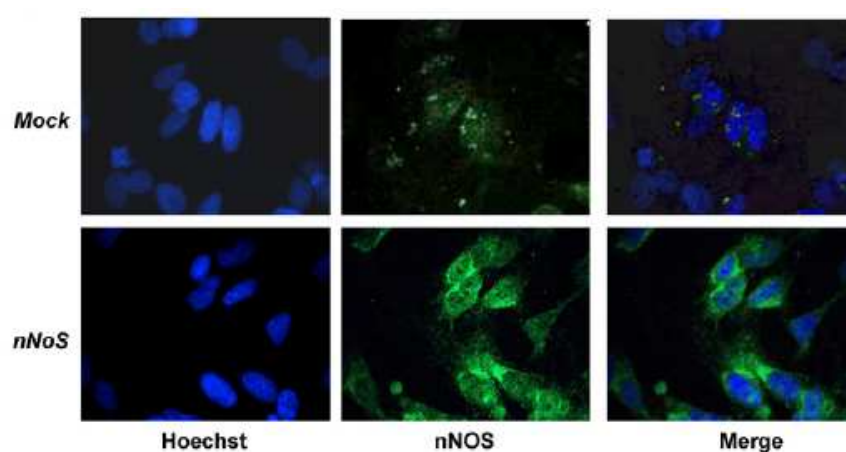


Figura 18. Analisi dei livelli di nNOS dopo trasfezione transiente.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state fissate in paraformaldeide e sottoposte a marcatura con un anticorpo fluorescente verde anti-nNOS. I nuclei sono stati marcati con Hoechst 33342. Il Merge rappresenta la sovrapposizione delle immagini corrispondenti ai nuclei e alla marcatura con l'anticorpo anti-nNOS. Le immagini riportate sono rappresentative di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

In seguito, è stata valutata l'attività della nNOS, misurando la concentrazione dei nitriti e nitrati rilasciati nel terreno di coltura. La *figura 18*, mostra che la sovraespressione della nNOS, determina un aumento dei livelli di NO_x , i quali diminuiscono significativamente dopo l'aggiunta dell'inibitore specifico della nNOS, il 7-Ni.

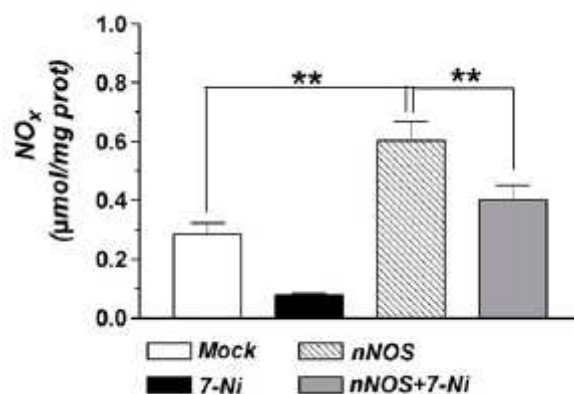


Figura 18. Analisi dei livelli di NO_x dopo sovraespressione della nNOS e inibizione con il 7-Ni.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*) e successivamente trattate con 10 μM 7-Ni per 48h a 37°C. Dopo 48h dalla trasfezione è stata valutata la produzione di NO misurando i livelli di nitriti e nitrati (NO_x) rilasciati nel mezzo di coltura, mediante il metodo di Griess. Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono riportati come μmol/mg prot e sono espressi come medie ± S.D.; n=5; **p<0.001. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La sovraespressione della nNOS provoca un arresto della proliferazione cellulare

Al fine di verificare se la sovraespressione della nNOS fosse una condizione in grado di influenzare la vitalità e la crescita cellulare, sono stati utilizzati tre differenti metodi di analisi: “MTS-test”, conta diretta cellulare mediante esclusione da Trypan blue e marcatura con la bromodeossiuridina (BrdU).

A questo scopo, a 48h dalla trasfezione le cellule SH-SY5Y trasfettate con il cDNA codificante per la nNOS e con il vettore vuoto, sono state trattate con MTS e l'assorbanza misurata a 490nm. Dall'analisi condotta è emerso che la sovraespressione della nNOS, determina una significativa

diminuzione del valore dell'assorbanza dell'MTS nelle cellule *nNOS* rispetto alle cellule *mock* (figura 19).

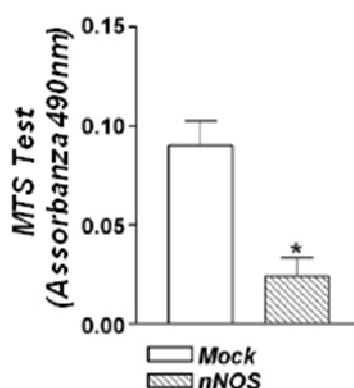


Figura 19. Analisi della vitalità cellulare dopo sovraespressione della *nNOS*, mediante saggio con MTS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della *nNOS* (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state incubate con MTS, l'assorbanza è stata determinata a $\lambda=490\text{nm}$ e riportata in grafico. Il grafico riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; $n=3$; * $p<0.001$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della *nNOS*.

Per confermare se la diminuzione del valore dell'assorbanza dell'MTS corrisponde a una diminuzione del numero di cellule o ad un'alterazione dello stato metabolico cellulare, le stesse cellule sono state tripsinizzate e contate in microscopia ottica mediante esclusione da Trypan blue. Anche in questo caso, le cellule *nNOS* mostrano una diminuita proliferazione cellulare rispetto ai controlli, inoltre, questo saggio, ha permesso di rilevare che la sovraespressione della *nNOS* non sembra essere citotossica per le cellule, infatti, non si osservava nessun cambiamento nel numero di cellule morte tra *mock* e *nNOS* (figura 20).

Infine, è stato eseguito un saggio di marcatura con BrdU: a 48h dalla trasfezione le cellule *nNOS* e *mock* sono state marcate con BrdU per i tempi e le concentrazioni indicate dalla casa produttrice. In seguito, le cellule sono state marcate con un anticorpo secondario coniugato con la FITC anti-IgG2a

(monoclonale) e con il colorante nucleare Hoechst 33342 per evidenziare i nuclei. Come mostra la *figura 21* circa il 55% delle cellule *mock* ha incorporato la BrdU, mentre solo l'8% delle cellule *nNOS* sono marcate positivamente, confermando che la loro proliferazione cellulare è inibita.

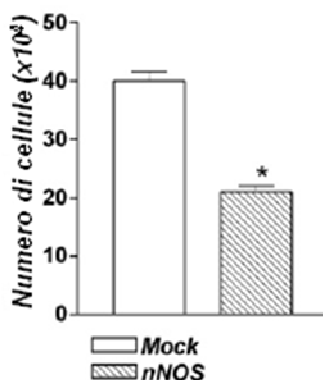


Figura 20. *Analisi della vitalità cellulare dopo sovraespressione della nNOS, mediante conta diretta.*

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e contate per esclusione da Trypan blue. Il numero totale di cellule *mock* e *nNOS* sono state riportate nel grafico. Il grafico riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; n=4; * $p<0.001$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

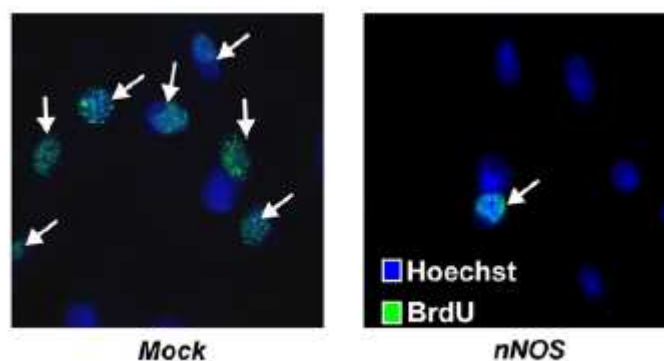


Figura 21. Analisi della vitalità cellulare dopo sovraespressione della nNOS, mediante marcatura con BrdU.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state trattate con BrdU e successivamente è stato aggiunto un anticorpo secondario coniugato con la FITC anti-IgG2a (monoclonale) (verde) e con il colorante nucleare Hoechst 33342 (blu). Le immagini riportate sono rappresentative di 5 esperimenti che hanno dato risultati simili. Le frecce bianche indicano le cellule BrdU-positive. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La sovraespressione della nNOS determina un incremento di p53

In molti casi l'arresto della proliferazione cellulare avviene in seguito al danneggiamento del DNA (mutazioni o rotture della doppia elica). L'arresto della crescita è attuato allo scopo di permettere il riparo delle strutture danneggiate da parte delle proteine preposte. L'intero processo è piuttosto articolato, poiché prevede la regolazione concertata di numerosi geni, la maggior parte dei quali è sotto il controllo del fattore di trascrizione p53. L'attività trascrizionale della proteina p53 è a sua volta modulabile principalmente a due livelli: 1) accumulo e 2) attivazione, tramite fosforilazione. Siamo andati quindi a esaminare, dopo trasfezione transiente, la possibilità di un arresto della proliferazione cellulare mediato dalla via di p53. La *figura 22* riporta i risultati di un'immuno-elettroforesi condotta con un anticorpo monoclonale anti-p53. Le bande immunoreattive a più alto peso molecolare corrispondono alla proteina p53 attiva e fosforilata. Dalla figura

è possibile osservare che la proteina p53 fosforilata è presente anche in condizioni basali nelle cellule *mock* ma, dopo sovraespressione della nNOS, si accumula in modo significativo nelle cellule *nNOS*. Questa evidenza dimostra che l'attivazione di p53 sembra essere un fenomeno associato all'arresto della proliferazione indotto dall'NO.

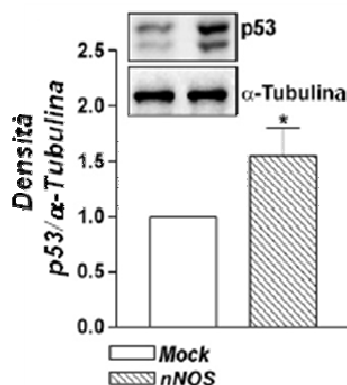


Figura 22. Analisi del contenuto proteico di p53 dopo sovraespressione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule erano lisate e 10 µg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto di p53 è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-p53. L'α-tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densità delle bande immunoreattive (riportate sopra l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per α-tubulina e riportate come unità arbitrarie (a.u.). I dati sono espressi come medie ± S.D.; * $p < 0.001$, $n=3$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La sovraespressione della nNOS provoca un aumento intracellulare dell'antiossidante tripeptidico GSH

Il GSH è considerato, insieme alla SOD1, una delle molecole più importanti nella difesa contro la tossicità dei ROS. Questo tripeptide, presente a elevate concentrazioni (1-10 mM), può interagire direttamente con i radicali oppure, tramite la catalisi della GPx, partecipare all'eliminazione dell'H₂O₂. Inoltre, il GSH rappresenta uno dei fattori

molecolari che regolano la tossicità dell'NO, in quanto reagisce con esso per formare l' S-nitrosoglutatione (GSNO), riserva endogena di NO.

Per comprendere se l'aumentata produzione di NO, dopo sovraespressione della nNOS, potesse alterare i livelli intracellulari di GSH, ne abbiamo dosato il contenuto sia nelle cellule *mock* che *nNOS*. La *figura 23* riporta i valori del GSH ottenuti tramite HPLC chromatography. I risultati mostrano che il contenuto di GSH è notevolmente aumentato nelle cellule *nNOS* rispetto alle *mock*, inoltre non si osservano cambiamenti nei livelli della forma ossidata del tripeptide (GSSG) (dati non mostrati).

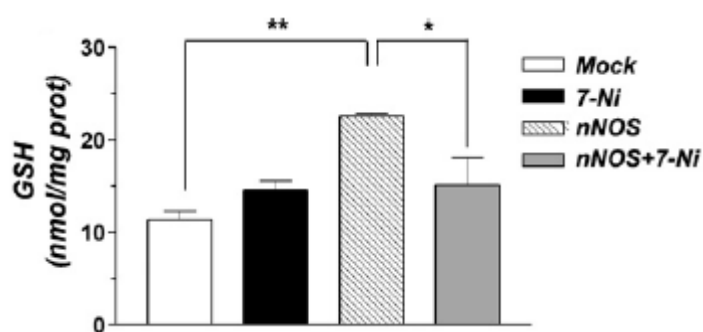


Figura 23. Analisi della concentrazione di GSH dopo sovraespressione della nNOS nelle cellule SH-SY5Y.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Immediatamente dopo trasfezione le cellule sono state trattate con 10 μ M 7-Ni e mantenute per tutto l'esperimento. Dopo 48h dalla trasfezione i lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi mediante HPLC per verificare il contenuto di GSH. Il GSH è espresso come nmol di GSH/mg prot. Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono riportati come medie $\pm$ S.D.; n=5; * p <0.01; ** p <0.001. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

Per dimostrare, inoltre, che l'aumento di GSH fosse un fenomeno strettamente associato alla sovraespressione della nNOS, sono stati misurati i livelli di GSH anche in un'altra linea cellulare di neuroblastoma umano, le CHP100, sempre trasfettate con lo stesso plasmide nel quale è stato clonato

il cDNA della nNOS e con il corrispondente plasmide vuoto per le cellule *mock*. Come mostrato in *figura 24* anche in queste cellule il contenuto di GSH è notevolmente aumentato dopo sovraespressione della nNOS.

Allo scopo di chiarire se l'aumento di GSH fosse dovuto all'aumento di NO, prodotto in seguito alla sovraespressione della nNOS, sono stati effettuati degli esperimenti in presenza dell'inibitore specifico della nNOS, il 7-Ni alla concentrazione di 10 μ M, sia per le cellule SH-SY5Y che per le CHP100. A tale scopo, dopo la trasfezione, è stato aggiunto il 7-Ni e mantenuto per tutte le 48h. Le *figure 23* e *24*, mostrano che l'inibizione della nNOS previene l'incremento del GSH, i cui valori ritornano simili a quelli delle cellule *mock*.

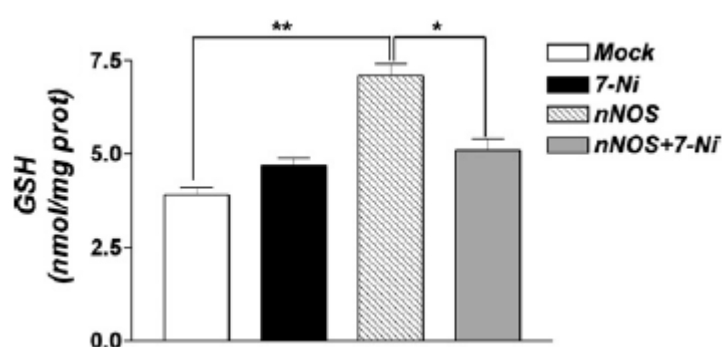


Figura 24. Analisi della concentrazione di GSH dopo sovraespressione della nNOS nelle cellule CHP100.

Le cellule CHP100 sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Immediatamente dopo trasfezione le cellule sono state trattate con 10 μ M 7-Ni e mantenute per tutto l'esperimento. Dopo 48h dalla trasfezione i lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi mediante HPLC per verificare il contenuto di GSH. Il GSH è espresso come nmol di GSH /mg prot. Il grafico riportato è rappresentativo di cinque esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono riportati come medie $\pm$ S.D.; n=5; * $p<0.01$; ** $p<0.001$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

Il GSH gioca un ruolo protettivo nel contrastare la tossicità indotta dall'NO

Al fine di verificare se l'aumento di GSH avesse un ruolo protettivo per la vitalità cellulare, abbiamo trattato le cellule SH-SY5Y trasfettate, con un agente in grado di alterare la concentrazione del tripeptide, la BSO (butionilsulfossimmina), un inibitore della γ -glutamilmcisteina sintetasi, al fine di bloccare direttamente la sintesi dell'antiossidante. Dopo il trattamento con BSO 1 mM e/o 7-Ni 10 μ M, aggiunti subito dopo la trasfezione, le cellule sono state tripsinizzate e la loro vitalità è stata valutata tramite conta per esclusione da Trypan blue. Com'è possibile vedere dalla *figura 25*, il trattamento con BSO causa una significativa diminuzione della vitalità sia delle cellule *nNOS* che *mock*, rispetto ai propri controlli non trattati con BSO. Inoltre, il co-trattamento con il 7-NI è in grado di invertire la morte indotta dalla BSO, riportando i valori della vitalità cellulare a essere simili ai controlli, sia nelle cellule *mock* sia *nNOS*, suggerendo che la morte cellulare che si osserva in assenza di GSH è dovuta proprio all'attività della nNOS. Tutti questi dati confermano che il GSH gioca un ruolo importante nel bloccare la citotossicità indotta dall'NO sia in condizioni fisiologiche (cellule *mock*) che non-fisiologiche (cellule *nNOS*). I nostri dati sono in accordo con altri lavori che dimostrano come la tossicità dell'NO possa modulare in maniera diretta i livelli di GSH in differenti tipi cellulari (Moellering *et al.*, 1998; Ridnour *et al.*, 2005).

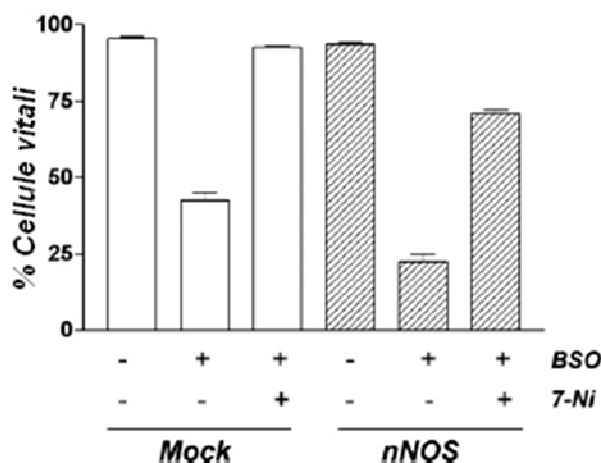


Figura 25. Analisi della vitalità cellulare dopo sovraespressione della nNOS e trattamento con 7-Ni e BSO.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Immediatamente dopo trasfezione le cellule sono state trattate con 1mM BSO e/o con 10μM 7-Ni e mantenuti per tutto l'esperimento. Dopo 48h dalla trasfezione le cellule sono state tripsinizzate e contate per esclusione da Trypan blue. Il numero totale di cellule *mock* e *nNOS* sono state riportate nel grafico. Il grafico riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. I dati sono espressi come medie $\pm$ S.D.; $n=4$; $p<0.05$. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La sovraespressione della nNOS provoca un decremento dell'enzima antiossidante SOD1

Esperimenti in precedenza condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato l'esistenza di una relazione funzionale tra la nNOS e l'enzima SOD1, la quale sembra essere fondamentale per mantenere l'integrità e l'efficienza della cellula nervosa (Rotilio *et al.*, 2002; Aquilano *et al.*, 2003). Abbiamo voluto, quindi, verificare in cellule SH-SY5Y, gli effetti della sovraespressione della nNOS sul contenuto e sull'attività della SOD1.

In primo luogo è stato compiuto il dosaggio dell'attività della SOD1, dopo sovraespressione della nNOS, mediante metodo polarografico. La misurazione ha rilevato un calo indicativo dell'attività dismutasica nelle cellule *nNOS* rispetto a quelle *mock* (1.11 ± 0.06 e 0.53 ± 0.08 μg/mg prot rispettivamente nelle cellule *mock* e *nNOS*).

Successivamente, e' stata misurata la quantità della SOD1 in seguito alla sovraespressione della nNOS, sia attraverso dosaggio proteico sia attraverso analisi di attività. Com'è possibile osservare sia dal Western blot, sia dall'analisi densitometrica, l'aumento dei livelli di nNOS portano ad un calo di espressione della SOD1 del 50% rispetto ai controlli. Con gli stessi estratti proteici è stata effettuata, anche, un'elettroforesi in condizioni native per dosare l'attività della SOD1, rappresentata come una banda acromatica, ottenuta come descritto nelle "*Procedure Sperimentali*", la quale conferma il decremento di attività dell'enzima SOD1 (*figura 26*).

La down-regolazione della SOD1 sembra tipica delle cellule neuronali, non-neuronali, di origine umana e murina

Per verificare se il fenomeno sopra descritto fosse tipico delle cellule SH-SY5Y o avvenisse anche in altre linee cellulari, abbiamo eseguito i precedenti esperimenti anche su altre cellule di neuroblastoma umano, CHP100 e murino, NSC34. Come riportato in *figura 27*, anche in queste linee cellulari, dopo sovraespressione della nNOS, si osserva un significativo decremento dell'attività e del contenuto proteico della SOD1. Inoltre, la *figura 28*, mostra come tale fenomeno sia effettivo anche in cellule di origine non neuronale, le AGS, cellule umane di adenocarcinoma gastrico.

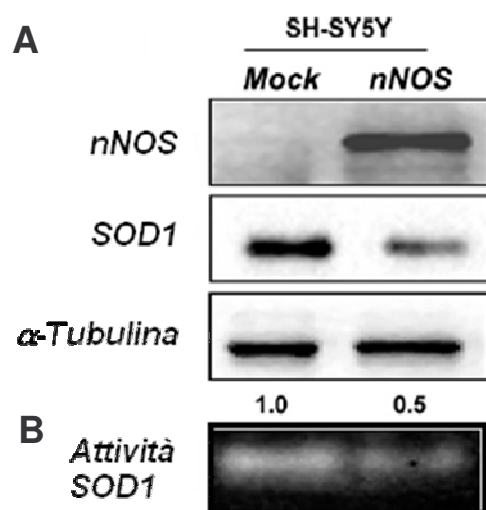


Figura 26. Analisi del contenuto proteico e dell'attività della SOD1 dopo sovraespressione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*).

A) Dopo 48h dalla trasfezione le cellule erano lisate e 10 μ g di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto della nNOS, della SOD1 è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS e anti-SOD1. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. La densità delle bande immunoreattive è stata calcolata utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad) e i dati sono espressi come rapporto tra SOD1/ α -tubulina. Tutti i cambiamenti riportati sono statisticamente significativi ($p < 0.01$).

B) L'attività della SOD1 è stata determinata mediante gel d'attività utilizzando 50 μ g di proteine totali non-denaturate. Il gel è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Tutti i cambiamenti riportati sono statisticamente significativi ($p < 0.01$). *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

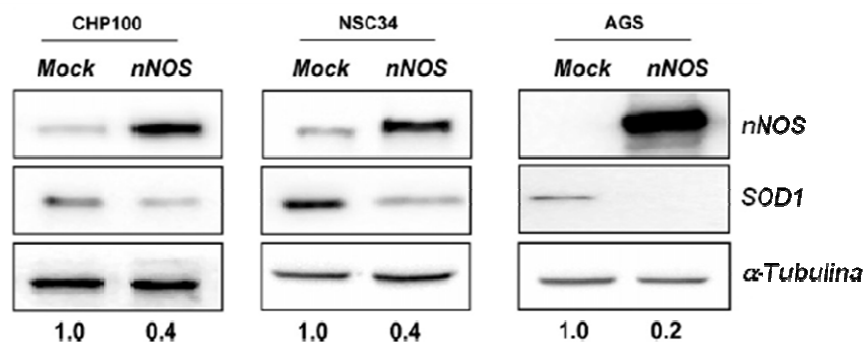


Figura 27. La sovraespressione della nNOS provoca un decremento dell'attività e del contenuto proteico della SOD1 in cellule CHP100, NSC34 e AGS.

Le cellule CHP100, NSC34 e AGS sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule erano lisate e 10 µg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto della nNOS, della SOD1 è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS e anti-SOD1. L'α-tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. La densità delle bande immunoreattive è stata calcolata utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad) e i dati sono espressi come rapporto tra SOD1/α-tubulina. Tutti i cambiamenti riportati sono statisticamente significativi ($p < 0.01$).

La sovraespressione della nNOS non altera il contenuto proteico della catalasi

Per comprendere la specificità del decremento della SOD1, in seguito a sovraespressione della nNOS, sono stati misurati i livelli di un altro enzima antiossidante, la catalasi. Contrariamente alla SOD1, l'attività e il contenuto proteico della catalasi non variano in seguito a trasfezione (figura 28). Questi risultati indicano che la down-regolazione della SOD1 è un fenomeno specifico per questa proteina.

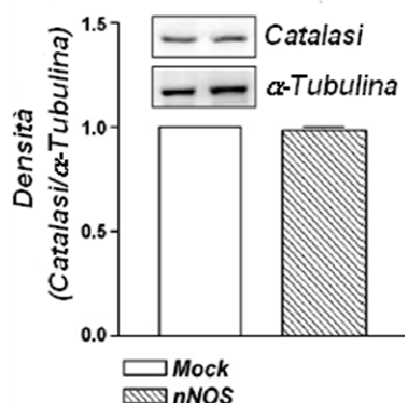


Figura 28. Controllo dell'espressione di un altro enzima antiossidante, la catalasi.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione le cellule erano lisate e 10 µg di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto della catalasi è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-catalasi. L'α-tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di sei esperimenti che hanno dato risultati simili. La densità delle bande immunoreattive è stata calcolata utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad) e i dati sono espressi come rapporto tra catalasi/α-tubulina. I dati sono espressi come medie ± S.D.

La diminuzione della SOD1 non sembra essere dovuta a danno nitrosativo

Come descritto in precedenza nell'introduzione, l'NO rappresenta una molecola altamente reattiva che può regolare differenti processi biologici, modificando specifici residui di tirosina di alcune proteine (nitrotirosine, NO₂Tyr), modulandone l'attività e la degradazione attraverso la *via* proteolitica ubiquitina/proteasoma (Davies *et al.*, 2001). Per evidenziare se la sovraespressione della nNOS provocasse un incremento nei livelli intracellulari di proteine nitrato, è stato dosato il contenuto delle proteine nitrosilate. I dosaggi immunoelettroforetici delle proteine nitrosilate non hanno mostrato alcuna formazione di bande immunoreattive (dati non mostrati), pertanto l'accumulo di NO nelle cellule non si traduceva in un

danno nitrosativo, escludendo così la possibilità che la down-regolazione della SOD1 fosse dovuta a fenomeni di nitrificazione.

La diminuzione della SOD1 non sembra essere dovuta all'attività del proteasoma

Esperimenti in precedenza condotti nel nostro laboratorio (Aquilano *et al.*, 2003) e dati presenti in letteratura (Lee *et al.*, 2001), dimostrano che la regolazione della SOD1 può essere modulata dalla *via* proteolitica ubiquitina/proteasoma, la cui attività può aumentare sotto condizioni di stress ossidativo/nitrosativo. Il proteasoma, infatti, è un complesso proteasico multiproteico in grado di rimuovere le proteine irrimediabilmente ossidate (Davies *et al.*, 2001) ed è anche considerato uno dei sistemi attraverso cui si manifesta la regolazione della SOD1. Per verificare se nelle cellule *nNOS*, la SOD1 potesse essere degradata a livello del proteasoma, abbiamo analizzato i livelli proteici dell'enzima dopo inibizione del proteasoma, ipotizzando che, arrestando il sistema proteolitico, i livelli proteici della SOD1 potessero ritornare a valori simili al controllo. A questo scopo, al momento della trasfezione, le cellule sono state trattate con uno specifico inibitore sintetico del proteasoma, l'MG132 alla concentrazione di 10µM e mantenuto per tutto l'esperimento. Diversamente da quanto ci aspettavamo, il trattamento con l'MG132 non è in grado di ristabilire i livelli proteici della SOD1 a valori simili al controllo (dati non mostrati), dimostrando che il decremento dell'enzima è ubiquitina/proteasoma-indipendente.

La sovraespressione della nNOS induce un'alterazione del legame di AP1 e Sp1 al DNA

Benchè l'attività e il contenuto proteico della SOD1 sia stato spesso trovato alterato in specifiche condizioni, come durante il differenziamento delle cellule ematopoietiche, nell'invecchiamento e nel cancro, il gene della SOD1 (*sod1*) è spesso considerato un "housekeeping gene" (Zelko *et al.*, 2002). Inoltre, l'espressione della SOD1 è regolata da alcuni fattori di trascrizione che possono agire come attivatori o inibitori della sua trascrizione. Infatti, la regione prossimale al promotore del gene *sod1* (-157) contiene sequenze *cis*-agenti molto conservate e riconosciute da elementi regolatori *trans*-agenti. In particolare, molti dati in letteratura, indicano che il fattore di trascrizione Sp1 funziona da attivatore della trascrizione del gene

sod1, mentre il fattore AP1 da regolatore negativo. Sp1 fa parte della famiglia dei fattori di trascrizione a dita di zinco (*zinc finger*), i quali contengono ripetizioni di residui di cisteina e istidina che legano ioni zinco e si ripiegano in strutture ad ansa (dita) che legano il DNA; mentre AP1 possiede una struttura definita "*leucine zipper*", costituita da un dominio conservato e ricco in residui di leucina. L'attività di questi fattori di trascrizione può essere modulata dall' NO (Pineda-Molina e Lamas, 2001), in particolare, AP1 inibisce la trascrizione del gene *sod1*, sequestrando dei co-attivatori essenziali per la sintesi del gene, piuttosto che legarsi direttamente al promotore (Afonso *et al.*, 2006). Inoltre, negli ultimi anni è stato dimostrato che i fenomeni di nitrosilazione a carico di alcuni fattori di trascrizione, tra i quali Sp1, possono inibire la loro capacità di legare il DNA e di mediare quindi la trascrizione dei geni a valle (Martínez-Ruiz e Lamas, 2004).

Sulla base di queste conoscenze, abbiamo verificato la capacità di AP1 di legarsi agli estratti nucleari di cellule *mock* e *nNOS* tramite saggio EMSA. L'incubazione degli estratti nucleari delle cellule *nNOS* con la sequenza consenso per AP1 biotinilata al 5', risulta in un incremento del complesso DNA-proteine, rispetto alle cellule *mock* (*figura 29*). La specificità del legame del DNA alle proteine nucleari è stata dimostrata compiendo una serie di esperimenti utilizzando appropriate concentrazioni del competitore, cioè dello stesso oligonucleotide per AP1 non marcato con biotina e aggiunto in eccesso, rispetto all'oligonucleotide marcato (*figura 29*). Questo risultato suggerisce che AP1 potrebbe giocare un ruolo negativo nella trascrizione del gene per la SOD1, interferendo nel legame con alcuni fattori di trascrizione come suggerito da Afonso *et al.*, (2006).

In seguito, abbiamo incubato gli estratti nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* con un oligonucleotide biotinilato per Sp1. La *figura 30* mostra la formazione di un complesso DNA/proteine significativamente diminuito negli estratti nucleari delle cellule *nNOS* rispetto ai controlli. Inoltre, per confermare che il complesso osservato fosse costituito dal fattore di trascrizione Sp1, sono stati condotti esperimenti di competizione, utilizzando una sequenza oligonucleotidica per Sp1 non biotinilata e utilizzata in eccesso. Come mostrato in *figura 30* l'aggiunta del competitore non marcato provoca la scomparsa del complesso DNA/proteina, confermando che esso è formato da Sp1.

Come dimostrato da Afonso *et al.*, (2006) la regione del promotore della SOD1 compresa tra i nucleotidi -59 e -48, rappresenta la regione di legame costitutivo e specifico per Sp1. Per comprendere se il legame di Sp1 al

promotore della SOD1 fosse alterato in seguito a sovraespressione della nNOS, abbiamo eseguito una serie di saggi EMSA, utilizzando come oligonucleotide marcato la regione -60/-38 del promotore del gene *sod1*. La *figura 31* mostra come il complesso Sp1/DNA è evidente solo nelle cellule *mock* rispetto a quelle *nNOS*, dove il segnale è sotto il limite della rilevazione.

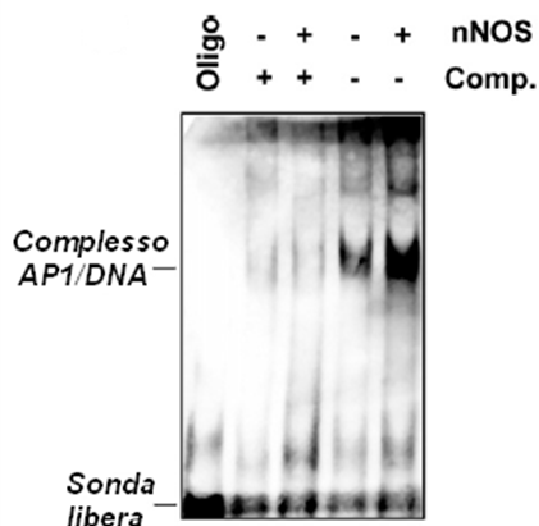


Figura 29. *Analisi del legame di AP1 alle proteine nucleari dopo sovraespressione della nNOS.*

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a saggio EMSA utilizzando l'oligonucleotide biotinilato per AP1. Gli esperimenti di competizione sono stati condotti utilizzando un oligonucleotide per AP1 non marcato con biotina e in eccesso (Comp: competitore). La sonda libera e il complesso DNA/proteina è indicato sulla figura. L'EMSA riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili.

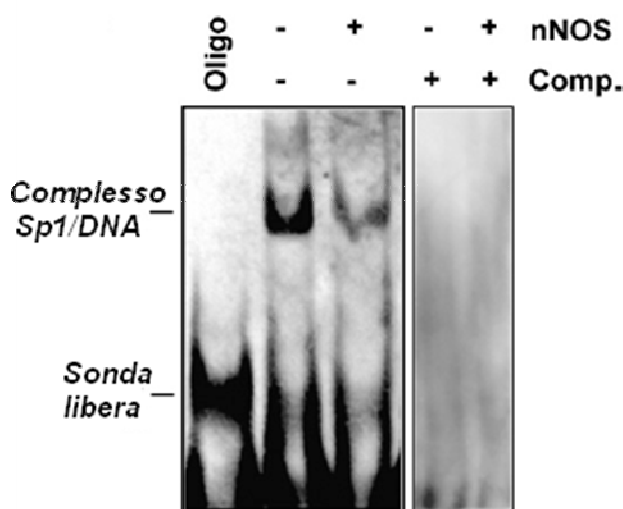


Figura 30. Analisi del legame di Sp1 alle proteine nucleari dopo sovraespressione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a saggio EMSA utilizzando l'oligonucleotide biotinilato per Sp1. Gli esperimenti di competizione sono stati condotti utilizzando un oligonucleotide per Sp1 non marcato con biotina e in eccesso (Comp: competitore). La sonda libera e il complesso DNA/proteina è indicato sulla figura. L'EMSA riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili.

Inoltre, i saggi EMSA effettuati in presenza del competitore per Sp1 non marcato, mostrano la specificità del legame del fattore di trascrizione alla sequenza -60/-38 del promotore del gene *sod1* (figura 31).

Infine, per confermare se la diminuzione dei livelli proteici della SOD1 fosse dovuta a una repressione trascrizionale del gene *sod1*, abbiamo analizzato i livelli del suo mRNA tramite RT-PCR semiquantitativa. La figura 32, mostra che i livelli di mRNA della SOD1 sono significativamente diminuiti nelle cellule *nNOS* rispetto alle *mock*.

I risultati finora mostrati sono in accordo con i dati della letteratura che dimostrano, come la down-regolazione della SOD1 è dovuta sia ad un

diminuito legame di Sp1 al promotore, sia ad un incremento dell'attività di AP1, il quale agisce da repressore trascrizionale per il gene della SOD1.

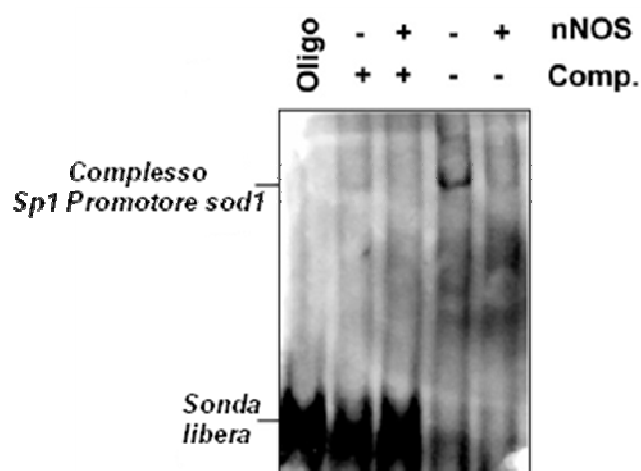


Figura 31. Analisi del legame di Sp1 al promotore della SOD1 dopo sovraespressione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a saggio EMSA utilizzando l'oligonucleotide biotinilato per la regione -60/-38 del promotore del gene *sod1*. Gli esperimenti di competizione sono stati condotti utilizzando un oligonucleotide per Sp1 non marcato con biotina e in eccesso (Comp: competitore). La sonda libera e il complesso DNA/proteina sono indicati sulla figura. L'EMSA riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili.

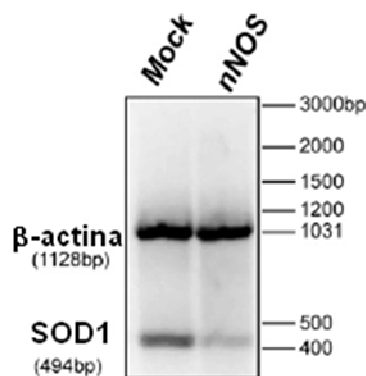


Figura 32. Analisi dei livelli di mRNA della SOD1 dopo sovraespressione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione gli mRNA delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a RT-PCR semi-quantitativa per rilevare i livelli dei messaggeri della SOD1 e β -actina. Il gel è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili.

La diminuzione della SOD1 non è dipendente dall'aumento di NO

Allo scopo di analizzare se la diminuzione del legame di Sp1 al promotore della SOD1 fosse causata dall'aumento di produzione dell'NO, abbiamo esaminato se, inibendo l'attività della nNOS, si potesse ristabilire il legame del fattore di trascrizione al DNA. Il saggio EMSA e l'analisi statistica riportati in *figura 33* mostrano che il trattamento delle cellule *nNOS* con l'inibitore 7-Ni non è in grado di ripristinare i livelli del complesso Sp1/DNA a valori simili al controllo. Questo risultato suggerisce che la down-regolazione della SOD1 può essere NO-indipendente.

Per confermare quest'ipotesi, sono stati condotti una serie di trattamenti utilizzando differenti inibitori: della nNOS (7-Ni) o delle altre isoforme di NOSs (L-NAME) o ancora del pathway dell'NO (carbossi-PTIO e LY83583). Per far ciò le cellule, subito dopo trasfezione, sono state trattate con 10 μ M 7-Ni, 100 μ M L-NAME, 25 μ M carbossi-PTIO o con 2 μ M LY83583 e mantenuti per tutto l'esperimento. La *figura 34* mostra che il decremento della SOD1 è ancora evidente dopo trattamento con 7-Ni e risultati simili sono stati ottenuti con tutti gli altri inibitori.

Questo risultato suggerisce che la diminuzione dei livelli della SOD1 mediata dall'inibizione di Sp1 e dall'incremento di attività di AP1, sono fenomeni NO-indipendenti.

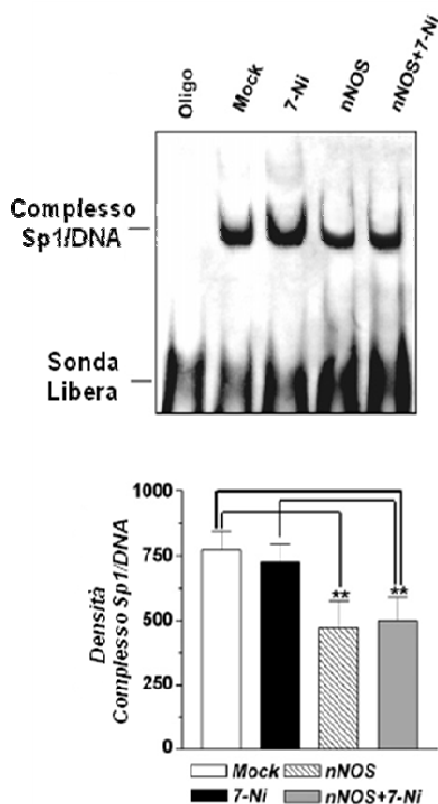


Figura 33. Analisi del legame di Sp1 alle proteine nucleari dopo inibizione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Immediatamente dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con 10 μ M 7-Ni e mantenute per tutto l'esperimento. Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a saggio EMSA utilizzando l'oligonucleotide biotinilato per la regione Sp1. La sonda libera e il complesso DNA/proteina sono indicati sulla figura. L'EMSA riportato è rappresentativo di quattro esperimenti che hanno dato risultati simili. La densità del complesso Sp1/DNA è stata calcolata utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad) e i dati sono espressi come medie $\pm$ S.D. (** $p < 0.001$).

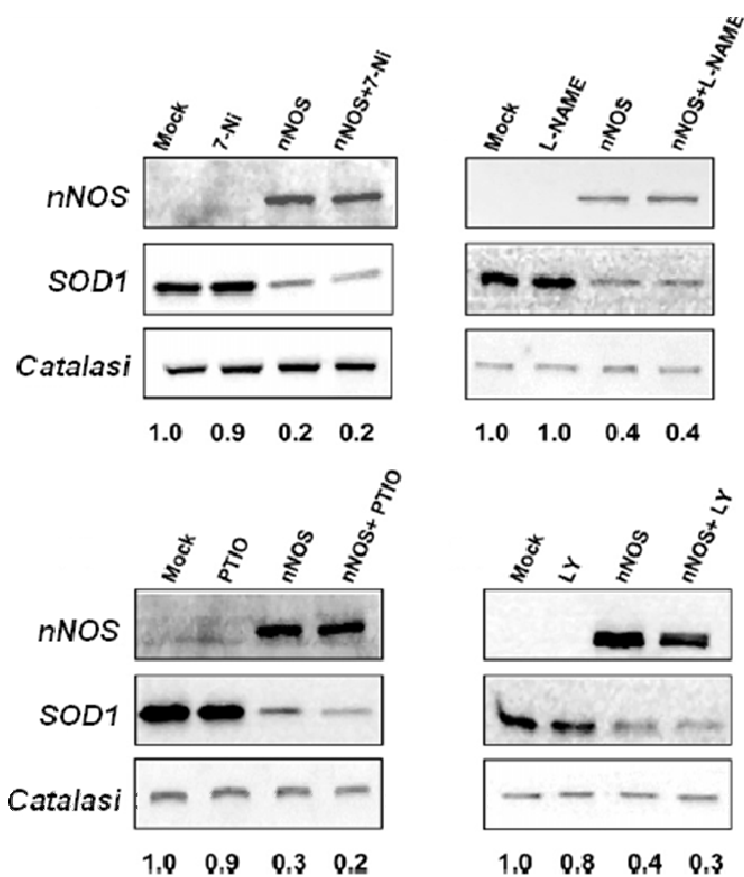


Figura 34. Analisi del contenuto proteico della SOD1 dopo inibizione della nNOS.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Immediatamente dopo a trasfezione le cellule sono state trattate con 10 μ M 7-Ni, 100 μ M L-NAME, 25 μ M carbossi-PTIO (PTIO) o con 2 μ M LY83583 (LY) e mantenute per tutto l'esperimento. Dopo 48h dalla trasfezione le cellule erano lisate e 10 μ g di estratti proteici totali sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto della nNOS edella SOD1 è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS e anti-SOD1. La catalasi è stata utilizzata come controllo di caricamento. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. Le densitometrie (riportate sotto l'immunoblot) sono state calcolate utilizzando il software Quantity one (Bio-Rad), normalizzate per catalasi e riportate come rapporto tra SOD/catalasi. Tutti i cambiamenti riportati sono statisticamente significativi

($p < 0,05$). *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

La nNOS interagisce con il fattore di trascrizione Sp1 a livello citosolico e nucleare

Contrariamente a quello che succede per il GSH, dove l'NO sembra direttamente provocare un incremento dei suoi livelli intracellulari per mantenere l'omeostasi della cellula nervosa, per la SOD1, invece, il suo decremento non sembra essere influenzato dalla sua aumentata produzione: infatti, benché i livelli di NO_x nelle cellule *nNOS* trattate con 7-Ni siano simili alle cellule *mock* non trattate con l'inibitore, i livelli di SOD1 rimangono più bassi rispetto alle cellule di controllo. I nostri dati suggeriscono, quindi, che la down-regolazione della SOD1 deve essere regolata da un altro meccanismo(i) ancora non ben definito, che potrebbe dipendere direttamente dalla proteina nNOS, piuttosto che dal suo prodotto.

Abbiamo quindi ipotizzato che la proteina nNOS potrebbe direttamente interagire, sia a livello nucleare che citosolico, con il fattore Sp1 impedendogli di legare il promotore del gene *sod1* e quindi bloccando la sua trascrizione. Questa ipotesi c'è stata in parte suggerita da dati presenti in letteratura che dimostravano come la nNOS possa interagire con il fattore di trascrizione CtBp, cambiando la sua localizzazione dal nucleo al citosol, impedendo così la trascrizione dei geni a valle (Riefler e Firestein, 2001). Abbiamo voluto, quindi, verificare se una parte della nNOS sovraespressa, fosse localizzata a livello nucleare anche nel nostro sistema sperimentale. A tale scopo, dopo 48h dalla trasfezione, le cellule sono state sottoposte a frazionamento cellulare per estrarre i nuclei e il citoplasma. Gli estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot. Come mostrato in *figura 35* la nNOS oltre ad essere localizzata nella frazione citosolica, è presente in piccole quantità anche nella frazione nucleare.

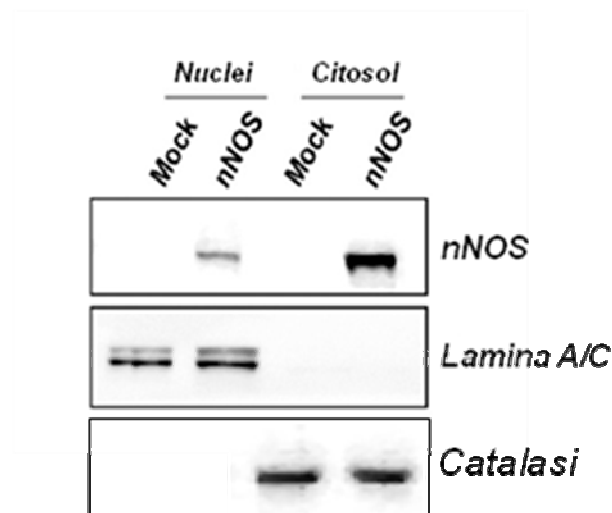


Figura 35. Analisi del contenuto della nNOS nelle frazioni nucleare e citosolica.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*). Dopo 48h dalla trasfezione 10 µg di estratti citosolici e nucleari sono stati separati su gel di poliacrilammide e il contenuto della nNOS è stato determinato mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-nNOS. La LaminaA/C è stata utilizzata come controllo di purezza degli estratti nucleari. La Catalasi è stata utilizzata come controllo di purezza degli estratti citosolici. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

In seguito abbiamo voluto verificare l'esistenza di un possibile cross-talk tra nNOS e Sp1: meccanismo attraverso il quale la nNOS potrebbe inibire il legame di questo fattore al gene della SOD1. Abbiamo quindi condotto una serie di esperimenti d'immunoprecipitazione sia sugli estratti citosolici sia nucleari. In particolare gli estratti proteici delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati immunoprecipitati in presenza dell'anticorpo anti-Sp1 e sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot usando un anticorpo anti-nNOS. L'analisi dimostra che nel nostro sistema sperimentale le due proteine sono in grado di interagire sia a livello nucleare sia, citosolico (*figura 36*). Lo

stesso risultato è stato ottenuto immunoprecipitando per la nNOS e rilevando con un anticorpo anti-Sp1 (figura 36)

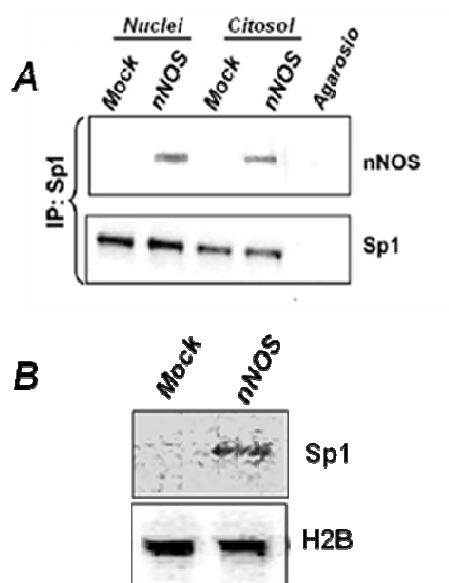


Figura 36. Analisi dell'interazione tra nNOS e Sp1 tramite immunoprecipitazione in cellule SH-SY5Y.

Le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con il cDNA della nNOS (cellule *nNOS*) o con il vettore vuoto (cellule *mock*).

A) Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti proteici delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con un anticorpo anti-Sp1 e successivo SDS-PAGE e Western blot per analizzare il contenuto della nNOS. Sp1 è stato utilizzato come controllo di caricamento e di immunoprecipitazione.

B) Dopo 48h dalla trasfezione gli estratti proteici nucleari delle cellule *mock* e *nNOS* sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con un anticorpo anti-nNOS e successivo SDS-PAGE e Western blot per analizzare il contenuto di Sp1. L'istone H2B è stato utilizzato come controllo di caricamento e di immunoprecipitazione. Gli immunoblot riportati sono rappresentativi di tre esperimenti che hanno dato risultati simili. *mock*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore vuoto; *nNOS*: cellule SH-SY5Y trasfettate con il vettore che porta il cDNA della nNOS.

Il complesso Sp1/nNOS è evidente anche nelle cellule NSC34, che esprimono di base buoni livelli proteici di nNOS, quindi per dimostrare che la nNOS ha un importante ruolo fisiologico nella modulazione di Sp1, abbiamo effettuato l'immunoprecipitazione su estratti proteici delle NSC34, che sappiamo esprimere basalmente alti livelli di nNOS. Gli estratti proteici sono stati immunoprecipitati con un anticorpo anti-Sp1 e sottoposti a Western blot con un anticorpo anti-nNOS. Come mostrato in *figura 37*, anche in questa linea cellulare si osserva la formazione del complesso Sp1/nNOS.

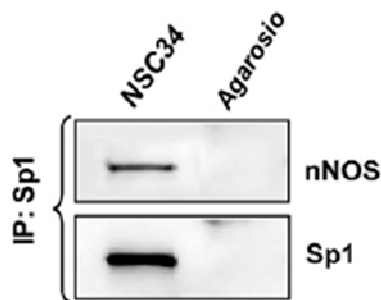


Figura 37. Analisi dell'interazione tra nNOS e Sp1 tramite immunoprecipitazione in cellule NSC34.

Gli estratti proteici delle cellule NSC34 sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con un anticorpo anti-Sp1 e successivi SDS-PAGE e Western blot per analizzare il contenuto della nNOS. Sp1 è stato utilizzato come controllo di caricamento e di immunoprecipitazione. L'immunoblot riportato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno dato risultati simili.

Questi risultati sembrano dimostrare come la nNOS sia in grado di sequestrare il fattore di trascrizione Sp1 sia livello nucleare sia citoplasmatico, impedendo il suo attacco al promotore del gene *sod1* e quindi la sua trascrizione. Inoltre, il dominio N-terminale della nNOS, il dominio PDZ, che possiede forti capacità di legame con numerose proteine (Riefler e Firestein, 2001), potrebbe essere il sito putativo di interazione tra l'nNOS e Sp1, infatti, allo scopo di chiarire la loro modalità di interazione, nel nostro laboratorio stiamo sovraesprimendo una forma di nNOS che manca del dominio N-terminale PDZ.

CONCLUSIONI

Molti dati in letteratura hanno evidenziato le differenti proprietà biologiche dell'NO, una molecola in grado di svolgere funzioni diverse e contrapposte in dipendenza della sua concentrazione e del sito di produzione: ad alte concentrazioni (μM - mM) può provocare effetti tossici, mentre a basse concentrazioni (nM) funziona da secondo messaggero e da antiossidante. Nel sistema nervoso l'NO assume un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità cellulare. Infatti, esso è un importante fattore che regola la neurotrasmissione e la neuromodulazione (Garthwaite, 2008; Feil e Kleppisch, 2008).

Nonostante il sistema nervoso sia un distretto dell'organismo altamente aerobio, le sue difese antiossidanti sono ridotte. E' ipotizzabile, quindi, che i sistemi della difesa antiossidante, e l'enzima deputato alla sintesi di NO, la nNOS, in condizioni fisiologiche, interagiscano finemente allo scopo di mantenere l'omeostasi cellulare ed impedire il danno ossidativo.

Studi condotti in precedenza nel nostro laboratorio, avevano dimostrato, in cellule neuronali in coltura, che l'incremento dei ROS indotto dal trattamento con i derivati dell'aglio, è un evento cruciale nel processo di apoptosi (Filomeni *et al.*, 2003), mediato dalla via di segnalazione di JNK/c-Jun. Inoltre, studi successivi hanno evidenziato che cellule di adenocarcinoma gastrico (AGS) che presentano elevati livelli di GPx, sono resistenti all'apoptosi mediata dai ROS. In particolare, le cellule AGS sono in grado di recuperare la fase d'arresto cellulare mediata dall'up-regolazione di p53/p21 e rientrare nel ciclo cellulare (Filomeni *et al.*, 2005).

In questi ultimi anni, l'interesse per il ruolo dell'NO come antiossidante, è notevolmente aumentato. Come in precedenza accennato a basse concentrazioni, l'NO può svolgere un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo indotto dai ROS, eliminando direttamente le specie più reattive come l' $\text{OH}^\cdot$ e l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Wink *et al.*, 2001; Mohanakumar *et al.*, 2002), o indirettamente provocando un aumento delle difese antiossidanti intracellulari (Dhakshinamoorthy e Porter 2004; Li e Wogan, 2005).

Gli studi condotti nella prima parte di questa tesi hanno cercato di evidenziare il ruolo della nNOS e dell'NO durante lo stress ossidativo al fine di chiarire i meccanismi attraverso i quali l'NO esplica la sua funzione di antiossidante e di mantenimento dell'omeostasi cellulare. Le condizioni di stress ossidativo sono state ottenute mediante trattamento con derivati organosolfurici dell'aglio, in grado di incrementare i livelli intracellulari di ROS (Filomeni *et al.*, 2003).

Abbiamo dimostrato che i composti derivanti dall'aglio (DADS e GE) determinano un incremento nella produzione di ROS e di NO, sia nelle

cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, sia in una linea cellulare ibrida ottenuta dalla fusione di neuroblastomi con neuroni motori di topo (NSC34). Tale aumento provoca un arresto della crescita in fase G2/M e in seguito l'apoptosi. Questi eventi sono accompagnati dall'accumulo della nNOS suggerendo come questo enzima sia un sensore precoce della tossicità dei ROS. L'up-regolazione della nNOS non è accompagnata da un parallelo aumento della produzione di NO, che rimane, quindi, a livelli basali. Questi risultati non sono tra loro contraddittori, poiché l'assenza di un incremento nella produzione di NO può essere un fenomeno indicativo di come l'NO venga prodotto molto precocemente, durante lo stress ossidativo, e venga immediatamente utilizzato per intercettare ed eliminare i ROS (Wink et al., 2001; Mohanakumar *et al.*, 2002). Evidentemente, quindi, le cellule di neuroblastoma utilizzate hanno una maggiore suscettibilità verso i ROS piuttosto che verso gli RNS. Questa ipotesi è stata confermata da una serie di esperimenti condotti in presenza degli inibitori della nNOS che mostrano un significativo incremento nella concentrazione di $O_2^{\cdot -}$ e dell'apoptosi sotto trattamento con DADS. Inoltre, in cellule SH-SY5Y sovraesprimenti la nNOS la tossicità dei derivati dell'aglio è significativamente diminuita confermando il ruolo protettivo di questo enzima nel nostro sistema sperimentale. La nNOS è in grado non solo di contrastare la citotossicità indotta dal DADS, ma anche di limitare il danno al DNA e l'ossidazione delle proteine come evidenziato dall'analisi del grado di fosforilazione dell'istone H2A.X e di carbonilazione delle proteine. I nostri dati, quindi, indicano che l'accumulo di nNOS rappresenta una risposta che la cellula mette in atto al fine di limitare il danno ossidativo mediato dal DADS e dai GE. Inoltre gli esperimenti effettuati sulle cellule sovraesprimenti la nNOS, suggeriscono che l'aumento di produzione dell'NO è in grado di neutralizzare il pathway di segnalazione attivato dai ROS (attivazione della via JNK/c-Jun) (*figura 1*).

In conformità a questi risultati è possibile ipotizzare l'uso dei derivati dell'aglio come agenti neuroprotettivi in tutte quelle patologie del sistema nervoso, associate a un aumento dello stress ossidativo. Il DADS e i GE potrebbero, inoltre, essere utilizzati in quelle patologie nelle quali si osserva una disfunzione nella produzione di NO o nell'attività della nNOS. Non a caso molte patologie del tratto gastro-intestinale sono dovute alla mancata espressione della nNOS nei neuroni del tratto mioenterico (Takahashi, 2003). Infatti, a livello di questa regione, l'NO rilasciato dalla nNOS determina il rilassamento del muscolo liscio. La mancata espressione di questo enzima e la conseguente riduzione nella produzione di NO, causano,

infatti, difetti nel rilassamento muscolare, un denominatore comune di molte patologie gastrointestinali (acalasia, gastroparesi diabetica e la stenosi pilorica ipertrofica). E' quindi plausibile ipotizzare che il trattamento con il DADS o con GE potrebbe prevenire o mitigare queste patologie inducendo un'iperattivazione della nNOS.

Tutti questi dati pongono l'accento sulla modulazione della nNOS attraverso l'uso dei derivati dell'aglio, i quali rappresentano un nuovo strumento per la prevenzione e/o il trattamento di tutti quei stadi patologici nei quali l'NO gioca un ruolo centrale. Non a caso, negli ultimi anni altri gruppi di ricerca hanno proposto l'uso dei derivati dell'aglio come antiossidanti e/o agenti neuroprotettivi (Koh *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Infatti, l'uso di queste molecole porterebbe a una maggiore disponibilità intracellulare di NO, nel *range* fisiologico, e quindi a un aumento della neuroprotezione.

I risultati ottenuti in questa tesi suggeriscono, almeno in parte, come i derivati dell'aglio possiedano un'importante proprietà benefica: quella di indurre prontamente ed efficacemente l'espressione della nNOS. Sulla base delle nostre conoscenze, l'espressione inducibile di questo enzima è ancora poco conosciuta. L'unica evidenza deriva da studi condotti da Andoh e collaboratori, i quali dimostrano la forte responsività della nNOS nel contrastare una rapida produzione di radicali, generati attraverso una deprivazione di siero. Inoltre, essi dimostrano che tale evento è di fondamentale importanza per bloccare la neurotossicità dei radicali dell'O₂ e che può essere revertito attraverso l'uso di inibitori specifici della nNOS (Andoh *et al.*, 2000). Inoltre, non possiamo escludere, nel nostro sistema sperimentale, che l'NO prodotto dalla nNOS, oltre a bloccare la produzione di ROS, possa anche attivare altre vie di segnalazione che noi non abbiamo preso in considerazione in questo studio. Abbiamo, infatti, ipotizzato che lo stesso meccanismo molecolare individuato da Andoh *et al.*, cioè l'up-regolazione di SOD2 e tioredossina, e la down-regolazione di p66^{shc}, potesse verificarsi anche nelle nostre condizioni sperimentali (Andoh *et al.*, 2000; Chiueh *et al.*, 2005). A questo scopo nel nostro laboratorio stiamo svolgendo degli esperimenti per approfondire quest'aspetto.

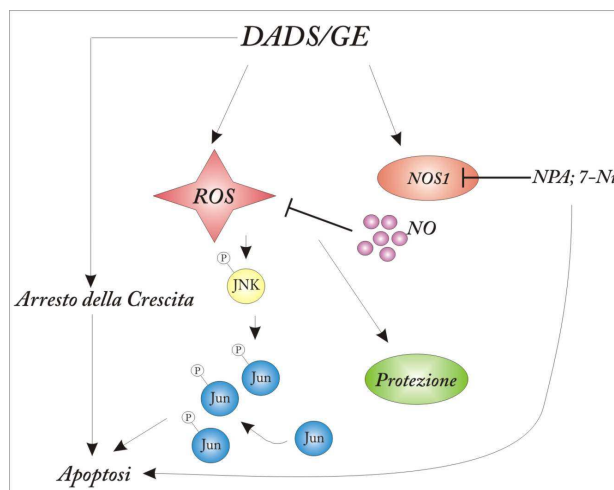


Figura 1. Effetti del trattamento con i derivati dell'aglio sull'omeostasi cellulare.

Come accennato in precedenza, l'NO non viene visto esclusivamente come un specie dannosa per la vitalità cellulare, ma anche come una molecola che partecipa attivamente nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. Soprattutto a livello del sistema nervoso, notoriamente suscettibile allo stress ossidativo, la nNOS e l'NO possono modulare direttamente o indirettamente l'espressione dei sistemi di difesa antiossidante, allo scopo di controllare e di impedire l'istaurarsi del danno ossidativo che porterebbe alla neurodegenerazione.

Un enzima antiossidante che potrebbe essere modulato dalla nNOS o dal suo prodotto, è la SOD1. Quest'ultimo rappresenta il più importante elemento della difesa antiossidante enzimatica contro i ROS e in particolare contro l'O₂^{•-}, ma è anche in grado di contrastare la tossicità dell'NO prevenendo la formazione dell'ONOO⁻, uno degli RNS più reattivi. La presenza di un *cross-talk* tra i due enzimi era stato dimostrato anche in studi effettuati precedentemente nel nostro laboratorio: la sopravvivenza di cellule di neuroblastoma sovraesprimenti la forma mutata pro-ossidante della SOD1 (G93A) è garantita dall'attivazione del sistema ubiquitina/proteasoma e dalla conseguente inibizione dell'espressione della nNOS (Rotilio *et al.*, 2002; Aquilano *et al.*, 2003). Inoltre, come accennato in precedenza, attraverso fenomeni di S-nitrosilazione, l'NO è in grado di inibire l'attività trascrizionale di molti fattori di trascrizione come Sp1. (Martínez-Ruiz e

Lamas, 2004). Proprio attraverso questo meccanismo che l'nNOS potrebbe inibire Sp1, uno dei fattori di trascrizione della SOD1 e bloccarne la sintesi.

La conferma di come la nNOS/NO possano esercitare una regolazione sui livelli dei sistemi antiossidanti, quali la SOD1 ed il GSH, è emersa dallo studio della linea cellulare di neuroblastoma sovraesprimente la nNOS. Come conseguenza della trasfezione, le cellule SH-SY5Y sono dotate di un'elevata produzione di NO e di un significativo aumento dei livelli intracellulari della nNOS. Abbiamo visto come in queste cellule l'aumento di produzione dell'NO provochi un arresto della proliferazione senza, però, causare morte cellulare. Inoltre, studi già presenti in letteratura, ci hanno suggerito che l'NO può modulare la vitalità cellulare, determinando un aumento dei livelli del fattore di trascrizione p53 (Zhou *et al.*, 2004). L'analisi mediante Western blot, infatti, dimostra un aumento del suo contenuto proteico, suggerendo che l'inibizione della proliferazione cellulare è verosimilmente causata proprio dalla capacità dell'NO di incrementare i livelli di questo fattore di trascrizione, per riparare gli eventuali danni al DNA. Questa sovrapproduzione di NO a livello endogeno è analogamente in grado di incrementare anche i livelli di GSH. L'insorgenza di questo meccanismo di compensazione può essere considerato di significato generale per le cellule di origine neuronale, poiché è stato verificato non solo nelle SH-SY5Y, ma anche nelle cellule CHP100. L'aumento del tripeptide è un evento strettamente associato all'incremento dei livelli di NO, poiché l'inibizione della nNOS con 7-Ni, un inibitore specifico dell'isoforma nNOS, è in grado di riportare i livelli del GSH a valori simili al controllo. Il GSH è fondamentale per la sopravvivenza delle cellule *nNOS*, poiché trattamenti con la BSO, un noto inibitore della sua sintesi, provoca una diminuzione significativa della vitalità cellulare, mentre co-trattamenti con il 7-Ni sono in grado di revertire tale fenomeno, proteggendo completamente le cellule *mock* e *nNOS* dalla citotossicità indotta dalla mancata sintesi di GSH. Questi risultati dimostrano che la morte cellulare osservata in assenza di GSH è indotta proprio dall'attività della nNOS. Inoltre, attraverso questi dati confermiamo che il GSH gioca un importante ruolo nel contrastare la citotossicità dell'NO sia in condizioni fisiologiche che non-fisiologiche, e ciò è in accordo con quanto riportato in studi precedenti che attribuiscono al GSH la capacità di schermare la tossicità dell'NO, in vari tipi cellulari esposti ai suoi flussi esogeni (Moellering *et al.*, 1998; Ridnour *et al.*, 2005).

L'aumento di nNOS era accompagnato in tutte le linee cellulari utilizzate da una diminuzione dell'attività enzimatica e del contenuto proteico della SOD1. Tale down-regolazione si è dimostrato un fenomeno specifico, per la

SOD1, poiché non si osserva alcun cambiamento nell'attività e nel contenuto proteico dell'antiossidante catalasi. Questi dati sembrano inoltre suggerire che la diminuzione della SOD1 è un fenomeno specifico e che è operativo in tutte le linee cellulari analizzate (NSC34, CHP100, SH-SY5Y, AGS).

La prima e più ovvia ipotesi formulata era che la down-regolazione della SOD1 poteva essere ascrivibile a una modificazione post-traduzionale messa in atto dall'NO. Dati dalla letteratura dimostravano, infatti, che l'NO è una molecola altamente reattiva che può regolare diversi processi biologici modificando specifici residui di tirosina delle proteine (nitrosilazione, NO₂Tyr). Questa modificazione può regolare l'attività delle proteine o può provocarne la degradazione a livello del sistema ubiquitina/proteasoma (Davies, 2001). In realtà l'analisi dei livelli di nitrotirosine, condotta con metodi immunologici, e gli esperimenti condotti con l'inibitore del proteasoma hanno escluso tale ipotesi.

Infatti, risultati ottenuti in precedenza nel nostro laboratorio avevano dimostrato come la SOD1 può essere regolata dal proteasoma, la cui attivazione è sensibile allo stress ossidativo/nitrosativo (Aquilano *et al.*, 2003). Se la nostra ipotesi fosse stata veritiera, dopo inibizione del proteasoma con un inibitore specifico (MG132) i livelli proteici della SOD1 nelle cellule sovraesprimenti nNOS sarebbero dovuti ritornare simili a quelli delle cellule *mock*. Nel nostro sistema sperimentale, invece, dopo inibizione del proteasoma con l'MG132, i livelli di SOD1 rimangono comunque diminuiti nelle cellule *nNOS* rispetto ai controlli, confermando che i meccanismi implicati nella down-regolazione di questo enzima non dipendono dall'attività del sistema proteolitico ubiquitina/proteasoma.

In realtà gli studi successivi condotti avvalendosi di tecniche di biologia molecolare, quali l'EMSA, e di esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno permesso di stabilire che la SOD1 è down-regolata attraverso un meccanismo NO-indipendente. Come accennato in precedenza, benché l'attività e il contenuto proteico della SOD1 siano stati trovati alterati in molte condizioni fisiologiche e patologiche, il suo gene (*sod1*) è spesso considerato un "housekeeping gene" (Zelko *et al.*, 2002). Tramite l'uso di saggi EMSA, è stato possibile dimostrare che l'espressione della SOD1 può essere modificata in presenza di livelli non fisiologici di nNOS. Questo meccanismo di regolazione coinvolge i fattori di trascrizione AP1 e Sp1 le cui attività di legame sono rispettivamente aumentate e diminuite nelle cellule sovraesprimenti nNOS. Questo risultato, in accordo a quanto riportato da Afonso *et al.* (2006) è indice di una diminuzione dell'attività trascrizionale sul promotore del gene *sod1*.

A testimoniare la reale esistenza di un meccanismo d'inibizione di espressione genica, ci sono i dati ottenuti dall'analisi dei livelli di mRNA della SOD1 mediante RT-PCR che risultano significativamente diminuiti. I nostri dati sono in accordo con quelli di Afonso *et al.* (Afonso *et al.*, 2006), che dimostrano come la down-regolazione della SOD1 sia dovuta a due principali cause: il decremento dell'attività di legame di Sp1 al promotore della SOD1 e un aumento dell'attività del fattore AP1, il quale agisce da repressore trascrizionale del gene *sod1*.

La diminuita capacità di Sp1 di legare il promotore del gene *sod1* non è conseguenza di un aumento di produzione dell'NO e di una modulazione di Sp1 NO-mediata. Era stato, infatti dimostrato che l'NO poteva nitrosilare Sp1, determinando la sua degradazione e causare di conseguenza una diminuzione dei livelli di trascrizione del gene *sod1* (Pineda-Molina e Lamas, 2001). I saggi EMSA effettuati dopo trattamento con gli inibitori del pathway dell'NO mettono in luce un meccanismo di regolazione di trascrizione genica NO-indipendente in quanto i livelli di attività di Sp1 e del contenuto di SOD1 non erano mai ristabiliti.

Dai nostri studi emerge che la regolazione dell'espressione di *sod1* è dovuta ad un meccanismo non ancora conosciuto e che dipende direttamente dai livelli intracellulari della proteina nNOS, piuttosto che dal suo prodotto enzimatico. In particolare, è la nNOS che direttamente inibisce l'attività di Sp1 attraverso un'interazione proteina-proteina sia a livello nucleare sia citoplasmatico. I nostri dati sono suffragati da altri lavori pubblicati di recente che hanno messo in luce come la nNOS possa interagire anche con il fattore di trascrizione CtBp impedendo la sua traslocazione a livello nucleare e la sua attività trascrizionale sui geni a valle (Riefler e Firestein, 2001). I nostri dati non solo dimostrano l'esistenza di un eterocomplesso stabile nNOS/SOD1, ma anche la presenza di nNOS a livello nucleare nonostante essa sia considerata una proteina prevalentemente citosolica. L'interazione diretta tra le due proteine è confermata anche a livello fisiologico nelle cellule murine NSC34 non transfettate con il cDNA della nNOS. L'evidenza di un'interazione diretta proteina-proteina potrebbe avere un ruolo fisiologico importante nella modulazione dell'attività di Sp1 e apre nuove prospettive nella comprensione del ruolo della nNOS nella modulazione non solo dell'espressione del gene *sod1* ma anche degli altri geni controllati da Sp1. I nostri dati potrebbero essere così riassunti: 1) l'NO endogeno è in grado di modulare direttamente i livelli di GSH, rinforzando l'idea che questo tripeptide rappresenta un importante agente protettivo contro la citotossicità dell'NO; 2) la down-regolazione della SOD1 è un meccanismo

NO-indipendente, che implica l'interazione diretta di Sp1 con la proteina nNOS. Quest'ultimo meccanismo potrebbe essere visto come la somma di due eventi: il sequestro di Sp1 da parte della nNOS, e l'inibizione del suo legame al promotore del gene *sod1*. In maniera simile a quello che succede per Sp1, la nNOS potrebbe interagire con AP1, favorendo la sua traslocazione verso il nucleo e permettendo di svolgere il suo ruolo di repressore della trascrizione del gene *sod1*. Nel nostro laboratorio sono in atto esperimenti per confermare quest'ultima ipotesi e per chiarire il meccanismo d'interazione Sp1-nNOS. In particolare, stiamo tentando di esprimere una forma di nNOS deleva del suo dominio N-terminale PDZ, un dominio responsabile dell'interazione con altre proteine (CAPON, PIN, HSP90 ecc) che regolano la funzione della nNOS.

Concludendo, questi dati forniscono un contributo alla comprensione delle funzioni della nNOS, sia come enzima in grado di produrre NO, sia come un regolatore dell'espressione genica. Inoltre, i dati ottenuti ci permettono di avvalorare ulteriormente l'importanza dell'NO come modulatore dei livelli di GSH, fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi redox e per la protezione del danno cellulare sotto stress ossidativo/nitrosativo (figura 2).

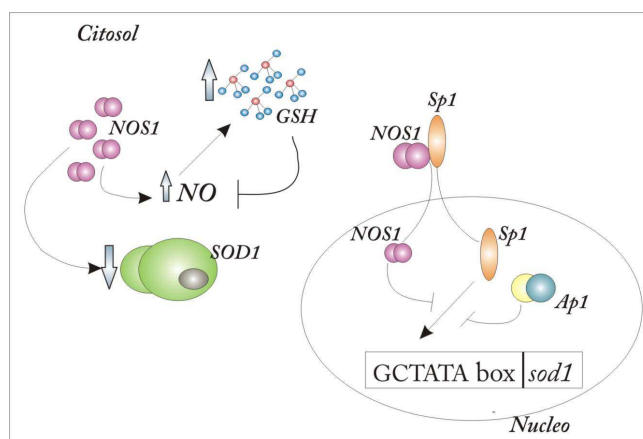


Figura 2. Effetti della sovraespressione della nNOS sull'omeostasi cellulare.

I risultati descritti in questa tesi sono stati oggetto di pubblicazioni su due riviste scientifiche:

- **Baldelli S**, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. (2008). Glutathione and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**:2660-70.
- Aquilano K, Filomeni G, **Baldelli S**, Piccirillo S, De Martino A, Rotilio G, Ciriolo MR. (2007) Neuronal nitric oxide synthase protects neuroblastoma cells from oxidative stress mediated by garlic derivatives. *J Neurochem.* **101**:1327-37.

BIBLIOGRAFIA

- Afonso V, Santos G, Collin P, Khatib AM, Mitrovic DR, Lomri N, et al. (2006) Tumor necrosis factor- α down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway. *Free Radic Biol Med* **41**:709–21.
- Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* **25**: 510-517.
- Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**:639-53.
- Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **150**: 5080-5085.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357**:593-615.
- Amagase H, Petesh BL, Matsuura H, Kasuga S. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* **131**:955s–962s.
- Anderson ME. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* **111-112**:1-14.
- Andoh T, Lee SY, Chiueh CC. (2000) Preconditioning regulation of bcl-2 and p66shc by human NOS1 enhances tolerance to oxidative stress. *FASEB J.* **14**:2144–2146.
- Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. (2003) Proteasome activation and nNOS down-regulation in neuroblastoma cells expressing a Cu,Zn superoxide dismutase mutant involved in familial ALS. *J Neurochem.* **85**:1324-35.
- Aquilano K, Vigilanza P, Rotilio G, Ciriolo MR. (2006) Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1. *FASEB J.* **20**:1683-5.
- Aslan M, Ozben T. (2004) Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **1**:111-9.

- Barkats M, Millecamps S, Abrioux P, Geoffroy MC, Mallet J. (2000) Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem.* **75**: 1438-46.
- Barry AN, Clark KM, Otoikhian A, van der Donk WA, Blackburn NJ. (2008) Selenocysteine Positional Variants Reveal Contributions to Copper Binding from Cysteine Residues in Domains 2 and 3 of Human Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Biochemistry*. [Epub ahead of print].
- Bellamy TC, Wood J, Goodwin DA, Garthwaite J. (2000) Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 2928-2933.
- Bian K, Doursout MF, Murad F. (2008) Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens* (Greenwich). **10**:304-10.
- Boissel JP, Zelenka M, Gödtel-Armbrust U, Feuerstein TJ, Förstermann U. (2003) Transcription of different exons 1 of the human neuronal nitric oxide synthase gene is dynamically regulated in a cell- and stimulus-specific manner. *Biol Chem.* **384**:351-62.
- Bros M, Boissel JP, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U. (2006) Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences. *Genomics.* **87**:463-73.
- Brown GC. (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* **1**:46-57.
- Brunori M, Giuffrè A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Sarti P.(2004) Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta.* **1655**:365-71.
- Bustamante J, Czerniczyniec A, Lores-Arnaiz S. (2007) Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Front Biosci.* **12**:1034-40.

- Butterfield DA. (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.* **36**:1307-13.
- Calabrese V, Bates TE, Stella AM. (2000) NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.* **25**:1315-41.
- Carreras MC, Franco MC, Finocchietto PV, Converso DP, Antico Arciuch VG, Holod S, Peralta JG, Poderoso JJ. (2007) The biological significance of mtNOS modulation. *Front Biosci.* **12**:1041-8.
- Carreras MC, Poderoso JJ. (2007) Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**:1569-80.
- Casareno RL, Waggoner D, Gitlin JD. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**: 23625-23628.
- Cashaman NR, Durham HD, Blustajn JK, Od K, Tabira T, Shaw LT, Dahrouge S, Antel JP. (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn.* **194**:209-221.
- Cengel A, Sahinarslan A. (2006) Nitric oxide and cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg.* **6**:364-8.
- Chae HJ, Kim HR, Kwak YG, Ko JK, Joo CU, Chae SW. (2001) Signal transduction of nitric oxide donor-induced protection in hydrogen peroxide-mediated apoptosis in H9C2 cardiomyoblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **23**:187-204.
- Chang HP, Chen YH. (2005) Differential effects of organosulfur compounds from garlic oil on nitric oxide and prostaglandin E2 in stimulated macrophages. *Nutrition* **21**:530-536.
- Chen Y, Chan PH, Swanson RA. (2001) Astrocytes overexpressing Cu,Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia.* **33**: 343-7.

- Chiu JJ, Wung BS, Hsieh HJ, Lo LW, Wang DL.(1999) Nitric oxide regulates shear stress-induced early growth response-1. Expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *Circ Res.* **85**:238-46.
- Chiueh CC, Andoh T. and Chock P. B. (2005) Roles of thioredoxin in nitric oxide-dependent preconditioning-induced tolerance against MPTP neurotoxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**:S96–S102.
- Chiueh CC, Rauhala P. (1999) The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res.* **31**(6):641-50.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. (2002) Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol.* **35**:116-26.
- Choi YB, Lipton SA. (2000) Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci.* **57**:1535-41.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS. (1999) PS.D.-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* **274**: 27467-27473.
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **282**:1075-9.
- Ciriolo MR, Aquilano K, De Martino A, Carri MT, Rotilio G. (2001) Differential role of superoxide and glutathione in S-nitrosoglutathione-mediated apoptosis: a rationale for mild forms of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with less active Cu,Zn superoxide dismutase mutants. *J Neurochem.* **77**: 1433-43.
- Ciriolo MR, De Martino A, Lafavia E, Rossi L, Carri MT, Rotilio G (2000). Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J Biol Chem.* **275**:5065-72.

- Ciriolo MR, Desideri A, Paci M, Rotilio G. (1990) Reconstitution of Cu,Zn-Superoxide dismutase by the Cu(I)•Glutathione complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**: 11030-11034.
- Contestabile A. (2008) Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Prog Neurobiol*. **84**:317-28.
- Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD. (1997) The copper chaperon for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**: 23469-23472.
- D'Adda di Fagagna F, Reaper P. M, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**:194–198.
- Daff S, Noble MA, Craig DH, Rivers SL, Chapman SK, Munro AW, Fujiwara S, Rozhkova E, Sagami I, Shimizu T. (2001) Control of electron transfer in neuronal NO synthase. *Biochem Soc Trans*. **29**:147-52.
- Daff S, Sagami I, Shimizu T. (1999) The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem* **274**: 30589-30595.
- Danielson SR, Andersen JK. (2008) Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. **44**:1787-94.
- Davies KJ. (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **83**: 301-310.
- De Martino A, Filomeni G, Aquilano K, Ciriolo MR, Rotilio G. (2006) Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem*. **17**:742–749.
- Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A. (2001) A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. **2**: 9-18.

- Dhakshinamoorthy S. and Porter AG. (2004) Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 20 096–20 107.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**: 601-605.
- Donald SP, Sun XY, Hu CA, Yu J, Mei JM, Valle D, Phang JM. (2001) Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res.* **61**: 1810-1815.
- Dudzinski DM, Michel T. (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* **75**:247-60.
- Duncan AJ, Heales SJ. (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med.* **26**: 67-96.
- Endo H, Nito C, Kamada H, Yu F, Chan PH. (2007) Reduction in oxidative stress by superoxide dismutase overexpression attenuates acute brain injury after subarachnoid hemorrhage via activation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β survival signaling. *J Cereb Blood Flow Metab.* **27**:975-82.
- Fabbri F, Brigliadori G, Ulivi P, Tesei A, Vannini I, Rosetti M, Bravaccini S, Amadori D, Bolla M, Zoli W. (2005) Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis.* **10**:1095-103.
- Fan JS, Zhang Q, Li M, Tochio H, Yamazaki T, Shimizu M, Zhang M. (1998) Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. *J Biol Chem* **273**:33472-81.
- Feil R, Kleppisch T. (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol.* **184**:529-60.

- Feletou M, Tang EH, Vanhoutte PM. (2008) Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci.* **13**: 4198-217.
- Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. (2005) Glutathione-related systems and modulation of extracellular signal-regulated kinases are involved in the resistance of AGS adenocarcinoma gastric cells to diallyl disulfide-induced apoptosis. *Cancer Res.* **65**:11735-42.
- Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. (2003) Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH₂-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* **63**:5940–5949.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol.* **64**:1057-64.
- Fleming I, Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**: 1-12.
- Folkes LK, Wardman P. (2004) Kinetics of the reaction between nitric oxide and glutathione: implications for thiol depletion in cells. *Free Radic Biol Med* **37**:549–56.
- Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**: 773-790.
- Frade JG, Barbosa RM, Laranjinha J. (2008) Stimulation of NMDA and AMPA glutamate receptors elicits distinct concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal slices. *Hippocampus* [Epub ahead of print].
- Fujioka Y, Taniguchi T, Yokoyama M, Ishikawa Y. (2004) Inhibitory effect of nitric oxide on oxidation of low-density lipoprotein. *Nippon Rinsho* **9**:493-5.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **172**: 413-416.

- Garthwaite J. (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* **27**:2783-802.
- Geller DA, Billiar TR. (1998) Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* **17**: 7-23.
- Gilbert HF. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange In: *Advances in enzymology* (Meister, A., ed.) New York, Wiley Interscience. pp.69-173.
- Giuffrè A, Barone MC, Brunori M, D'Itri E, Ludwig B, Malatesta F, Müller HW, Sarti P. (2002) Nitric oxide reacts with the single-electron reduced active site of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* **277**:22402-6.
- Gralla EB, Kosman DJ. (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* **30**:251-319.
- Harris MB, Mitchell BM, Sood SG, Webb RC, Venema RC.(2008) Increased nitric oxide synthase activity and Hsp90 association in skeletal muscle following chronic exercise. *Eur J Appl Physiol.* **104**:795-802.
- Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ. (1994) Formation of free nitric oxide from l-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10992-10996.
- Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* **75**: 1273-1286.
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ.(2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* **31**:1101-10.
- Hummel SG, Fischer AJ, Martin SM, Schafer FQ, Buettner GR. (2006) Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free Radic Biol Med.* **40**:501-6.

- Ihara H, Kuwamura M, Atsuta M, Nihonmatsu I, Okada T, Mukamoto M, Kozaki S.(2006) Expression of neuronal nitric oxide synthase variant, nNOS-mu, in rat brain. *Nitric Oxide* **15**:13-9.
- Ippoushi K, Itou H, Azuma K, Higashio H. (2002) Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production. *Life Sci.* **71**:411–419.
- Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. (2003) Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration require sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer.* **106**:496-504.
- Jaffrey SR, Snyder SH. (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* **274**: 774-777.
- Jiang X, Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**:87-106.
- Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR Jr.(1999) Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.***27**:1357-66.
- Karihtala P, Soini Y. (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* **115**:81-103.
- Kaur C, Ling EA. (2008) Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system *Curr Med Chem.***15**:3068-80.
- Kawanishi S, Hiraku Y. (2006) Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal.* **8**:1047-58.
- Kim JG, Koh SH, Lee YJ, Lee KY, Kim Y, Kim S, Lee MK. and Kim SH. (2005) Differential effects of diallyl disulfide on neuronal cells depend on its concentration. *Toxicology* **211**:86–96.
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. (2001) Differential regulation of NO availability

from macrophages and endothelial cells by the garlic component s-allyl cysteine. *Free Rad. Biol. Med.***30**:747–756.

Kim S, Ponka P. (2003) Role of nitric oxide in cellular iron metabolism. *Biometals* **16**:125-35.

Kim YM, Bergonia H, Lancaster JR Jr. (1995) Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **374**:228-32.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. (1999) Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* **84**: 253-256.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**: 31138-31148.

Kleimbongard P, Keymel S, Kelm M. (2007) New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb Haemost.* **98**:970-4.

Knipp S, Bicker G. (2009) Regulation of enteric neuron migration by the gaseous messenger molecules CO and NO. *Development*.**136**:85-93.

Knowles RG, Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* **298**: 249-258.

Koh SH, Kwon H, Park KH, Ko JK, Kim JH, Hwang MS, Yum YN, Kim OH, Kim J, Kim HT, Do BR, Kim KS, Kim H, Roh H, Yu HJ, Jung HK, Kim SH. (2005) Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* **133**:176-86.

Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. (2000) Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II alpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem* **275**: 28139-28143.

Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH. (1997) Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and

edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.***17**:4180-9.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* **5**: 834-842.

Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. (2000) NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* **406**: 633-636.

Lee HC, Wei YH. (2007) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* **232**:592-606.

Lee M, Hyun D, Jenner P, Halliwell B. (2001) Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defence and nitric oxide production. *J Neurochem* **78**:32-41.

Lee M, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P. (2001) Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem.* **78**: 209-20.

Li CQ and Wogan GN. (2005) Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* **226**:1-15.

Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS.(2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* **962**:318-31.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res.***72**:403-12.

- Manucha W, Vallés PG. (2008) Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide* **18**:204-15.
- Marletta MA, Tayeh MA, Hevel JM. (1990) Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* **2**: 219-25.
- Martínez-Ruiz A, Lamas S. (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction *Cardiovascular Research* **62**:43-52
- Miller RT, Martasek P, Roman LJ, Nishimura JS, Masters BS. (1997) Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. *Biochemistry* **36**: 15277-15284.
- Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Gueret M, Jaulin C. (1999) The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem.* **274**: 503-9.
- Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo H, Darley-Usmar VM. (1998) Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increase expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys.* **58**:74-82.
- Mohanakumar KP, Thomas B, Sharma SM, Muralikrishnan D, Chowdhury R, Chiueh CC. (2002) Nitric oxide: an antioxidant and neuroprotector. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:389-401.
- Mollace V, Iannone M, Muscoli C, Palma E, Granato T, Rispoli V, Nistico R, Rotiroti D, Salvemini D. (2003) The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic. *Neurosci Lett.* **335**: 163-6.
- Musial A, Eissa NT. (2001) Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* **276**: 24268-24273.
- Nicholls DG. (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* **1147**:53-60.

- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**: 271-279.
- Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. (1999) Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem* **274**: 14692-14698.
- Nordberg J, Arnér ES. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* **31**:1287-312.
- Ogura T, Yokoyama T, Fujisawa H, Kurashima Y, Esumi H. (1993) Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 1014-1022.
- Perry G, Taddeo MA, Nunomura A, Zhu X, Zenteno-Savin T, Drew KL, Shimohama S, Avila J, Castellani RJ, Smith MA. (2002) Comparative biology and pathology of oxidative stress in Alzheimer and other neurodegenerative diseases: beyond damage and response. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **133**: 507-13.
- Pineda-Molina E, Lamas S. (2001) Nitric oxide as a regulator of gene expression: studies with the transcription factor proteins c-Jun and p50. *Biofactors* **15**:113-5.
- Pytlowany M, Strosznajder JB, Ješko H, Cakała M, Strosznajder RP. (2008) Molecular mechanism of PC12 cell death evoked by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor. *Acta Biochim Pol.* **55**:339-47.
- Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH. (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* **29**: 170-180.
- Ray G, Husain SA. (2004) Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* **40**:1213-32.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis MW, Potter DW. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of

- glutathione, glutathione disulfide and related thiols disulfides. *Anal Biochem* **106**: 55-62.
- Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* **82**:297-325.
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. (2007) Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs". *Biochemistry*. **46**:7325-36.
- Ridnour LA, Sim JE, Choi J, Dickinson DA, Forman HJ, Ahmad IM, et al (2005). Nitric oxide-induced resistance to hydrogen peroxide stress is a glutamate cysteine ligase activity-dependent process. *Free Radic Biol Med*. **38**:1361–71.
- Riefler GM, Firestein BL. (2001) Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxylterminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J Biol Chem* **276**:48262–8.
- Rigo A, Viglino P, and Rotilio G. (1975) Polarographic determination of superoxide dismutase. *Anal Biochem* **68**: 1-8.
- Rodriguez-Crespo I, Straub W, Gavilanes F, Ortiz de Montellano PR. (1998) Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys* **359**: 297-304.
- Rotilio G, Aquilano K, Ciriolo MR. (2002) Interplay of Cu Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes. *IUBMB Life* **55**:629–34.
- Rotilio G, Carrì MT, Rossi L, Ciriolo MR (2000). Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life*. **50**:309-14.
- Rotilio G, Mavelli I, Rossi L, Ciriolo MR. (1985) Biochemical mechanism of oxidative damage by redox-cycling drugs. *Environ Health Perspect* **64**:259-264.
- Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. (2003) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by

blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci.* **23**:1710-8.

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.* **336**: 1216-22.

Saur D, Seidler B, Paehge H, Schusdziarra V, Allescher HD (2002) Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors. *J Biol Chem* **277**: 25798-814.

Schafer FQ, Buettner GR. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* **30**:1191-212.

Schmidt H.H.H.W., Zernikow B., Baeblich S., and Bohme E. (1990) Basal and stimulated formation and release of L-arginine-derived nitrogen oxides from cultured endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **254**: 591-597.

Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. (1996) No NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14492-14497.

Shinyashiki M, Pan CJ, Lopez BE, Fukuto JM. (2004) Inhibition of the yeast metal reductase heme protein fre1 by nitric oxide (NO): a model for inhibition of NADPH oxidase by NO. *Free Radic Biol Med.* **37**:713-23.

Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL, Lefer AM. (1992) Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* **260**:668-75.

Smith CV, Jones DP, Guenthner TM, Lash LH, Lauterburg BH. (1996) Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxico Appl Pharmacol* **140**: 1-12.

- Stadtman ER, Berlett BS. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* **30**: 225-243.
- Sugawara T, Noshita N, Lewén A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH. (2002) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci.* **22**:209-17.
- Suschké CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V. (1999) Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem.* **274**:6130-7.
- Takahashi T. (2003) Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol.* **38**:421-30.
- Thomas DD, Miranda KM, Colton CA, Citrin D, Espey MG, Wink DA. (2003) Heme proteins and nitric oxide (NO): the neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation. *Antioxid Redox Signal.* **5**:307-17.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* **57**:145-55.
- Troy CM, Derossi D, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. (1996) Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J Neurosci.* **16**: 253-61.
- Türk T, Hollocher TC. (1992) Oxidation of dithiothreitol during turnover of nitric oxide reductase: evidence for generation of nitroxyl with the enzyme from *Paracoccus denitrificans*. *Biochem Biophys Res Commun* **183**: 983-938.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**:44-84.
- Vandenberghe N. (2006) Where is the role of the genetic investigations in amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Neurol.* **2**:4S96-4S101.

- Vasquez-Vivar J, Hogg N, Martasek P, Karoui H, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B. (1999) Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **274**: 26736-26742.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9220-9225.
- Wingrove JA, O'Farrell PH. (1999) Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* **98**: 105-114.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M, Grisham MB. (2001) Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* **3**:203-13.
- Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, Han HJ, Song WK, Yoo YJ, Chun JS, Kim JH. (2000). Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J Biol Chem*. **275**:32357-62.
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. (2001) Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem. Toxicol.* **39**:563–569.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* **134**:489-92.
- Yang Y, Hwang CK, Junn E, Lee G, Mouradian MM. (2000) ZIC2 and Sp3 repress Sp1-induced activation of the human D1A dopamine receptor gene. *J Biol Chem*. **275**: 38863-9.
- Yoneyama H, Yamamoto A, Kosaka H. (2001) Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide from the oxygenase domain. *Biochem J* **360**: 247-253.

- You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, Henderson BE, Fraumeni JF, Wang TG. (1989) Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer *J Natl Cancer Inst.* **81**, 162-164.
- Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. (2004) Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem.* **89**:812-21.
- Zago AS, Zanesco A. (2006) Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol.* **87**:e264-70.
- Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal.* **10**:1527-48.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* **33**:337-49.
- Zhou J, Schmid T, Brune B. (2004) HIF-1alpha and p53 as targets of NO in affecting cell proliferation, death and adaptation. *CurrMolMed* **4**:741–51.
- Zochodne DW, Levy D. (2005) Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol.* **51**:255-67.
- [No authors listed] (2008) Oxidative stress in human diseases *Srp Arh Celok Lek* **2**:158-65.

Nonostante la pagina che mi accingo a completare sia l'ultima di questa tesi è stata la prima che ho desiderato scrivere dopo questi 3 anni di dottorato. Per tanto non posso far altro che ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto ed incoraggiato per arrivare a questo obiettivo della mia vita.

Un grazie alla Prof. Ciriolo per la fiducia dimostratami e per avermi seguito durante e dopo questi 3 anni con consigli e confronti che mi hanno aiutato a intraprendere ogni volta le scelte più appropriate.

Ringrazio enormemente Katia Aquilano, un'amica preziosa e insostituibile, per i suoi pazienti insegnamenti, le risposte ai miei dubbi, per i suoi consigli e i suoi accorgimenti... A lei in particolar modo sono debitrice per avermi offerto la sua speciale amicizia e per aver contribuito a farmi credere nelle mie possibilità e perseguire nelle mie aspettative.

Grazie a Paola Vigilanza, compagna di mille peripezie... grazie per avermi sempre offerto preziosi consigli per il compimento di questo lavoro, e a tutto il Lab360 per aver condiviso insieme a me i successi e le difficoltà incontrate in questo periodo.

Un grazie speciale va ai miei genitori le due persone che mi sono state più vicine in questi anni e che sempre mi hanno spronato perché raggiungessi la meta che mi ero prefissata. Grazie per il supporto e la comprensione.

Infine, ringrazio Gianluca, per essermi sempre vicino anche nei più difficili, per aver capito quanto è importante per me questo lavoro e per essere la persona speciale che è!!