



**UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI ROMA
“TOR VERGATA”**

**DOTTORATO IN
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
XXI Ciclo**

**ATTIVAZIONE DI DIFFERENTI VIE DI SEGNALAZIONE
REDOX NELLA RISPOSTA CELLULARE ALLO STRESS
OSSIDATIVO: RUOLO DEL GLUTATIONE E DELLO
*STATUS TIOLICO***

Sara Piccirillo

Docente guida
Prof. Maria Rosa Ciriolo

Coordinatore
Prof. Giovanni Cesareni

Abstract	5
Introduction.....	6
Results.....	7
Introduzione	11
Biologia dei tumori	12
Processi coinvolti in tumorigenesi.....	12
Il modello della cellula staminale tumorale.....	21
Basi molecolari dello sviluppo e della progressione dei tumori gastrici.....	24
Stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali	25
Lo stress ossidativo.....	25
Le specie reattive dell'ossigeno (ROS).....	25
Le difese antiossidanti: sistemi di difesa enzimatici e non enzimatici.....	27
Ruolo dei sulfidrili proteici nel mantenimento dell'ambiente redox intracellulare.....	29
Alterazioni redox nei processi di traduzione del segnale.....	32
Segnalazione redox nella biologia dei tumori.....	37
Meccanismi alla base dello stress ossidativo in cellule tumorali.....	38
Conseguenze dello stress ossidativo in cellule tumorali.....	39
Implicazioni terapeutiche e tumori gastrici.....	41
Proteine redox regolate coinvolte in tumorigenesi	43
I fattori di trascrizione.....	43
La tioredossina.....	47
Procedure sperimentali	50
Colture cellulari.....	51
Trattamenti cellulari.....	51

Modulazione del contenuto intracellulare di glutatione.....	52
Inibitori delle MAP-chinasi.....	52
Analisi del ciclo cellulare e dell'apoptosi.....	53
Determinazione della morte cellulare mediante conta con Trypan blue.....	53
Determinazione delle proteine totali.....	54
Determinazione del glutatione e dei disolfuri misti mediante HPLC.....	54
Immuno-elettroforesi (Western blotting).....	55
Preparazione dei campioni per dosaggio elettroforetico.....	56
Transfezioni.....	57
Preparazione delle cellule per microscopia a fluorescenza.....	57
Urea PAGE.....	58
Costruzione dei plasmidi e mutagenesi sito-diretta.....	59
Analisi statistica dei dati.....	59
Scopo del lavoro	60
Risultati	63
Cellule di adenocarcinoma gastrico AGS mostrano diversa suscettibilità al trattamento con agenti pro-ossidanti.....	64
Il trattamento delle cellule AGS con diammidie determina l'attivazione dell'apoptosi attraverso la via mitocondriale.....	70
I processi di resistenza e di suscettibilità allo stress ossidativo sono correlati alla modulazione del pool intracellulare del glutatione.....	73
Le cellule AGS mostrano danno ossidativo solo in seguito al trattamento con diammidie.....	77
H ₂ O ₂ e diammidie modulano specificamente l'attività dei fattori di trascrizione Nrf2 e p53.....	82
L'inibizione di Nrf2 e di p53 reverte la risposta cellulare.....	88

L'ossidazione della Trx1 correla con la fosforilazione di p53 mediata da p38 ^{MAPK}	92
La Trx1 è il discriminante molecolare alla base della risposta allo stress ossidativo tiolico.....	97
Conclusioni	103
Bibliografia	107

ABSTRACT

Introduction

Reactive oxygen species (ROS), constantly generated by all aerobic organisms, are involved in many physiological functions and in pathological processes, such as cancer. Recent studies have shown that cancer cells produce higher levels of ROS than normal cells, due to both intense metabolic activity and mitochondrial defects (Behrend *et al.*, 2003). This intrinsic oxidative stress selectively targets malignant cells for therapeutic strategies based on further ROS production and consequent irreversible oxidative insult (Pelicano *et al.*, 2004). However, for the effectiveness of ROS-based treatments, expression of antioxidants and activation of redox-sensitive transduction pathways must be considered.

It is now well established that ROS participate in the control of phosphorylative cascades and transcription activity (Filomeni *et al.*, 2005a). In fact, cell response to pro-oxidant stimuli is often accompanied by direct modification of highly conserved cysteine residues on proteins, normally present in the reduced form that act as “redox sensors”. Among proteins that possess this regulatory function, thioredoxin 1 (Trx1) is a well characterized example (Arnér and Holmgren, 2006). The identification of Trx1 as an interactor of apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1), which is responsible for the activation of p38^{MAPK} and JNK-upstream kinases (Liu and Min, 2002), shed new light on the possible cross-talk between phosphorylative and redox regulation mode (Adler *et al.*, 1999). Moreover, growing amount of data demonstrates that the reduced state of specific cysteines of several transcription factors is maintained by proteins such as Trx1 in order to ensure the DNA binding capability (Na and Surh, 2006). The nuclear erythroid factor 2 (NE-F2)-related factor 2 (Nrf2) is a classical activator of antioxidant responsive elements (ARE) (Kim *et al.*, 2003) that, once activated, induces the antioxidant and detoxifying response (Chen and Kong, 2004; Chen *et al.*, 2004). Nrf2 is normally sequestered in the cytoplasm in an inactive complex with kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1) which, upon oxidation of critical cysteines, dissociates from Nrf2, leading to its translocation into the nucleus (Kensler *et al.*, 2007).

The tumor suppressor p53 is another redox-sensitive transcription factor involved in DNA repair from genotoxic damages, as well as in induction of apoptosis (Riley *et al.*, 2008). For a correct binding to DNA, p53 has to be previously stabilized and activated, then it can translocate into the nucleus and undergo modulation of its redox state (Rainwater *et al.*, 1995). This modulation seems to be related to the oxidation of Trx1, which leads to the nuclear accumulation of p53 in the active form and determines the trans-

activation of downstream genes (Seeman and Hainaut, 2005). Recently a negative control on Nrf2 transcriptional activity mediated by p53 has been characterized; particularly, under basal conditions, direct binding of p53 to ARE-containing promoters is able to counteract Nrf2 activity. Under mild oxidative stress the crosstalk between these two transcription factors negatively regulates the induction of a strong antioxidant response, thus preventing the downstream induction of apoptosis (Faraonio *et al.*, 2006).

Adenocarcinoma gastric cells (AGS) represent a good model to study resistance to ROS. The high basal levels of S-glutathionylated proteins and their role in mediating the response to oxidative stress represent the principal mechanism of this resistance (Filomeni *et al.*, 2005c). In the present paper we dissect the molecular mechanisms of different oxidizing molecules in inducing survival or apoptotic response by alternatively activating Nrf2 or p53 in AGS cells.

Results

The responsiveness of AGS cells to oxidative stress was studied by treating the cells with two different classes of pro-oxidant molecules: ROS inducers and thiols oxidating compounds and we selected H₂O₂ and diamide, as representative of the two classes. Cells were treated with H₂O₂ and diamide 200 μ M for 1 h, replaced with fresh medium and the occurrence of apoptosis was analysed after 24 h. Cytofluorimetric analysis indicated that AGS cells were particularly resistant to ROS; in contrast, they underwent cell death upon treatment with diamide. Therefore, H₂O₂ and diamide can be also considered as examples of cell resistance *versus* sensitivity to oxidative burst.

To characterize the mechanisms underlying apoptosis under diamide treatment, we analyzed the involvement of the mitochondrial pathway. Cells were incubated with 200 μ M diamide for 1 h and then analyzed for the activation of apoptotic markers at different times of recovery. Fluorescence microscope analyses of cells stained with an antibody anti-Hsp60, a mitochondrial specific chaperone, to visualize mitochondria, and with an antibody anti-cytochrome *c*. Hsp60 did not superimpose cytochrome *c* staining upon treatment with diamide, indicating that cytochrome *c* was efficiently released from mitochondria into the cytosol. Concomitantly, Western blot analyses of caspase-9, as well as caspase-3 and poly-ADP ribose polymerase (PARP) indicated that each step of the apoptotic program was executed upon treatment with diamide.

We then focused on the possible modulation of GSH that, being the major non-protein thiol in cells, preferentially reacts with diamide. Moreover, GSH is the cofactor required for glutathione peroxidase to reduce H_2O_2 . Upon treatment with H_2O_2 , GS-R and GSH content transiently increased, while no significant changes in GSSG were observed throughout the experiment, suggesting a buffer role of GS-R and GSH against H_2O_2 . Conversely, treatment with diamide induced a drastic increase of GSH and a dramatic rise in GSSG. Moreover, GS-R decreased under the limit of detection when cells underwent apoptosis.

The role of GSH was confirmed by modulating its concentration:

1. Depletion of intracellular levels of GSH by pre-incubation with BSO, a specific inhibitor of its neo-synthesis, produced a significant increase of subG1 cells confirming the effectiveness of GSH in counteracting H_2O_2 toxicity.
2. On the other hand, we incubated the cells with N-acetylcysteine (NAC), a well established antioxidant thiol compound, and evaluated its effectiveness against diamide. NAC significantly rescued AGS cells from diamide-induced apoptosis, indicating that the availability of sulphhydryls compounds is fundamental for cell demise.

We decided to analyze p53 and Nrf2, transcription factors that sense oxidative stress and mediate opposite responses downstream of it. In particular, we analyzed the expression and nuclear localization of p53 and Nrf2 after treatment with H_2O_2 or diamide by Western blot. Nrf2 accumulated very early within the nuclear fraction only upon treatment with H_2O_2 , whereas it was unable to translocate into the nucleus when AGS cells were treated with diamide. Interestingly, p53 showed a complete opposite behaviour, by accumulating into the nucleus at early times upon diamide addition, but not upon H_2O_2 . An opposite behaviour was observed for p53; in fact, diamide was able to induce an early dramatic accumulation of the protein within the nucleus. These data nicely correlate with those obtained by fluorescence microscopy analyses of the localization of both transcription factors in AGS cells after H_2O_2 or diamide treatment and corroborate the hypothesis that each treatment activates an exclusive pathway ultimately leading to opposite responses: death or survival. To strengthen the hypothesis that nuclear localization of p53 and Nrf2 was followed by the acquisition of their transcriptional properties, we analyzed the expression levels of Bax and HO-1 that are specifically expressed downstream of p53 or Nrf2, respectively. Western blot analyses of these proteins in total cell lysates indicated a significant increase of their expression levels.

To evaluate the role of p53 in apoptosis, we transfected AGS cells with a siRNA against p53 (sip53 cells). We treated the cells with diamide after transfection and we analysed the cells after propidium iodide staining. Cytofluorometric analysis showed that apoptosis extent significantly decreased in sip53. Moreover, we cloned the dominant negative form of Nrf2 (DN-Nrf2) into a pmax-FP-green vector. Transfected cells were treated with H₂O₂ and cytofluorometrically analyzed for cell viability after 24 h. Percentage of apoptosis of DN-Nrf2 cells increased significantly (about 3-fold) with respect to AGS carrying the empty vector. To evaluate whether BSO and NAC-mediated effects were associated with the modulation of Nrf2 and p53, AGS cells were incubated with BSO and then treated with H₂O₂. Under GSH depletion p53 rapidly accumulated within nuclear compartment. Moreover, cells incubated with NAC before diamide treatment showed a rapid and sustained increase of Nrf2 levels in the nucleus, suggesting that the shift from survival to death, and *vice versa*, correlated with the activation of Nrf2 or p53.

Finally, we speculated that a redox-sensitive component should exist and reasonably govern the decision between death or survival downstream of diamide or H₂O₂, thus we identified thioredoxin 1 (Trx1) as a possible player because of: *i*) its fundamental function in the maintenance of redox homeostasis; *ii*) its high reactivity towards diamide with respect to other thiol-containing proteins; *iii*) its role in regulating MAPK-dependent apoptotic pathways. We treated AGS cells with H₂O₂ or diamide and followed the redox state of the Trx1 by urea PAGE. This allows to separate Trx1 redox forms and evaluate, upon Western blot, the possible occurrence of oxidation reactions on cysteine residues. H₂O₂ did not induce changes in the ratio between oxidized and reduced Trx1, with the protein mainly presented as dithiol; conversely, after diamide removal, the ratio between reduced and oxidized Trx1 increased to values of about 1.

It is well established that Trx1 functions as the inhibitory subunit of the apoptosis-regulated signal kinase 1 (ASK1), the MAPKK kinase upstream pro-apoptotic members of MAPK, JNK and p38^{MAPK}. To elucidate what member of MAPK was activated in response to diamide, we treated the cells and followed by Western blot the phospho-active levels of JNK and p38^{MAPK}. p38^{MAPK} was rapidly activated at 30 min of recovery from diamide removal, while the levels of phospho-JNK remained unaltered throughout the experimental times. Experiments performed in the presence of the specific inhibitors of JNK and p38^{MAPK}, SP600125 and SB203580, respectively, confirmed these results: a significant decrease in the extent of

apoptotic cells occurred only upon p38^{MAPK} inhibition, whereas no protection was achieved by inhibiting JNK-mediated signalling. To define the specific contribution of p38^{MAPK} and p53 and their possible cross-talk in the induction of apoptosis we treated AGS cells with diamide in the presence of SB203580 and we monitored the activation of p53 by fluorescence microscope. As expected, p38^{MAPK} and p53 were found to be activated; in particular, both of them accumulated within nuclear compartments upon diamide and the inhibition of p38^{MAPK} nicely correlated with a strong decrease of p53 activation and nuclear localization. Moreover, Western blot analyses of p53 in the presence of the p38^{MAPK} inhibitor showed a 3-fold decrease of p53 expression levels, confirming the positive regulation of p38^{MAPK} on p53 in response to diamide.

The role of Trx1 in cell response to diamide was then further characterized by cloning the protein (Trx1wt) and its mutated inactive form (Trx1C32S) in pcDNA3 vector. Cells transiently transfected with plasmid coding for Trx1wt become resistant to treatment with diamide, suggesting an involvement for the protein in chemical reactions with diamide. Interestingly cells transfected with the mutant Trx1C32S, which lacks in the oxidoreductase activity, were protected from treatment with diamide too. This muted form of Trx1 was reported to be unable to dissociate from ASK1 (Nishida and Otsu K, 2006), confirming a role for Trx1 in the cell signaling leading to apoptosis in response to sulphidril oxidation. Such a protective role for Trx1 was finally observed in stable transfectants: cells overexpressing Trx1wt and Trx1C32S were both protected from detrimental effects of diamide treatment, indicating the protein as a putative molecular target for new chemotherapeutic strategies in AGS cells.

INTRODUZIONE

Biologia dei tumori

Processi coinvolti in tumorigenesi

Osservazioni relative allo sviluppo di tumori negli animali e nell'uomo supportano modelli formalmente analoghi a quelli propugnati nella teoria evuzionistica di Darwin. Una sequenza di modificazioni genetiche, ognuna delle quali in grado di conferire vantaggio, in termini di crescita, sarebbero in grado di contribuire alla progressiva conversione di cellule normali in cellule trasformate (Hanahan and Weinberg, 2000; Foulds, 1954).

Le cellule trasformate manifestano difetti nei normali circuiti di controllo che governano la proliferazione, così come sottolineato dall'etimologia greca del termine *neoplasia* o "nuova crescita", la quale rimanda alla capacità dei tessuti tumorali di crescere al di là dei propri naturali confini (Halazonetis *et al.*, 2008). Esistono più di cento tipologie di tumore e sottocategorie delle stesse possono essere identificate a livello dei singoli distretti tissutali. Tale eterogeneità, associata alla complessità della malattia in esame, ha reso estremamente difficile la codifica di regole essenziali all'avanzamento delle conoscenze secondo le regole di una scienza esatta.

La notevole accelerazione che si è osservata nella ricerca sul cancro ha però permesso, nell'ultima decade, l'identificazione di un numero circoscritto di principi in grado di governare la trasformazione di cellule normali in cellule tumorali. Numerose evidenze, infatti, hanno permesso di descrivere la tumorigenesi come un processo in più passaggi, ciascuno dei quali in grado di riflettere alterazioni genetiche essenziali al conferimento del vantaggio adattativo del tumore e in grado pertanto di supportarne la crescita al di là delle barriere selettive rappresentate dal microambiente tissutale (Gatenby and Gillies, 2008).

Attualmente si ritiene che la vasta gamma di genotipi tumorali sia la manifestazione di sei fondamentali alterazioni della fisiologia cellulare: autonomia nei segnali di crescita, insensibilità ai segnali di inibizione della stessa, potenziale replicativo illimitato, angiogenesi sostenuta, evasione dall'apoptosi, invasione tissutale e metastasi risulterebbero, complessivamente nella manifestazione del fenotipo maligno.

Esistono delle barriere di difesa dal cancro messe in atto dall'organismo e ciascuno di questi cambiamenti (fig.1) rappresenta il superamento di una di

esse, a dimostrazione del fatto che questi cambiamenti rappresentano l'acquisizione di nuove capacità adattative durante lo sviluppo del cancro.

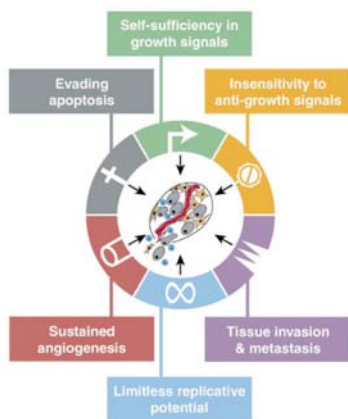


Figura 1
Capacità acquisite dalla cellula durante il processo di tumorigenesi

Ai molti fenotipi tumorali corrispondono una serie finita di sei capacità adattative acquisite nel processo di tumorigenesi: autonomia nei segnali di crescita, insensibilità all'inibizione della crescita, potenziale replicativo illimitato, angiogenesi sostenuta, evasione dall'apoptosi, invasione dei tessuti e metastasi.

Si tratta di una molteplicità di difese in grado di spiegare, almeno in parte, la relativa rarità dell'insorgenza di tumori nel corso della vita di un singolo individuo (Hanahan and Weinberg, 2000).

Autonomia nei segnali di crescita

Le cellule normali richiedono segnali di crescita mitogenici per la transizione dallo stato di quiescenza a quello proliferativo; nessun tipo cellulare è in grado di proliferare in assenza di tali segnali. Si tratta di un comportamento in contrasto con quanto osservato in cellule tumorali, le quali manifestano una ridotta dipendenza da segnali di crescita esogeni, portandoci alla conclusione che esse siano in grado di produrle autonomamente. L'indipendenza dai segnali esogeni porta alla distruzione di un meccanismo di controllo dell'omeostasi particolarmente critico, che normalmente opera nel garantire il corretto comportamento dei diversi tipi cellulari all'interno di un tessuto. Sono state identificate tre strategie fondamentali attraverso le quali le cellule riescono ad acquisire tale capacità.

Poiché normalmente un tipo cellulare produce fattori di crescita cui altre cellule sono responsive, il primo meccanismo comporta l'acquisizione da parte della cellula tumorale di sintetizzare autonomamente i propri fattori di

crescita, in modo da ovviare alla propria dipendenza da altri tipi cellulari (Todaro *et al.*, 2007; Grivennikov and Karin, 2008).

Un secondo meccanismo prevede l'overespressione, da parte delle cellule tumorali, dei recettori per i fattori di crescita, in maniera da risultare iper-responsive ai livelli ambientali degli stessi (Grandal and Madshus, 2008).

Infine un terzo meccanismo consiste nello *switch* del tipo di integrine (i recettori che fisicamente connettono la cellula alla matrice extracellulare e che sono in grado di trasdurre segnali importanti quali la quiescenza e la proliferazione, la mobilità e l'ingresso nel ciclo cellulare) in favore di quelle che trasmettono segnali di crescita (Lamar *et al.*, 2008).

Insensibilità ai segnali antiproliferativi

In un tessuto normale molti segnali antiproliferativi cooperano a garantire il mantenimento della quiescenza cellulare e dell'omeostasi, tra di essi esistono inibitori diffusibili e inibitori immobilizzati alla matrice extracellulare. Le cellule tumorali possono evadere questi segnali essenzialmente attraverso una modulazione negativa del pathway della proteina del retinoblastoma (pRB). La pRB, quando iperfosforilata, garantisce il sequestro del fattore di trascrizione E2F essenziale all'espressione di geni coinvolti nella transizione G1/S. Questo circuito, attivo in cellule quiescenti e ben descritto per l'inibitore TGF β (tumor growth factor- β), può essere evaso dal tumore in numerosi modi. Può ad esempio essere innescata una down-regolazione dei suoi recettori o un loro mal funzionamento, così come pure spesso si osservano mutazioni delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale a livello intracellulare (Hanahan and Weinberg, 2000).

Potenziale replicativo illimitato

In uno dei suoi primi lavori Hayflick dimostrò che cellule in coltura possiedono un potenziale replicativo limitato: dopo un numero finito di cicli di replicazione le cellule cessano di crescere come risultato del processo di senescenza (Hayflick, 1997). Tutti i tipi cellulari tumorali che vengono propagati in coltura sono immortalizzati, suggerendo che il potenziale replicativo illimitato è una proprietà acquisita durante il processo di tumorigenesi.

La progressiva erosione dei telomeri, attraverso i successivi cicli di replicazione del DNA, è uno dei segnali essenziali all'innescamento della senescenza, ma il meccanismo può essere eluso attraverso il mantenimento degli stessi operato dall'enzima telomerasi. Il suo ruolo nel permettere cicli

di replicazione illimitati, in cellule tumorali, può essere dimostrato esprimendo la proteina in cellule pre-senescenti, delle quali può garantire un potenziale replicativo illimitato (Hanahan and Weinberg, 2000; Bodnar *et al.*, 1998).

Angiogenesi sostenuta

L'apporto di ossigeno e nutrienti dai vasi sanguigni è un evento cruciale per lo svolgimento delle funzioni cellulari e la sopravvivenza. Contrariamente a quanto si potrebbe supporre le cellule in un tessuto non possiedono un'intrinseca capacità di stimolazione della crescita di nuovi vasi sanguigni. Per questo motivo le lesioni con capacità proliferativa intensificata mancano, inizialmente, di abilità angiogenica e, perché la neoplasia possa svilupparsi, essa deve necessariamente essere acquisita (Dass and Choong, 2008). La capacità di indurre un'angiogenesi sostenuta sembra essere acquisita in un processo in più passaggi che porta al superamento della quiescenza vascolare. Lo *switch* angiogenico è innescato attraverso l'attivazione trascrizionale di geni coinvolti nell'angiogenesi, quali il fattore di crescita vascolare (VEGF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFs), ma può coinvolgere anche la down regolazione di inibitori della stessa, quali la trombospodina-1 e l'interferone- β (Hanahan and Weinberg, 2000).

Evasione dall'apoptosi

Il concetto di morte cellulare programmata e la sua centralità nello sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti vennero formalizzati in un articolo del 1972 dal patologo australiano John Kerr e dagli inglesi Andrei Wyllie e John Currie, nel quale si ipotizzava l'esistenza di un programma genetico in grado di controllare la morte cellulare. Gli autori utilizzarono, per definirlo e distinguerlo dalla morte accidentale (necrosi), il termine apoptosi, la cui etimologia greca richiama l'immagine della caduta delle foglie dagli alberi in autunno. Con esso ci si riferisce oggi alla peculiare morfologia assunta dalla cellula quando va incontro ad un processo attivo di morte: la cellula apoptotica subisce, infatti, una drastica alterazione nella forma e nelle dimensioni, culminante con la produzione dei corpi apoptotici (Parone *et al.*, 2002; Wolf and Green, 1999), prontamente riconosciuti e rimossi per fagocitosi da macrofagi e cellule adiacenti.

L'apoptosi è caratterizzata da una precisa sequenza di eventi che può essere riassunta a grandi linee in:

1. comparsa di uno stimolo, che può essere di natura chimica o fisica;

2. attivazione dei geni e delle proteine preposte alla proteolisi delle strutture cellulari;
3. rimozione della cellula morta da parte dei macrofagi o delle cellule vicine; evento che preclude ad ogni tipo di infiammazione.

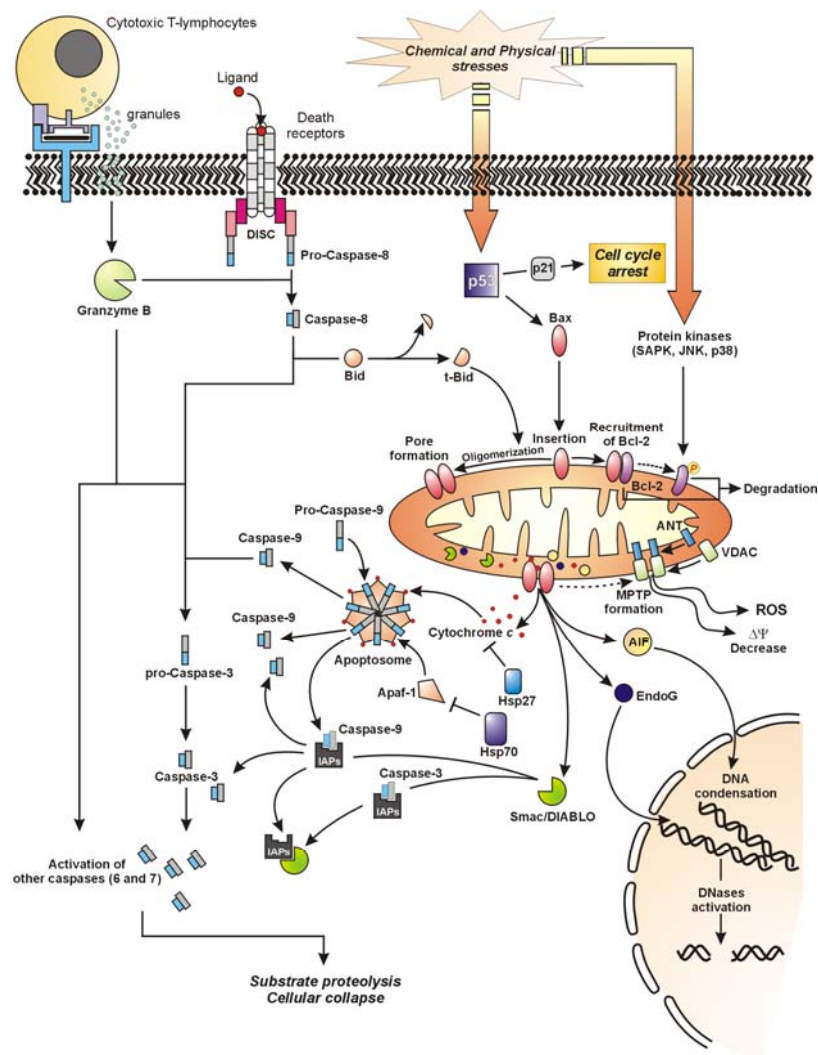


Figura 2
Principali vie di innesco del programma apoptotico

Si conoscono attualmente almeno tre vie, distinte ma tra loro interconnesse, di innesco dell'apoptosi (Fig. 2).

La prima è attivata dai linfociti T citotossici, in seguito a riconoscimento delle cellule tumorali o infettate da virus. In questo caso il processo apoptotico è accompagnato da alterazioni della membrana per opera della perforina e dall'attivazione del granzima B e delle caspasi esecutrici finali del programma di morte (caspasi-3, -6, -7) (Shresta *et al.*, 1998). Il secondo processo è quello innescato da stress fisici o chimici che alterano l'equilibrio intracellulare; evidenze sperimentali hanno dimostrato una correlazione diretta tra induzione dell'apoptosi e raggi UV, radiazioni γ , deprivazione dei fattori di crescita, ipossia e agenti ossidanti. In questo caso la molecola maggiormente coinvolta nella risposta cellulare è p53, proteina in grado di attivare la trascrizione di tutti quei geni che controllano il riparo e la progressione nel ciclo cellulare: chaperoni o proteine "heat shock" (Hsp), enzimi di riparo del DNA, l'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21. In particolare, quest'ultima proteina opera l'arresto del ciclo in fase G2 che può essere seguito da un ripristino delle funzioni vitali e della divisione della cellula – se il danno viene riparato – o dall'innescamento del programma apoptotico e attivazione delle caspasi – se il danno risulta irreversibile (Taylor and Stark, 2001). Il percorso apoptotico innescato direttamente dall'attivazione di p53 porta ad una cascata di eventi caratteristica che prende il nome di "via mitocondriale". Sulla membrana del mitocondrio infatti avviene una serie di eventi ben caratterizzata:

1. Delocalizzazione della proteina Bcl-2, attraverso la formazione di eterodimeri Bax/Bcl-2, e inserzione di omopolimeri costituiti dall'omologo (pro-apoptotico) Bax.
2. Formazione di un poro proteico attraverso cui fuoriesce il citocromo c dallo spazio intermembrana nel citosol.
3. Attivazione del cosiddetto "apoptosoma", ovvero del complesso multimolecolare costituito da ATP, citocromo c, APAF-1 e procaspasi-9. Questo fenomeno è, in realtà, molto complesso e sembra coinvolgere, per il rilascio della pro-caspasi-9, altre proteine della famiglia di Bcl-2 come Bcl-X_L e Bik (Adams and Cory, 1998).
4. Attivazione della procaspasi 9 a caspasi-9 attivata.
5. Proteolisi e conseguente attivazione delle caspasi esecutrici finali del programma apoptotico (caspasi-3, -6, -7).

Ultima via apoptotica è quello mediato da recettori, ossia quello che obbedisce a segnali di molecole esterne (ligandi) impermeabili alla membrana cellulare (fattori di crescita, citochine, ormoni). I recettori per i

quali si ritiene possa esserci un coinvolgimento nell'induzione della morte programmata appartengono a diverse famiglie (o superfamiglie), e sono contraddistinti dall'aver una porzione extracellulare, in grado di riconoscere il ligando, e una porzione intracellulare, cui si legano innumerevoli proteine (Baker and Reddy, 1996). La suddivisione tra i vari recettori è operata in base al tipo di ligando riconosciuto; si ha così la famiglia dei recettori per le neurotrofine (NTRs) a cui appartiene il recettore per l'NGF (NGFR); la famiglia dei recettori per le linfofosfine (LFRs) e la superfamiglia dei recettori per i fattori di necrosi tumorale (TNF-Rs) a cui appartengono, oltre al TNF-R I e II, anche Fas (APO1/CD95) e i TRAIL-Rs. Questa famiglia di proteine trans-membrana lega, nella porzione citoplasmatica, altre proteine. Alcune di queste proteine sono state caratterizzate quali fattori coinvolti nella trasduzione del segnale che innesca l'apoptosi, per questo motivo i domini proteici che caratterizzano queste molecole (FADD, TRADD, ecc.) sono chiamati "death domain" o domini di morte (DD). Ad interagire con questi recettori troviamo anche fosfatasi e chinasi, in grado di attivare le cascate di eventi che portano all'induzione di geni bersaglio, e le procaspasi-2, -8, -10 (cistein proteasi in grado di tagliare e attivare le caspasi esecutrici) (Ashkenazi and Dixit, 1998; Daniel *et al.*, 2001). Di recente è stata scoperta la via di unione tra i percorsi apoptotici mediati da p53 e dalla stimolazione dei recettori di morte. Bid, una piccola proteina a valle dei complessi recettoriali (anch'essa membro della famiglia di Bcl-2), sembra attivarsi dopo il taglio proteolitico della caspasi-8; dirigersi verso la membrana mitocondriale e qui attivare il rilascio del citocromo *c* e l'attivazione della caspasi-9 (Fig. 2).

Nel lavoro di Kerr del 1972 veniva peraltro avanzata, per la prima volta, l'ipotesi che l'apoptosi potesse rappresentare una iniziale barriera di difesa allo sviluppo del cancro, messa in atto dall'organismo (Kerr *et al.*, 1972). Esistono molti esempi a sostegno di questa ipotesi: elevati livelli di espressione dell'oncogene *bcl-2* in cellule di linfoma (Korsmeyer, 1992), la perdita funzionale della proteina p53 che si riscontra in molti tipi tumorali (Harris, 1996), l'espressione di recettori di morte non funzionali (Pitti *et al.*, 1998).

Invasione dei tessuti e metastasi

La capacità delle cellule tumorali di colonizzare nuovi distretti, a partire dalla sede primaria di sviluppo del cancro, è riscontrata nella maggior parte dei tumori umani e attualmente a tale diffusione del tumore è da ricondursi circa il 90% delle morti per cancro (Hanahan and Weinberg, 2000; Sporn,

1996). Così come per la formazione della massa tumorale primaria, il successo nella colonizzazione di nuovi distretti, dove, almeno nelle fasi iniziali, i nutrienti non rappresentano un fattore limitante, dipende dall'acquisizione di tutte le proprietà precedentemente descritte. Il processo di metastatizzazione è, dal punto di vista molecolare, estremamente complesso e coinvolge l'alterazione funzionale di numerose proteine.

Uno dei principali fattori di innesco è rappresentato dall'ipossia: quando la massa tumorale raggiunge un diametro superiore agli 0,5 mm la richiesta di ossigeno non può essere soddisfatta per diffusione e il processo di angiogenesi, così come anche l'invasione di nuovi organi, devono intervenire a garantirne il corretto apporto. La recente scoperta che inibendo il fattore VEGF la crescita di tumori pancreatici è solo momentaneamente arrestata, dimostra chiaramente che l'angiogenesi è solo uno dei segnali innescati (in risposta alle condizioni ipossiche che si instaurano a livello del tessuto tumorale), ma che debbono necessariamente intervenire altri fattori di stimolo alla crescita del tumore (Casanovas et al., 2005). I primi studi sul processo di metastatizzazione sono stati condotti proprio utilizzando modelli di tumore al pancreas, caratteristici per l'estrema aggressività. Tale aggressività è in parte associata alla capacità delle cellule tumorali pancreatiche di invadere il tessuto sano che circonda il tumore, nonché distretti quali lo stomaco, il colon, la milza e il fegato. Questa diffusione del tumore, definita per la prima volta metastasi da Jean Claude Recamier nel 1929 (Tarin, 2007), coinvolge un processo anche noto come transizione epitelio/mesenchimale (EMT). Esso comporta l'attivazione di numerose molecole segnale, quali il fattore indotto da condizioni ipossiche HIF-1, integrine e membri della famiglia delle chinasi di adesione focale (FAK), che garantiscono la transizione cellulare da un fenotipo cuboidale adeso, tipico degli epitelii, ad una conformazione allungata e dotata di motilità (Fig. 3a).

Attualmente si ritiene, inoltre, che effetti meccanici possano stimolare le cellule tumorali all'acquisizione di fenotipi invasivi (Paszek et al., 2005).

In questo contesto un ruolo fondamentale è svolto dalla matrice extracellulare (ECM), l'impalcatura tridimensionale che supporta le cellule nei tessuti dei vertebrati. La crescita del tumore causa un aumento della pressione meccanica esercitata sull'ECM, che si ripercuote, attraverso le strutture citoscheletriche cui essa è fisicamente connessa, sulla cellula, provocandone una deformazione generale. L'aderenza cellulare risulta alterata e l'espressione di numerose vie di segnalazione intracellulari,

coinvolte nella sopravvivenza a stress ambientali, viene evocata, con la conseguente promozione della motilità cellulare (Makale, 2007) (Fig. 3b).

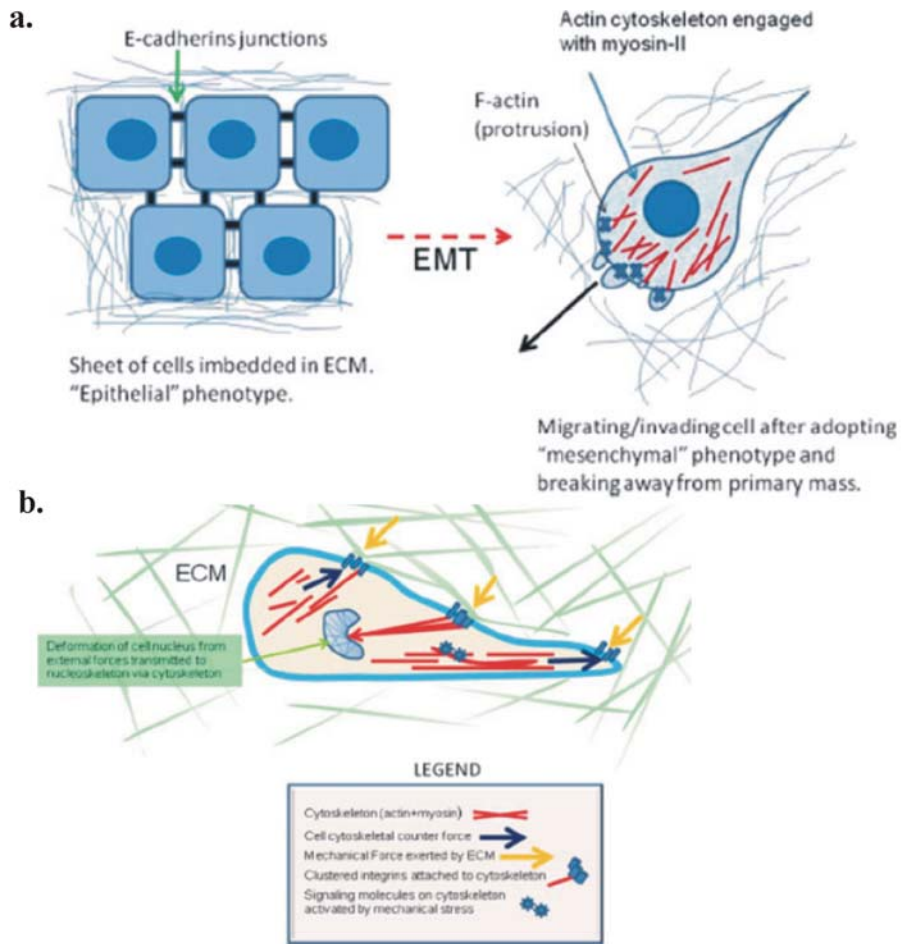


Figura 3
Meccanismi coinvolti nel processo di metastatizzazione

- a. Transizione epitelio-mesenchima
- b. Forze meccaniche che alterano l'espressione di geni coinvolti nella motilità

Il modello della cellula staminale tumorale

Negli ultimi anni si è progressivamente affermato un modello alternativo di sviluppo dei tumori, anche noto come modello della cellula tumorale staminale. Il progressivo accumularsi di evidenze e di ipotesi relative a questo modello, è stato di recente accompagnato alla convocazione, ad opera dell'American Association for Cancer Research (AACR), di un congresso finalizzato alla valutazione dei dati a supporto di questa ipotesi.

L'obiettivo prioritario dei partecipanti è stata la valutazione di due possibili modalità di sviluppo del tumore secondo tale modello:

1. Il tumore può essere originato da cellule staminali residenti nell'organo e che acquistano, durante il processo di auto-rinnovamento, modificazioni genetiche necessarie alla tumorigenesi.
2. La cellula tumorale deriva da progenitori proliferanti che, per effetto sempre di mutazioni genetiche, possono acquisire di nuovo la capacità di auto-rinnovamento.

Ambedue le ipotesi apportano un'importante innovazione rispetto alla nozione radicata che tutte le cellule presenti a livello del tumore siano competenti alla generazione del tumore stesso. Esso sarebbe invece originato da un ristretto gruppo di cellule in grado di auto-rigenerarsi. Le cellule staminali sono, infatti, in grado di perpetuarsi e al contempo di originare gruppi di cellule differenziate, a partire da progenitori proliferanti, per effetto della possibilità di andare incontro a divisioni simmetriche ed asimmetriche, rispettivamente (Clarke et al., 2006).

La cellula staminale tumorale: un'idea antica che nasce dalla lezione dei tumori del sangue

Da lungo tempo è nota l'esistenza a livello del tessuto tumorale di gruppi eterogenei di cellule che comprendono: cellule del sistema immunitario, cellule stromali e diversi tipi di cellule endoteliali e stromali; ciascuno di questi tipi spesso appartiene, inoltre, a fasi dello sviluppo diverse. Questa eterogeneità può trovare risposta nella variabile influenza che il microambiente del tumore esercita su ciascuna cellula e nell'instabilità genetica che impedisce la trasmissione corretta del corredo genetico. Negli anni '60 vennero condotti studi pionieristici utilizzando la marcatura con trizio radioattivo su cellule del sangue di pazienti affetti da leucemia. Tali studi portarono alla luce la presenza di un sottogruppo di cellule immature con la proprietà di ciclare in maniera diversa dalla maggior parte delle

cellule tumorali e in grado di originare una progenie post-mitotica (Wang and Dick, 2005). L'analisi delle cellule staminali tumorali risulta, invece, più complicata per i tumori solidi, in cui l'accessibilità delle stesse risulta ridotta e la messa a punto di saggi per la loro identificazione è ancora carente.

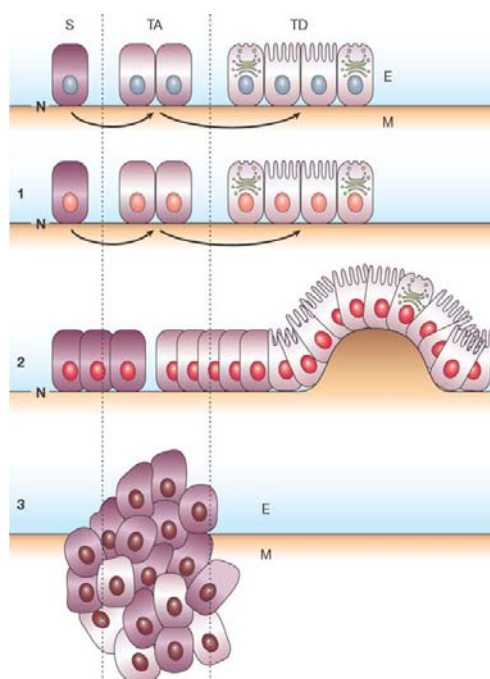


Figura 4
Modello della cellula staminale tumorale

Schema che illustra le diverse fasi che si succedono nello sviluppo di un tumore secondo la teoria della cellula tumorale staminale:

1. Mutazione silente in una cellula staminale normale
2. Mutazioni che inducono l'espansione della cellula aberrante
3. Mutazioni che portano alla perdita del differenziamento e all'invasività.

In figura 4 sono riportate le diverse fasi che, secondo il modello della cellula tumorale staminale, si succedono nel processo di tumorigenesi. L'evento iniziatore coinvolge l'acquisizione di una mutazione morfologica silente in una cellula staminale (S). Questa mutazione non necessariamente conferisce vantaggio in termini di crescita, ma può coinvolgere geni preposti al mantenimento dell'integrità del genoma; la proteina p53 risulta, ad esempio, mutata anche in assenza di displasie tissutali, ad indicare che la perdita della sua funzionalità è un evento molto precoce della tumorigenesi. L'evento iniziale è quindi seguito da ulteriori mutazioni che portano all'espansione della cellula staminale aberrante, producendo una fase in cui

le cellule si amplificano (TA) dando luogo a tutte le cellule terminalmente differenziate che formano le lesioni pre-maligne (TD). Un aumento nelle cellule staminali comporta la distruzione dell'organizzazione spaziale del tessuto e cellule proliferanti possono riscontrarsi, in questa fase in cui le cellule permangono entro i confini dell'epitelio (E), anche in regioni non usuali. Ulteriori mutazioni e il fenomeno di selezione clonale portano ad una maggiore proliferazione, ad un aumento nelle divisioni di auto-perpetuazione e ad una conseguente riduzione del grado di differenziamento. Infine, mutazioni terminali possono comportare l'invasione del mesenchima (M) e il processo di metastatizzazione (Taipale and Beachy, 2001).

Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche

L'ipotesi dell'esistenza di cellule staminali tumorali ha implicazioni a livello di efficacia delle terapie antitumorali. Gli agenti, ampiamente utilizzati in chemioterapia, che agiscono su cellule attivamente proliferanti, risultano, infatti, inefficaci nella distruzione di cellule staminali, per effetto del loro ridotto grado di crescita. Inoltre, l'identificazione di un buon trattamento antitumorale deve necessariamente essere selettivo per le cellule staminali tumorali lasciando inalterate quelle normali, che provvedono all'omeostasi dell'organo.

Questa implicazione terapeutica richiede l'identificazione di marcatori specifici e di trattamenti altamente selettivi e questo richiede inevitabilmente un approfondimento ulteriore delle conoscenze relative alla biologia delle cellule staminali. La sfida principale consiste nell'identificazione del tipo o dei tipi cellulari staminali coinvolti nel tumore dei singoli pazienti e i risultati sono attualmente promettenti per pazienti affetti da leucemia mielogena cronica (CML), che sembrano essere accumulati, nelle crisi blastiche, dall'espansione di una tipologia cellulare unica, rappresentata dai progenitori dei granulociti-macrofagi (Clarke et al., 2006). Questa evidenza è particolarmente importante se si pensa al possibile coinvolgimento degli stessi progenitori cellulari in tumori accumulati dalla medesima genesi ed è promettente in termini di facilitazione della diagnosi ed applicazione del corretto trattamento, se affiancata ad ulteriori studi sull'identificazione di target specifici di cellule staminali tumorali.

Basi molecolari dello sviluppo e della progressione dei tumori gastrici

Epidemiologia e genetica dei tumori gastrici

Variazioni notevoli nell'incidenza dei tumori gastrici, in differenti aree geografiche e nel passaggio da una generazione all'altra, hanno condotto ad ipotizzare che l'incidenza di questo tipo di tumori possa essere associata a fattori soprattutto ambientali (Zheng et al., 2004). Inoltre l'infezione da *Helicobacter pylori* è considerato un fattore di rischio che può agire attraverso numerosi meccanismi, tra cui l'induzione della proliferazione, l'interferenza con le difese antiossidanti della cellula, l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari, tutte condizioni che possono andare ad agire determinando danno ossidativo al DNA e conseguente mutagenesi (Danesh, 1999). Alcuni studi sottolineano l'importanza della dieta (Stadtlander and Waterbor, 1999), altri focalizzano l'attenzione sull'importanza della predisposizione genetica, per cui è attualmente accettato un modello multifattoriale, in cui ad originare il processo di carcinogenesi concorrono abitudini alimentari, influenze ambientali e predisposizione genetica (Gonzales et al., 2002). Nel 1992 Correa descrisse tutta la serie di modificazioni istomorfologiche che conducono allo sviluppo del cancro gastrico. Secondo questo modello, in seguito allo sviluppo di gastriti croniche, atrofia, metaplasia intestinale e displasia sarebbero le fasi coinvolti nella tumorigenesi (Correa, 1992). L'instabilità genetica a livello dei microsatelliti (MSI), causata da errori nel processo di replicazione, è presente in alcune categorie di tumore gastrico e rappresenta una delle prime modificazioni coinvolte nella carcinogenesi, da cui l'importanza del fenomeno nella diagnosi precoce. Inoltre la presenza di difetti nel numero di queste brevi sequenze, ripetute in tandem, si osserva anche nella regione codificante di alcuni geni che spesso appaiono alterati nei tumori gastrici, tra cui Bax e il recettore del TGF- β . Inoltre mutazioni o perdita dell'eterozigosi nel gene di p53 e della proteina APC (Adenomatosis Polyposis Coli) sono riscontrati in molti tumori gastrici, indipendentemente dal sottotipo istologico. La prima, in particolare, sembra svolgere un ruolo fondamentale nella transizione dallo stadio metaplastico alle displasie (Zheng et al., 2004), mentre la seconda, in quanto coinvolta nella degradazione della β -cateneina, determina un aumento nei livelli della proteina che è coinvolta in pathways di crescita e di sopravvivenza cellulare (Taipale and Beachy, 2001).

Stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali

Lo stress ossidativo

Nel corso degli anni '70 l'interesse della ricerca è stato progressivamente rivolto a quei processi ossido-riduttivi che non sono, nella cellula, direttamente correlati alla respirazione.

L'identificazione nel 1969 dell'enzima superossido dismutasi, la caratterizzazione della chimica del glutatione, basata su scambi di tipo tiolo-disolfuro unica nel suo genere in rapporto alle conoscenze del tempo, e la successiva scoperta dell'enzima ad essa correlato glutatione perossidasi, avvenuta nel 1973, aprono la strada ad una originaria definizione, ancora puramente descrittiva, del concetto di "stress ossidativo", come elemento cardine nella citotossicità necrotica.

In quegli stessi anni Cerutti postulò lo stretto legame che intercorre fra una condizione cellulare da lui definita stato pro-ossidante e la proliferazione cellulare, preludio al processo di promozione tumorale (Cerutti, 1985), sottolineando per la prima volta la potenziale importanza fisiologica dello stress ossidativo in processi biologici quali la crescita cellulare.

Con il termine stress ossidativo viene oggi designata una situazione dinamica in cui l'equilibrio tra specie pro-ossidanti e antiossidanti, nei sistemi biologici, può influenzare indirettamente il fenotipo cellulare, andando ad agire su biomolecole che possiedono gruppi sensibili allo stato ossido-riduttivo della cellula.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Con l'acronimo ROS vengono designati tutti i prodotti intermedi parzialmente ridotti del metabolismo dell'ossigeno. Si tratta di molecole dalla reattività più o meno spiccata, che varia da quella moderata dell'anione superossido e del perossido di idrogeno (i prodotti, rispettivamente, della riduzione mono e bieletronica dell'ossigeno) sino alla accentuata pericolosità del radicale idrossilico.

I radicali liberi intracellulari, molecole a basso peso molecolare con un elettrone spaiato nell'orbitale elettronico esterno, sono spesso ROS e viceversa, da qui la tendenza ad utilizzare usualmente i due termini come sinonimi.

Anione superossido ($O_2^{\bullet-}$)

Pur essendo un radicale libero, caratterizzato quindi dalla presenza di un elettrone spaiato sull'orbitale elettronico esterno, la molecola non possiede un'elevata reattività. La sua formazione avviene spontaneamente soprattutto nell'ambiente ricco di ossigeno in prossimità della membrana interna del mitocondrio, ma è anche a carico di enzimi quali la xantina ossidasi (Nordberg and Arnér, 2001; Kuppusami and Zweier, 1989) durante il metabolismo delle basi azotate, la lipossigenasi e la ciclossigenasi, enzimi chiave nella produzione dei tromboxani e delle prostaglandine (Nordberg and Arnér, 2001; Kontos *et al.*, 1985).

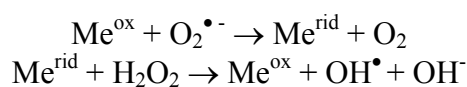
Due molecole di anione superossido reagiscono rapidamente a dare perossido di idrogeno e ossigeno molecolare in una reazione anche catalizzata dalla superossido dismutasi.

Perossido di idrogeno (H_2O_2)

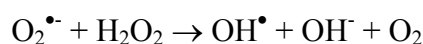
Tipico esempio di specie reattiva dell'ossigeno non presente in forma radicalica, pur non essendo particolarmente reattiva, riveste un ruolo importante per la sua capacità di penetrare attraverso le membrane biologiche e critico come intermedio di reazione nella sintesi di ROS altamente reattivi, soprattutto il radicale idrossilico. La sua rimozione è a carico di almeno tre sistemi enzimatici: la catalasi, le glutatione perossidasi e le perossiredossine.

Radicale idrossilico ($\bullet OH$)

La sua estrema reattività verso le biomolecole lo rende la specie reattiva dell'ossigeno in grado di generare i maggiori danni nei sistemi biologici. Viene prodotto a partire dal perossido di idrogeno nella reazione di Fenton catalizzata da ioni metallici (Fe^{2+} o Cu^+), anche presenti in complessi con proteine ed altre molecole:



Il risultato netto di questa sequenza di reazioni è noto come reazione di Haber-Weiss:



Nonostante nell'organismo la maggior parte del ferro e del rame sia sequestrata in forme che non sono disponibili per catalizzare tali reazioni, questo rimane un meccanismo fondamentale per la formazione del radicale OH^\bullet *in vivo*.

Le difese antiossidanti: sistemi di difesa enzimatici e non enzimatici

A fronte di una pericolosa seppur fisiologica produzione di molecole reattive la cellula possiede numerosi mezzi di difesa, enzimatici e non, che la proteggono dai possibili effetti deleteri che le specie reattive dell'ossigeno potrebbero avere a livello dei loro numerosi bersagli biologici.

La difesa antiossidante enzimatica è composta da proteine in grado di rimuovere con un'elevata efficienza catalitica i ROS: la superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione perossidasi.

Superossido dismutasi

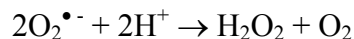
La superossido dismutasi (SOD), primo fra gli enzimi in grado di metabolizzare le specie reattive dell'ossigeno ad essere stato identificato, è presente nelle cellule eucariotiche in tre isoforme.

La superossido dismutasi contenente rame e zinco (Cu/Zn-SOD o SOD1) localizzata nel citosol e nello spazio intermembrana mitocondriale (Liou *et al*, 1993).

La superossido dismutasi a manganese (Mn-SOD o SOD2) ad esclusiva localizzazione mitocondriale (Barra *et al*, 1984) che è considerata la principale barriera di difesa nel metabolismo dell'ossigeno (Weisiger and Fridovich, 1973).

La superossido dismutasi extracellulare (Ec-SOD) sintetizzata solamente da alcuni tipi cellulari, in particolare i fibroblasti e le cellule endoteliali, da cui è espressa sulla superficie cellulare in associazione con gli eparan solfati (Marklund, 1982).

Nella reazione catalizzata con estrema efficienza da questa famiglia di enzimi due molecole di anione superossido producono una molecola di perossido di idrogeno e ossigeno molecolare:

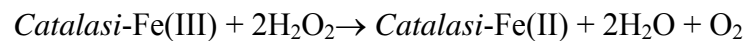


Il prodotto finale della dismutazione dell'anione superossido è, pertanto, a sua volta una specie reattiva dell'ossigeno, il perossido di idrogeno, non

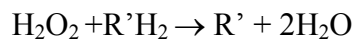
radicalica ma comunque con attività ossidante, che è substrato degli altri due sistemi enzimatici presi in esame: la catalasi e la glutazione perossidasi.

Catalasi

La catalasi (ossidoreduttasi del perossido d'idrogeno) è un enzima costituito da quattro subunità proteiche, ognuna contenente ferro *eme* e una molecola di NADPH (Kirkman *et al.*, 1987). È preferenzialmente localizzata nei perossisomi, organuli che contengono anche molti enzimi che generano con la loro attività H_2O_2 , dove provvede alla dismutazione dello stesso in una molecola d'acqua e ossigeno molecolare:



L'enzima presiede anche alla detossificazione di altri substrati tra cui fenoli ed alcoli attraverso una riduzione accoppiata del perossido di idrogeno:



Glutazione perossidasi

Esistono almeno quattro diverse glutazione perossidasi nelle cellule di mammifero (GPx1-4), tutti enzimi, contenenti selenio nel sito attivo sottoforma di selenio-cisteina, implicati nella riduzione del perossido di idrogeno e degli idroperossidi organici. La glutazione perossidasi Se-indipendente è, invece, coinvolta nella riduzione di fosfolipidi idroperossidi, oltre a quella dei composti precedentemente indicati (Saito and Takashi, 2000).

La reazione catalizzata presenta specificità solo per il donatore di elettroni (il GSH) mentre l'idroperossido può essere rappresentato sia dal perossido di idrogeno sia da idroperossidi derivati dagli acidi grassi e dagli steroidi:



e fa delle glutazione perossidasi tra gli enzimi più versatili esistenti nella cellula.

L'attività della glutazione perossidasi dipende dalla disponibilità intracellulare di glutazione ridotto, che è a sua volta il prodotto dell'attività

dell'enzima glutatione reduttasi, il quale sfrutta il potere riducente associato all' NADPH prodotto nelle vie metaboliche di degradazione degli zuccheri:



Sistemi di difesa non enzimatici

Ogni volta che i radicali liberi reagiscono con altre molecole possono essere generati radicali secondari, che a loro volta possono dare inizio ad altre reazioni a catena con la formazione di nuove specie radicaliche. Un esempio di reazione a catena è rappresentato dalla perossidazione lipidica che prosegue fin quando le nuove specie radicaliche formatesi si combinano dando un prodotto stabile, oppure vengono neutralizzate da antiossidanti in grado di interrompere la serie di reazioni.

Questi antiossidanti sono molecole a piccolo peso molecolare aromatiche o ricche di dieni coniugati, in grado di determinare lo spegnimento della reazione radicalica o di trasformarsi in radicali stabili grazie alle loro proprietà chimiche. Alcuni di essi sono presenti nella fase lipidica come la *vitamina E*, priva di azione preventiva, ma in grado di reagire con le specie radicaliche già presenti (Urano *et al.*, 1992), i *carotenoidi*, efficienti nella rimozione dell'ossigeno singoletto (Fukuzawa *et al.*, 1998), i *flavonoidi* e l'*ubichinolo-10*. Altri, invece, per effetto della loro localizzazione, provvedono alla rimozione di radicali presenti nei compartimenti acquosi della cellula. Tra di essi la *vitamina C* e numerose molecole contenenti gruppi tiolici: l'*albumina*, innanzitutto, in quanto provvista di numerosi ponti disolfuro con i quali può provvedere alla neutralizzazione dei radicali perossilici e il *glutatione*, già citato tra i determinanti dello stato redox intracellulare.

Ruolo dei sulfidril proteici nel mantenimento dell'ambiente redox cellulare

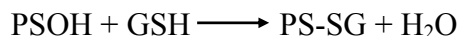
Numerose evidenze sono emerse a sostegno del ruolo fondamentale svolto dalle modificazioni redox di certe proteine nella biochimica e nella fisiologia cellulare. Si tratta di enzimi coinvolti nel metabolismo come la glucosio-6-fosfato deidrogenasi e la piruvato chinasi, nella trasduzione del segnale come la guanilato ciclasi e nel catabolismo proteico come la tripsina (Cotgrave and Gerdes, 1998). La purificazione di queste proteine ha permesso di dimostrare la presenza di residui amminoacidici in grado di

prender parte, in condizioni fisiologiche, a reazioni di scambio tiolo/disolfuro.

Per questo, accanto agli innegabili effetti dannosi apportati dagli ossidanti, testimoniato dal ruolo, originariamente osservato dal ruolo che essi svolgono nella citotossicità necrotica, l'attenzione si è in maniera decisa spostata sulla loro funzione regolatoria, in particolare in processi quali la proliferazione e più di recente la morte e il controllo del ciclo cellulare.

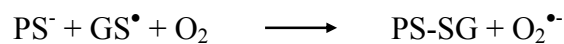
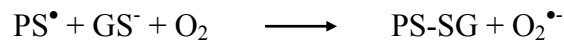
Il termine stress ossidativo viene pertanto oggi tendenzialmente sostituito con l'espressione "regolazione redox" (o mediata dagli ossidanti), che ne rimuove l'originaria possibile connotazione negativa. Se da un lato è vero, infatti, che intensi flussi di ROS possono generare danno alle principali classi di macromolecole biologiche, sfociando nella morte cellulare, la produzione controllata degli stessi è implicata nella regolazione di molti processi fisiologici (Filomeni *et al.*, 2005). Numerose proteine contengono gruppi sulfidrilici (Prot-SH o PSH) dovuti ai residui di cisteina. Essendo parte integrante delle strutture proteiche che li contengono, il contenuto cellulare di questi gruppi è molto più alto dei livelli di glutatione (GSH) intracellulare. I PSH possono presentarsi sotto forma di tioli (-SH), disolfuri (PS-SP), o disolfuri misti (per esempio PS-SG se coniugati con il GSH). Quest'ultima specie è indubbiamente la più abbondante e la più variabile. (Seres *et al.*, 1996). L'ossidazione della forma tiolica, o la riduzione di un gruppo disolfuro di un enzima, può determinare l'attivazione o l'inattivazione della funzione catalica (Watanabe *et al.*, 1972; Ernest and Kim, 1973). La reazione di S-tiolazione/detiolazione è un processo dinamico che avviene in condizioni fisiologiche. È reversibile, ma la velocità di reazione può variare in funzione della natura del gruppo tiolico all'interno dell'ambiente chimico generato dalla struttura proteica (Di Simplicio *et al.*, 1998). La reazione di ossidazione dei sulfidrilici proteici a disolfuri, è una risposta precoce che la cellula attiva contro lo stress ossidativo (Thomas *et al.*, 1995). La formazione dei disolfuri misti può avvenire secondo diversi meccanismi (Fig. 5):

1. Ossidazione bi-elettronica del tiolo proteico seguita dalla reazione con il GSH

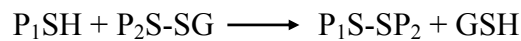
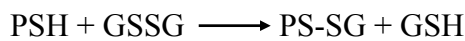


La formazione dell'acido sulfenico (PSOH) è un'ossidazione a due elettroni del tiolo PSH. Questo intermedio può essere infatti scritto come PS^+ .

2. Ossidazione monoelettronica del sulfidrilico o del GSH seguita dalla formazione del disolfuro

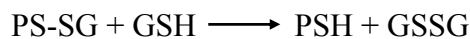


3. Reazione di scambio tiolo/disolfuro

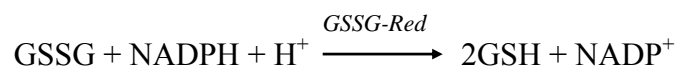


Queste reazioni dimostrano che i tioli proteici possono giocare un ruolo nella difesa antiossidante e influenzare in questo modo l'ambiente redox intracellulare. È stato dimostrato che durante il *burst* ossidativo dei neutrofili, più del 17 % del GSH totale è legato alle proteine sotto forma di disolfuro misto (Seres *et al.*, 1996).

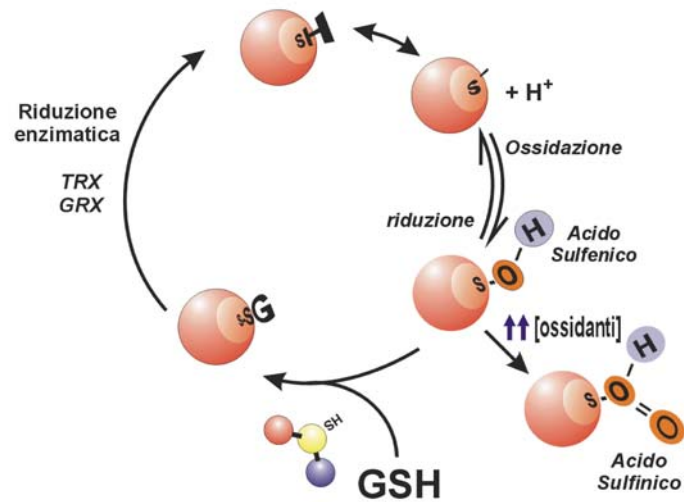
Terminata la fase di stress ossidativo, i sulfidrilici proteici possono ritornare a far parte del pool tiolico cellulare mediante reazione del GSH con i PS-SG:



A sua volta il GSH verrà rigenerato a partire dal GSSG, mediante catalisi enzimatica operata dall'enzima glutatione reduttasi (GSSG-Red):



a.



b.

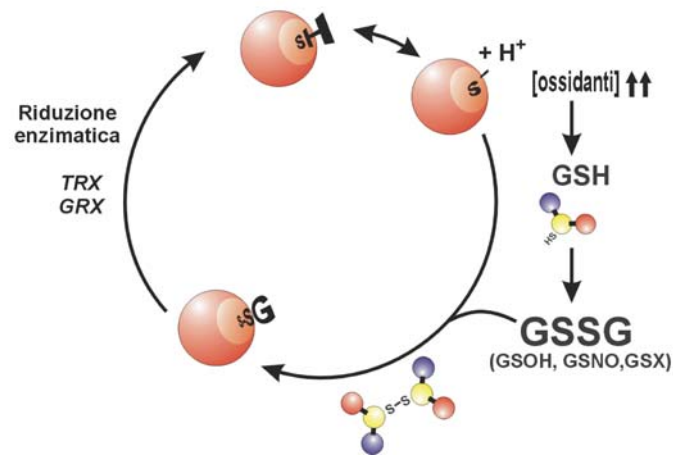


Figura 5
Ossidazione reversibile attraverso i processi di S-glutatioazione

L'attività di molte proteine (es. fattori di trascrizione e protein fosfatasi) è regolata da ossidazioni reversibili sulle cisteine reattive in seguito ad alterazioni redox. Le specie ossidanti agiscono: **a.** direttamente sul tiolo proteico; **b.** sul glutatione libero alterando il rapporto GSH/GSSG.

Alterazioni redox nei processi di trasduzione del segnale

La biologia dei processi ossido-riduttivi ha subito nell'ultimo decennio una notevole accelerazione, basti pensare all'avanzamento tecnologico in ambito proteomico, che ha permesso di caratterizzare cambiamenti globali nello stato redox delle proteine, in condizioni di stress ossidativo (Winterbourn and Hampton, 2008). Queste metodiche si basano essenzialmente sull'impiego di sonde specifiche che permettono il legame e la successiva identificazione dei sulfidrilici in forma ridotta. I risultati ottenuti, ad ora, presentano un'estrema variabilità in funzione della metodica scelta e del tipo cellulare che si va ad analizzare, ma è comunque possibile trarre alcune conclusioni di carattere generale:

1. Solamente una piccola frazione del proteoma va incontro a processi di ossidazione (Le Moan *et al.*, 2006). Questa osservazione supporta l'esistenza di meccanismi atti a garantire la specificità del processo.
2. I target proteici di questa regolazione svolgono un ampio spettro di funzioni, che variano dal metabolismo, alla funzione strutturale, dalla sintesi proteica alla risposta antiossidante (Linde *et al.*, 2002; Fratelli *et al.*, 2002; Saurin *et al.*, 2004).
3. Diverse sottoclassi di proteine sono ossidate in risposta a diverse tipologie di stress ossidativo (Baty *et al.*, 2005).

Si deve tener conto del fatto che non tutte le specie pro-ossidanti, inoltre, reagiscono nello stesso modo: esistono ossidanti forti e non, solo alcuni hanno natura radicalica e tutti possono essere più o meno facilmente neutralizzati dalla risposta antiossidante; tali fattori contribuiscono a garantire differenze nelle vie di segnalazione innescate, in contesti cellulari specifici, e in funzione dell'ossidante coinvolto (Winterbourn and Hampton, 2008).

Meccanismi di trasmissione del segnale

Stress di tipo ossidativo e riduttivo possono innescare cascate redox che determinano cambiamenti dello stato tiolico della cellula. Di riflesso, questi cambiamenti possono alterare la trasduzione del segnale, la sintesi del DNA e dell'RNA, la sintesi proteica, l'attivazione enzimatica e spesso la regolazione del ciclo cellulare (Arrigo, 1992; Suzuki *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997; Powis *et al.*, 1997; Rahman and MacNee, 2000; Shackelford *et al.*, 2000). Ulteriori attività vitali come il legame ligando/recettore, il legame al DNA e la traslocazione nucleare sono sotto il controllo dei cambiamenti dell'ambiente redox cellulare (Simons and Pratt, 1995; Makino *et al.*, 1999).

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che molti fattori di trascrizione eucariotici inducono l'espressione genica solo nella forma ridotta e la loro traslocazione nel nucleo è spesso dipendente dai cambiamenti redox (Winterbourn and Hampton, 2008). Un esempio è quello rappresentato dai fattori di trascrizione Nrf2 e Nf- κ B, la cui esclusione dal nucleo è garantita dalla interazione con KEAP-1 e I κ B, rispettivamente (Kobayashi and Yamamoto, 2005; Gloire et al., 2006).

È stato inoltre dimostrato che alte concentrazioni tioliche sono associate alla stimolazione della proliferazione di numerose linee tumorali (Broome and Jeng, 1973; Hewllet *et al.*, 1977; Hamilos *et al.*, 1989), fenomeno che concorda con il fatto che un ambiente riducente rappresenta un fattore determinante per l'induzione della crescita cellulare. Al contrario, la morte delle cellule è spesso associata con un ambiente ossidante. Numerose specie pro-ossidanti, infatti, inducono la morte cellulare programmata aumentando la concentrazione delle specie reattive dell'ossigeno. Tra di esse vanno ricordati alcuni metaboliti dell'acido arachidonico (Kim *et al.*, 1996); gli idroperossidi lipidici (Aoshima *et al.*, 1997); composti in grado di esistere sotto varie forme redox, come la bleomicina (Hamilton *et al.*, 1995) e i chinoni (Dypbukt *et al.*, 1994); alcune aldeidi reattive (Okado *et al.*, 1996) e i ditiocarbammati (Nobel *et al.*, 1995). D'altro canto, la difesa antiossidante costituita dagli agenti riducenti come l'N-acetil-cisteina (NAC), il GSH e le proteine contenenti tioli (tioredossina) mostrano una protezione contro l'apoptosi (Sandstrom *et al.*, 1994; Gabby *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1997). L'ambiente redox è quindi in grado di determinare i destini di una cellula: proliferazione, differenziamento o morte (Kirlin *et al.*, 1999; Aw, 1999; Cai and Jones, 1998; Hutter *et al.*, 1997).

La cascata di eventi innescati dal legame di fattori di crescita e citochine al proprio recettore, sono stati argomento di intensi studi, e, negli ultimi anni, il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in questi processi ha contribuito ad aumentare la complessità degli eventi a valle della risposta cellulare (Finkel, 1998; Lander, 1997). Esperimenti condotti su cellule in coltura, hanno dimostrato che una grande varietà di ligandi, tra cui il fattore di crescita piastrinico (PDGF), il fattore di crescita epidermico (EGF), l'angiotensina II e molte citochine, sono associate ad una rapida produzione intracellulare di ROS (Speir *et al.*, 1994; Griendling *et al.*, 1994; Bae *et al.*, 1997; Sundaesan *et al.*, 1995).

Restava da capire se questo fenomeno rappresentava una risposta tossica e non specifica, o se la generazione di ROS era un elemento importante nelle vie di segnalazione. I primi esperimenti in questo campo furono effettuati

mediante trattamenti con composti antiossidanti o attraverso l'uso di linee cellulari in grado di sovra-esprimere gli enzimi deputati alla difesa contro lo stress ossidativo (SOD, GSH-Px, CAT). I risultati furono inequivocabili: i ROS erano coinvolti in varie vie di segnalazione cellulare. In particolare, aumentando i livelli di catalasi, si inibiva la capacità del PDGF di attivare la fosforilazione sui residui di tirosina di molte proteine (Sundaresan *et al.*, 1995); e simili risultati furono ottenuti con l'EGF (Bae *et al.*, 1997). Questo fenomeno non era però limitato ai processi di segnalazione mediati dalle fosfo-tirosine, in quanto anche la trasduzione del segnale a valle dell'angiotensina II era alterato dalla modulazione dello stato redox (Ushio-Fukai *et al.*, 1996).

Sebbene questi processi implicino un coinvolgimento dei ROS come mediatori della risposta ai fattori di crescita, molto rimane ancora da scoprire sui meccanismi attraverso i quali agiscono le specie ossidanti. In particolare, data la squisita natura delle vie di segnalazione, sembrerebbe probabile che, una volta generati, i ROS possano comunicare, se non addirittura far parte, di percorsi di segnalazione conosciuti e ben stabiliti. Tutto ciò potrebbe suggerire un ruolo di effettori diretti per i ROS, per cui interazioni con proteine bersaglio redox-sensibili si traducono in alterazioni della struttura e della funzione. Alcune recenti evidenze che confermano questa ipotesi derivano da analisi condotte con la metodica del doppio ibrido, usando ASK1 (la chinasi regolata da segnali apoptotici) come esca. ASK1 è un membro della famiglia delle protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) coinvolte nell'attivazione delle protein chinasi attivate da stress (SAPK o la chinasi della porzione N-terminale di c-Jun – JNK) e della chinasi p38 (p38 MAPK). Curiosamente, è stato scoperto che la tioredossina forma un complesso con ASK1 in seguito al quale l'attività della chinasi viene inibita (Saitoh *et al.*, 1998). L'aumento dei livelli di ROS in seguito alla stimolazione del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF-R) provocano la dissociazione del complesso ASK1/Trx e la successiva attivazione di ASK1 (Saitoh *et al.*, 1998; Gotoh and Cooper, 1998).

Un ulteriore modo attraverso cui i ROS possono alterare la trasduzione del segnale è l'ossidazione di specifiche cisteine, denominate reattive a causa del fatto che, anche a pH fisiologici – causa l'ambiente chimico della proteina di cui fanno parte – sono ossidate ad acido sulfenico. La cisteina reattiva meglio caratterizzata è forse quella del fattore di trascrizione batterico OxyR la cui attività è sensibile ai cambiamenti dello stato redox (Zheng *et al.*, 1998). Anche cellule di mammifero possiedono una grande varietà di proteine che contengono cisteine facilmente ossidabili; tra quelle

coinvolte nella trasduzione del segnale, la più rilevante è la famiglia delle proteine tirosin-fosfatasiche. Tutti i membri di questa famiglia hanno una cisteina reattiva all'interno del sito attivo ed è stato ipotizzato che uno stress ossidativo può inattivare reversibilmente l'attività tirosin fosfatase. Il meccanismo per l'inattivazione transiente, presumibilmente coinvolge la formazione del gruppo sulfenato a livello della cisteina reattiva (-SO[•]). In questo stato l'attività catalitica delle fosfatasi (e potenzialmente di altri enzimi) è di gran lunga ridotta se non addirittura abolita. Questa è anche la forma con la quale la proteina interagisce con il GSH intracellulare dando origine ad un disolfuro misto; la successiva trasformazione nella forma tiolica attiva risiede nell'azione di proteine ed enzimi specifici quali la tioredossina o la glutaredossina. Nel caso in cui lo stress si fa più grave, la concentrazione elevata di specie ossidanti determina un'ossidazione irreversibile del residuo in acido sulfinico (-SO₂H) (Finkel, 2000).

In questo tipo di modulazione, la specificità deriva dall'ambiente chimico costituito dagli amminoacidi attorno alla cisteina; residui che determinano se il gruppo -SH sia, o meno, facilmente ossidabile. Il meccanismo descritto è analogo a ciò che avviene per le proteine regolate dai processi di fosforilazione, dove determinati motivi amminoacidici creano l'intorno chimico per il riconoscimento e la fosforilazione di specifici residui di serina, treonina o tirosina (Filomeni *et al.*, 2005a). In entrambe i casi l'attività enzimatica è regolata in modo reversibile agendo su specifici amminoacidi:

1. aggiungendo un gruppo fosfato, nel caso della ormai ben caratterizzata fosforilazione proteica;
2. complessando il glutatione in seguito ad ossidazione, nel caso della segnalazione redox.

Studi successivi hanno mostrato che la produzione di ROS, in seguito al legame ligando/recettore, può essere sufficiente per regolare l'attività specifica di alcune proteine. Analisi condotte sulla protein tirosin fosfatasi 1B (PTP-1B), in seguito a stimolazione con EGF, suggerisce l'esistenza di una inattivazione temporanea dell'attività fosfatase che corrisponde temporalmente con la massiccia produzione di ROS (Lee *et al.*, 1998). Inoltre, analizzando lo stato redox della cisteina reattiva dell'enzima, si è visto che il flusso di ROS è associato ad una reazione di S-glutattiolazione della proteina (Barrett *et al.*, 1999).

Segnalazione redox nella biologia dei tumori

Nel modello proposto da Fruehauf la trasformazione tumorale può essere causata dall'esposizione ad elevati livelli di ROS come effetto del loro potenziale mutagenico. Il danno al DNA è normalmente rimosso ad opera di sistemi di riparo, ma tale processo può risultare inefficiente e innescare fenomeni di promozione tumorale. In questa fase cellule sottoposte ad ulteriori flussi di ROS possono andare incontro a morte cellulare per apoptosi o iniziare a proliferare rendendo il processo di tumorigenesi irreversibile (Fig. 6).

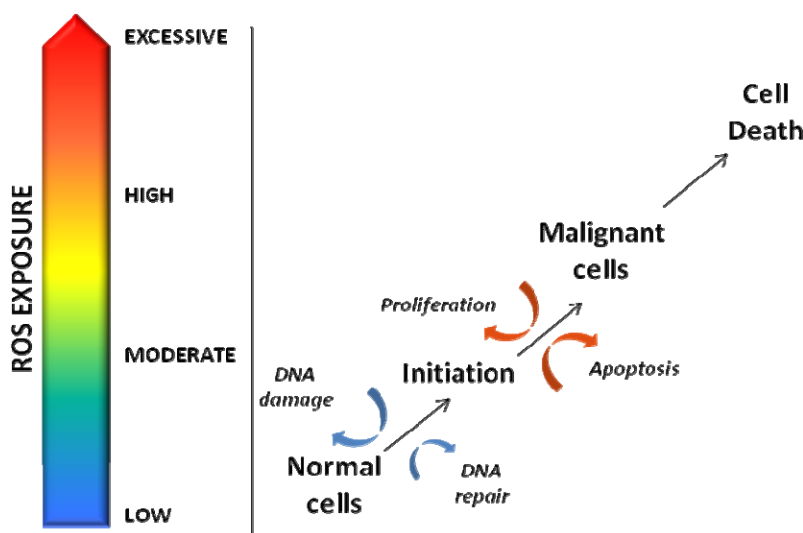


Figura 6
Modello di Fruehauf

Il modello descrive le fasi coinvolte nel processo di tumorigenesi indotto dai ROS e permette di spiegare il fenomeno dello stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali.

Secondo questo modello le cellule tumorali possiedono innati elevati livelli di ROS intracellulari se confrontate con cellule normali (Fruehauf, 2007). Le

cellule tumorali sono, inoltre, metabolicamente attive e questa proprietà giustifica e supporta ulteriormente l'incremento nei livelli dei ROS, che in esse si osserva. L'effetto è un aumentato stress ossidativo associato ad una crescente produzione di specie reattive dell'ossigeno, ad un accumulo dei metaboliti risultanti dalla loro elevata reattività ed, in generale, ad un'aumentata espressione di enzimi antiossidanti che ad esso rispondono.

Studi *in vitro* hanno evidenziato una produzione costitutiva di perossido di idrogeno (H₂O₂) in sette linee tumorali umane (Szatrowski and Nathan, 1991) e l'analisi di cellule primarie, isolate da pazienti con varie forme di leucemia, hanno messo in luce un significativo incremento nei livelli dei radicali dell'ossigeno, rispetto a linfociti normali (Hileman *et al.*, 2004).

A causa dell'elevata reattività dei ROS, un aumento nei livelli di produzione di tali specie si accompagna all'accumulo dei prodotti ossidati del DNA, delle proteine e dei lipidi, in prima istanza a livello tissutale; per cui il principale prodotto dell'ossidazione delle basi azotate, l'8-ossi-guanosina, così come i prodotti della perossidazione lipidica sono spesso rilevabili in corrispondenza dei tessuti tumorali.

L'espressione di enzimi antiossidanti, quali la superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione-S-transferasi, che sottostà a meccanismi complessi di regolazione, in cui lo stress ossidativo gioca il ruolo di principale induttore, risulta conseguentemente alterata (Pelicano *et al.*, 2004; Storey, 1996).

L'incremento di specie reattive dell'ossigeno è la principale causa dell'aumentata espressione dell'enzima MnSOD che si osserva negli adenocarcinomi gastrici e in carcinomi a cellule squamose dell'esofago (Janssen *et al.*, 2000), fenomeno, questo, non generalizzabile, data l'osservazione di livelli inalterati e talvolta persino ridotti dell'enzima in cellule tumorali con diversa origine.

Meccanismi alla base dello stress ossidativo in cellule tumorali

La portata dello stress ossidativo è usualmente da ricondursi al bilancio dinamico nella produzione di ROS e nella loro rimozione. In condizioni fisiologiche livelli opportuni di specie reattive dell'ossigeno sono fondamentali per mantenere un corretto stato ossido-riduttivo della cellula e per garantire il normale funzionamento delle vie di segnalazione.

L'incremento nei livelli delle specie reattive dell'ossigeno, che spesso si accompagna alla trasformazione tumorale, è prodotto dal contributo di diversi meccanismi, innanzitutto i segnali trasmessi dal prodotto di oncogeni. Ben caratterizzato è il meccanismo utilizzato dalla proteina *ras* in fibroblasti. La sua trasformazione ha effetto su *rac*, che è una componente

regolatoria essenziale nell'attività della NADPH ossidasi di membrana. La conseguenza è una stimolazione della sua attività con conseguente aumento nella produzione di anione superossido, importante per il mantenimento delle cellule in uno stato proliferativo (Pelicano *et al.*, 2004; Irani *et al.*, 1997).

Un ulteriore possibile meccanismo coinvolge il cattivo funzionamento della catena di trasporto mitocondriale. Il DNA mitocondriale (mtDNA) codifica per 13 componenti dei complessi respiratori, mutazioni a carico di questi geni, peraltro privi di introni, sono responsabili di alterazioni nella catena di trasporto mitocondriale. Poiché il mitocondrio è la principale sede di produzione dei ROS, l'mtDNA, vulnerabile al loro effetto, può subire danni che comportano il definitivo incremento nel rilascio degli stessi, come osservato in alcuni pazienti affetti da leucemia (Carew *et al.*, 2003).

Un possibile evento proposto a giustificare questa anomala caratteristica in alcune cellule tumorali è inoltre l'attivo metabolismo richiesto da queste ultime per sostenere la fase proliferativa costante e la continua crescita cellulare. Questa richiesta energetica sottopone i mitocondri ad uno stress che risulterebbe in un aumentato rilascio di specie reattive.

Infine è stata osservata una relazione decisa tra alcune forme di infiammazione cronica e il rischio di trasformazione tumorale. Le molecole che hanno un'azione pro-infiammatoria richiamano e attivano cellule, quali macrofagi e neutrofilo, con la capacità di rilasciare radicali liberi nell'ambiente, nel cosiddetto burst ossidativo, in grado di danneggiare le macromolecole biologiche e agendo sull'mtDNA determinare poi un'ulteriore produzione di ROS.

Conseguenze dello stress ossidativo in cellule tumorali

Adattamento

La mobilitazione di sistemi tampone è da considerarsi come la prima linea di difesa rispetto allo stress generato dalla produzione di ROS, così come i già citati livelli d'espressione aumentati per alcuni enzimi antiossidanti.

Questo processo adattativo è però scarsamente efficace nelle cellule tumorali, che manifestano una tendenza ad esaurire facilmente le proprie capacità tamponanti; è stato, per questo, a lungo proposto che la somministrazione esogena di uno stress di natura ossidativa ulteriore rispetto a quello basalmente osservabile in cellule tumorali possa esaurire le capacità

antiossidanti della cellula, sino al raggiungimento di una soglia oltre la quale si ha l'innescò del programma apoptotico (Pelicano *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2000).

E' questo il motivo per cui cellule trasformate risultano maggiormente sensibili ad agenti antitumorali che provocano un ulteriore incremento nei livelli di ROS, come osservato nel trattamento di cellule linfocitarie tumorali con il 2-metossiestradiolo, un innovativo chemioterapico basato sulla selettiva inibizione della superossido dismutasi (Hileman *et al.*, 2003).

Proliferazione cellulare intensificata

I ROS sono importanti molecole segnale e, prodotte in quantità moderate, possono promuovere la crescita cellulare e la proliferazione, contribuendo allo sviluppo del cancro.

L'effetto è da ricondursi alla regolazione mediata dagli ossidanti che ha come bersaglio proteine in grado di presiedere questi importanti processi: prima fra tutte la tioredossina con azione su ASK1 e a valle sulla cascata delle MAP chinasi attivate da stress. Anche la proteina p53 è risultata responsiva a modificazioni ossidative che ne modificano la capacità di legame al DNA e quindi regolativa sull'espressione di geni coinvolti nella corretta progressione del ciclo cellulare (Pelicano *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2003).

Instabilità genetica

Le modificazioni ossidative a carico del DNA sono spesso causa di mutazioni, dovute soprattutto ad errori d'appaiamento durante la replicazione. Per questo la produzione di ROS da parte del mitocondrio rappresenta una fonte costante di agenti potenzialmente dannosi per il DNA, soprattutto a livello dello stesso mitocondrio, a causa della sua prossimità alle sedi di produzione, per le sue limitate capacità riparative e per l'assenza di istoni ed introni.

Questi danni possono, come già sottolineato, comportare un malfunzionamento della catena di trasporto degli elettroni e conseguentemente un'amplificazione nel rilascio di intermedi del metabolismo dell'ossigeno.

Danno e morte cellulare

I ROS sono dannosi per tutte le macromolecole biologiche: DNA, lipidi e proteine. L'ossidazione di proteine può, ad esempio, determinare un'alterazione dell'equilibrio redox necessario al buon funzionamento di enzimi che complessano metalli tra cui il citocromo c, la citocromo c

ossidasi, la glutatione perossidasi e la catalasi. L'inibizione dell'attività della catalasi e della GSH-perossidasi, causata dall'ossidazione, riduce ulteriormente la capacità della cellula di difendersi dai perossidi e comporta, quindi, uno stress ossidativo conseguente.

Anche i lipidi subiscono l'effetto deleterio dei radicali dell'ossigeno; a livello delle membrane esso si traduce in una indiscriminata permeabilità che, in corrispondenza del mitocondrio, può comportare l'innesco del programma di morte cellulare per il non più regolato rilascio di fattori pro-apoptotici (Sastre *et al.*, 2000).

La capacità dei ROS di provocare tali danni alle strutture cellulari, sino all'attivazione dell'apoptosi, fornisce uno strumento per la rimozione delle cellule trasformate in chemioterapia.

Implicazioni terapeutiche e tumori gastrici

Esistono due strategie che possono essere impiegate in chemioterapia per sfruttare lo stress ossidativo intrinseco in cellule tumorali. La prima consiste nell'inibire l'attività di enzimi antiossidanti nelle cellule trasformate, la seconda nella produzione di ROS a livello delle stesse. Il primo tentativo di impiego di agenti pro-ossidanti *in vivo* è stato riportato da Nathan e Chon nel 1981. I due autori impiegarono la glucosio ossidasi, come precursore di H₂O₂, in modelli animali, ottenendo una significativa riduzione della crescita tumorale (Nathan and Cohn, 1981). Da quel momento numerosi dati sono stati ottenuti circa il potenziale anti-tumorale di molecole con attività redox e molti dei chemioterapici attualmente in uso, tra cui la doxorubicina, la vinblastina, la vincastrina e la camptotecina mostrano un'attività pro-ossidante che è H₂O₂-mediata (Simizu *et al.*, 1998) e che si esplica in maniera selettiva su cellule tumorali, senza mostrare citotossicità di rilievo sui tessuti sani limitrofi (Yoshikawa *et al.*, 1995). L'attenzione della ricerca, inoltre, è stata più di recente rivolta a molecole ad azione redox che possano essere introdotte con la dieta. In particolare i polifenoli dell'uva e dei frutti rossi e i polisolfuri allilici di *Allium sativum* sembrano essere buoni candidati come chemioterapici ad uso diretto o combinato. Numerose evidenze sperimentali supportano l'azione antiproliferativa e citotossica dei composti dell'aglio, presenti sia nella frazione liposolubile, quali il disolfuro e il trisolfuro di diallile (Filomeni *et al.*, 2003a; Hosono *et al.*, 2005), che in quella idrosolubile, quali la S-mercaptocisteina, in numerosi modelli cellulari tumorali (Xiao *et al.*, 2003). Lo specifico equipaggiamento della difesa antiossidante in linee tumorali diverse è però un elemento di cui si deve tener

conto per garantire l'effettiva efficacia di trattamenti anti-tumorali a base redox. Uno studio recente ha infatti dimostrato come cellule di adenocarcinoma gastrico (AGS) siano insensibili all'azione del disolfuro di diallile (DADS), per effetto degli elevati livelli di espressione e di attività dell'enzima glutatione perossidasi (GPx) e per l'anomala elevata concentrazione di glutatione ossidato a disolfuro misto con le proteine, che rappresenterebbero due importanti linee di difesa nella diretta rimozione dei radicali prodotti in seguito alla somministrazione di DADS e di indiretta preservazione della funzionalità e della struttura delle proteine, rispetto a gradi di ossidazione ulteriore e irreversibile (Filomeni et al., 2005c).

Proteine redox-regolate coinvolte in tumorigenesi

I fattori di trascrizione

Numerosi fattori molecolari che regolano il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale e la trascrizione esibiscono una sensibilità più o meno marcata per le modificazioni ossido-riduttive.

Molti fattori di trascrizione, ad esempio, possiedono residui di cisteina conservati che li rendono responsivi in particolari condizioni ossido-riduttive della cellula o che permettono di sentire i livelli di molecole segnale coinvolte nella segnalazione redox (Na and Surh, 2006). OxyR è il primo esempio di fattore di trascrizione, la cui attività è regolata dalle condizioni pro-ossidanti, ad essere stato identificato nei procarioti. L'esposizione ad elevati livelli di H₂O₂ comporta l'attivazione del fattore, per effetto della formazione di un ponte disolfuro tra le cys199 e cys208. Il cambiamento conformazionale è associato ad un' aumentata affinità per il DNA e al reclutamento della RNA polimerasi (Filomeni *et al.*, 2005a). Esiste poi una regolazione redox del fattore più fine, di recente messa in evidenza dal gruppo di Stamler. La cys199 è il residuo critico in questo tipo di regolazione che affianca lo *switch on/off* descritto in precedenza. Questa cisteina può andare incontro a gradi successivi di ossidazione, in funzione dello squilibrio redox presente nell'ambiente intracellulare e dalla natura delle specie pro-ossidanti presenti. La S-nitrosilazione, la S-glutatioilazione, la formazione del ponte disolfuro e l'ossidazione ad acido sulfenico possono essere alternativamente utilizzati per regolare finemente l'attività trascrizionale della proteina (Kim *et al.*, 2002).

Negli eucarioti, inoltre, la regolazione redox basata sulla durata e sulla intensità dello stimolo viene ulteriormente complicata dal confinamento spaziale della regolazione di molti fattori di trascrizione (Filomeni *et al.*, 2005a).

Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2)

Il fattore di trascrizione Nrf2 rappresenta un ottimo esempio di regolazione spaziale dell'attività trascrizionale operata attraverso stimoli di tipo ossidativo. Nrf2 dirige la trascrizione di geni che contengono nel proprio promotore l'elemento ARE (Antioxidant Response Element), si tratta di proteine la cui espressione può essere indotta in condizioni di stress ossidativo. Tra di esse è possibile annoverare enzimi con funzione

citoprotettiva quali la NAD(P)H:quinone ossido reduttasi 1 e la glutatione-S-transferasi importanti per la detossificazione di carcinogeni; enzimi antiossidanti quali la superossido dismutasi e l'eme-ossigenasi 1 (HO-1) ed infine enzimi che regolano lo stato riducente dell'ambiente intracellulare quali la glucosio 6-fosfato deidrogenasi, essenziale alla produzione del NADPH (Eggler *et al.*, 2008).

In assenza di stimoli in grado di evocare la risposta antiossidante, il fattore è localizzato a livello citosolico dove interagisce con la proteina Keap1. Il suo interattore ne garantisce l'esclusione dal nucleo e, in quanto adattatore molecolare per il complesso dell'ubiquitina ligasi, ne permette la degradazione e il rapido *turn-over* (Fig.7).

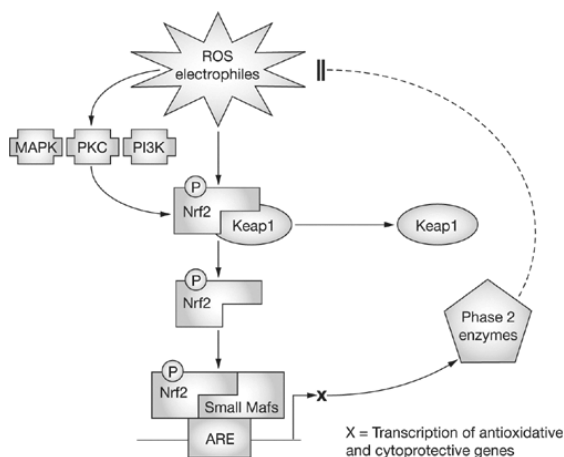


Figura 7
Meccanismo di attivazione del
fattore di trascrizione Nrf2

Lo schema illustra l'attivazione trascrizionale di Nrf2 mediata da ossidanti e garantita dalla perdita del legame con l'interattore Keap1.

Dopo il 2002 un numero crescente di informazioni sono andate ad accumularsi per spiegare il meccanismo di attivazione di Nrf2 in risposta a stress di tipo ossidativo ed attualmente esistono due modelli che la descrivono.

Il primo modello prevede una ridotta ubiquitinazione del fattore, per effetto della perdita dell'interazione con Keap1. Ossidazioni a carico di Keap1, proteina particolarmente ricca in cisteine, potrebbero comportare non direttamente tale perdita, ma in maniera più plausibile una alterazione del ruolo funzionale di Keap1 come adattatore molecolare per l'ubiquitina ligasi. Questa ipotesi è supportata dal fatto che molti attivatori, tra cui

numerose molecole di derivazione alimentare, che potrebbero essere impiegate nella protezione da carcinogeni, quali la quercetina, il sulforafano, il trisolfuro di diallile, la ginesteina e la curcumina, possiedono gruppi elettrofilici in grado di reagire con sulfidrilici proteici (Eggler *et al.*, 2008). Inoltre esisterebbe un ruolo regolatorio anche per fosforilazioni a carico di Nrf2 ed in particolare la chinasi p38^{MAPK} sarebbe in grado di determinare una fosforilazione che rafforzerebbe l'interazione Nrf2-Keap1, inibendo la risposta antiossidante (Keum *et al.*, 2006).

Secondo l'altro modello, invece, i processi di importo ed esporto dal nucleo giocherebbero un ruolo preponderante nell'attivazione trascrizionale di Nrf2. Tali meccanismi sarebbero regolati da processi di fosforilazione, e anche ossidazione di cisteine a carico del fattore di trascrizione. Per quanto concerne i processi di fosforilazione la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) sarebbe responsabile dell'accumulo nucleare di Nrf2 (Martin *et al.*, 2004). L'ossidazione della cys183, localizzata in una sequenza di esporto nucleare, sembra essere, invece, essenziale a ridurre l'esporto del fattore dal nucleo e a garantirne, pertanto, l'attività trascrizionale in condizioni di stress ossidativo (Li *et al.*, 2006).

p53

Il soppressore tumorale p53 è coinvolto nella risposta cellulare a numerose tipologie di stress ed in particolare a stress di natura genotossica, garantendo la trascrizione di geni coinvolti nel riparo, nell'arresto del ciclo cellulare, nella senescenza e nell'induzione dell'apoptosi (Liu and Chen, 2006). In condizioni fisiologiche anche p53 possiede un'emivita breve, per cui i suoi livelli sono mantenuti molto bassi dall'interazione con l'ubiquitina ligasi Mdm2 (Haupt *et al.*, 1997). La scoperta che l'overespressione di p53 si accompagna alla transattivazione di geni che codificano per proteine con attività redox tra cui la NAD(P)H:quinone ossido reduttasi 1 ha permesso di stabilire per la prima volta un chiaro nesso tra ROS e p53 (Polyak *et al.*, 1997). A differenza del ruolo pro-ossidante svolto dagli aumentati livelli di p53, a livelli basali il fattore svolge un'azione volta a contenere i fisiologici livelli dei ROS entro limiti di non tossicità, essenzialmente attraverso l'attivazione di geni per proteine antiossidanti (Sablina *et al.*, 2005). Peraltro l'interazione tra il fattore di trascrizione e i ROS intracellulari si esplica non solo attraverso la fine regolazione di vie di segnalazione redox-sensibili, ma anche attraverso una diretta modificazione operata dai ROS, per effetto delle numerose cisteine modificabili che possiede il fattore (Liu *et al.*, 2008).

Un meccanismo di recente proposto per giustificare l'azione su cisteine di proteine che legano il DNA prevede un'azione diretta degli elettroni che, a partire dalla formazione di radicali guaninici, possono essere trasportati lungo le coppie di basi aromatiche che formano la doppia elica di DNA (Merino *et al.*, 2008).

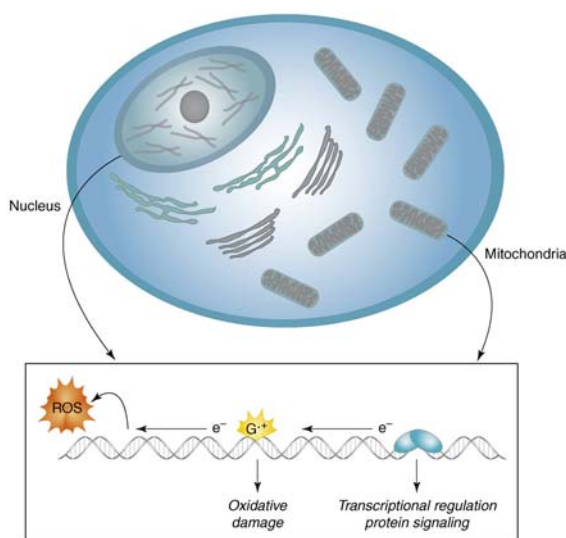


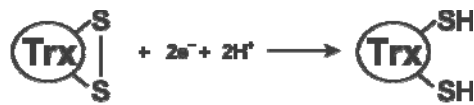
Figura 8
Meccanismi di trasporto di carica nel contesto biologico

Il trasporto di carica lungo la doppia elica di DNA svolge molteplici funzioni: dal convogliamento del danno ossidativo su regioni regolatorie e non codificanti del DNA alla mediazione della segnalazione su proteine coinvolte nel riparo e nella regolazione trascrizionale.

Questa modalità di regolazione, descritta in Fig. 8, ha trovato una prima conferma per il fattore p53. Secondo il modello i radicali guaninici vengono generati per effetto dell'azione pro-ossidante di specifici composti e se i loro livelli sono sufficienti ad innescare il trasporto di carica lungo la doppia elica di DNA andrebbero ad ossidare cisteine sensibili di alcuni fattori di trascrizione determinando il rilascio dalla regione del promotore di geni impedendo la trascrizione. Il meccanismo sembra essere coinvolto nella inibizione della trascrizione di geni coinvolti nei processi di riparo, qualora il danno al DNA sia tale da rendere futile il riparo stesso (Merino *et al.*, 2008).

La tioredossina

La tioredossina (Trx1) è una proteina ubiquitaria di 12 kDa che possiede un'attività ossidoreduktasica essenziale per il corretto ripiegamento delle proteine e per garantire l'attività di particolari enzimi quali la ribonucleotide reductasi e la protein disolfuro isomerasi, nonché il corretto legame di alcuni fattori di trascrizione al DNA tra cui p53, NF- κ B e AP1 (Filomeni *et al.*, 2003).



Il sistema è altresì importante come donatore di idrogenioni per molte perossiredossine, coinvolte nella riduzione di perossidi (Filomeni *et al.*, 2003; Nordberg and Arnér, 2001). La tioredossina è in grado di formare ponti disolfuro, usualmente intermolecolari, la cui riduzione è a carico della tioredossina reductasi, che utilizza come fonte di elettroni l'NADPH. Le conoscenze sulla chimica della Trx1 hanno fatto numerosi passi in avanti negli ultimi dieci anni, grazie alla messa a punto di metodi di analisi, nonché ai progressi condotti in campo biochimico, molecolare e nella biologia strutturale. Questo fattore, originariamente identificato da Peter Reichard come donatore di elettroni della ribonucleotide reductasi in *Escherichia coli*, possiede un ditiolo caratteristico a livello del sito attivo, che oggi sappiamo essere altamente conservato a livello evolutivo (Lillig and Holmgren, 2007). Il meccanismo di reazione della proteina è descritto nella fig. 9.

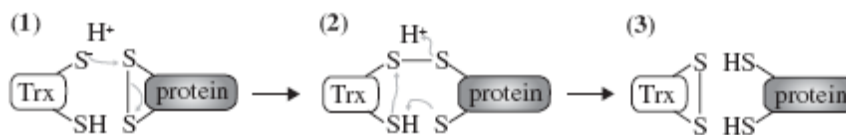


Figura 9
Meccanismo di reazione della tioredossina

Lo schema illustra il meccanismo di reazione in tre tappe della tioredossina.

Esso richiede le due cisteine del sito attivo in forma ridotta. La Trx si lega in maniera non covalente al disolfuro proteico da ridurre attraverso la superficie idrofobica che circonda il sito attivo. La cisteina all'N-terminale (cys32) effettua un attacco nucleofilo del disolfuro target, formando un intermedio di reazione in cui la Trx e la proteina sono legate da un ponte disolfuro, poi ridotto dalla cisteina al C-terminale del sito attivo (cys35). Il sito attivo ossidato è quindi nuovamente ridotto dalla tioredossina reduttasi (TrxR), in una reazione NADPH dipendente. Le cellule di mammifero contengono due distinte tioredossine: la Trx1, prevalentemente citosolica, e la Trx2, localizzata nei mitocondri. Il gene per la Trx1 è organizzato in cinque esoni separati da quattro introni ed è caratterizzato dalla presenza di due promotori, parzialmente sovrapposti, contenenti numerosi elementi per l'espressione costitutiva del gene e per quella inducibile. Tra gli elementi di regolazione responsabili della trascrizione indotta è di particolare importanza menzionare l'elemento di risposta antiossidante (ARE) per l'induzione in condizioni di stress ossidativo (Kim et al., 2003).

A differenza della controparte procariotica, le tioredossine negli eucarioti possiedono delle cisteine addizionali e per ognuna di esse è stato suggerito un ruolo regolatorio nell'attività della proteina (fig. 7).

Un secondo ponte disolfuro tra la cys62 e la cys69 è stato identificato mediante spettrometria di massa (Watson *et al.*, 2003), si tratta di un ponte disolfuro che non può essere ridotto dalla TrxR e che ha la capacità di ridurre la velocità con cui la reduttasi riattiva il sito attivo della proteina. Inoltre il processo di S-nitrosilazione, che coinvolge la cys69, sembra essere coinvolto nella preservazione dell'attività redox della Trx1 in condizioni di intenso stress ossidativo (Haendeler *et al.*, 2002). Anche la cys73, che nella struttura tridimensionale è in prossimità del sito attivo, può essere S-nitrosilata e questa modificazione può garantire il trasferimento della molecola di NO alla cisteina del sito catalitico della caspasi 3, regolandone l'attività catalitica (Mitchell and Marletta, 2005) (Fig. 10).

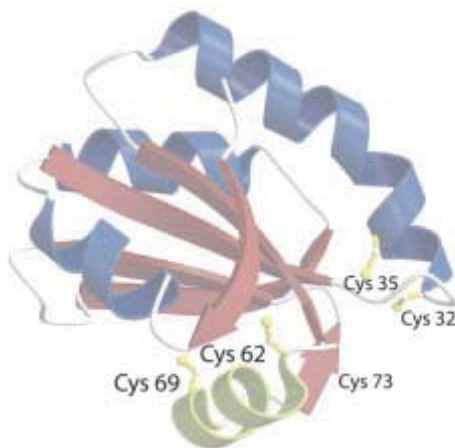


Figura 10
Struttura tridimensionale della Trx1 in cui vengono mostrati i residui di cisteina

La proteina contiene, negli eucarioti, tre residui di cys addizionali, tutti coinvolti in processi regolatori: la cys62 e la cys69 possono formare un ponte disolfuro, la cys69 e la 73 possono andare incontro a *S*-nitrosilazione e la cys73 può essere *S*-glutatiolata e dare luogo alla formazione di dimeri tra due molecole di Trx1.

La tioredossina nei tumori gastrici

Gli elevati livelli di proteine con attività ossidoreduttasica possono rappresentare una prima risposta adattativa al fenomeno dello stress ossidativo implicato nel processo di tumorigenesi. L'originaria osservazione dell'attività mitogenica che la Trx1 è in grado di esercitare su cellule leucocitarie è oggi supportata da conoscenze relative all'azione regolativa che essa esercita sui processi proliferativi. La sua espressione è elevata in molti tipi tumorali e correla con la resistenza a chemioterapici classici quali il cisplatino, la mitomicina C, la doxorubicina e l'etoposide (Yokomizo *et al.*, 1995). Inoltre è stata osservata una relazione diretta fra i livelli di espressione della Trx1 e la progressione nonché la cattiva prognosi di alcuni tipi di tumore, tra cui i tumori polmonari (Kaimul *et al.*, 2007). Alcuni studi hanno inoltre messo in evidenza una correlazione tra l'espressione della proteina e l'aumentato tasso proliferativo di carcinomi gastrici (Grogan *et al.*, 2000). E' stata inoltre caratterizzata una relazione tra le diverse tipologie di tumori gastrici e i livelli di espressione della proteina supportando una massima espressione della stessa nelle tipologie indifferenziate di cancro gastrico. Il vantaggio selettivo delle cellule tumorali gastriche overesprimenti la tioredossina è stato associato, in uno studio condotto su topi inoculati con tali cellule, all'azione diretta della proteina come fattore di crescita, nonché alla sua attività inibitoria su vie di induzione dell'apoptosi (Noda *et al.*, 2000).

PROCEDURE SPERIMENTALI

Colture cellulari

La linea cellulare stabilizzata di adenocarcinoma gastrico AGS, ottenuta dalla European Collection of Cell Culture, è stata coltivata in terreno Nutrient Mixture F-12 HAM (Sigma-Aldrich) supplementato con siero fetale bovino (Lonza Milano) al 10%, glutammina 2mM (Lonza Milano) e una soluzione antibiotica costituita da streptomina e penicillina (Lonza Milano). La linea cellulare stabilizzata di neuroblastoma umano SH-SY5Y, ottenuta dalla European Collection of Cell Culture, è stata coltivata in terreno DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich) supplementato con siero fetale bovino (Lonza Milano) al 15%, glutammina 2mM (Lonza Milano) e 100U/ml di una soluzione antibiotica costituita da streptomina e penicillina (Lonza Milano).

I monostrati cellulari venivano mantenuti a 37°C in atmosfera controllata, al 5% di CO₂. Arrivati a confluenza venivano staccati con una soluzione di tripsina allo 0.25% e la sospensione cellulare veniva centrifugata e riseminata in terreno fresco

Per entrambi i tipi cellulari, la conta era effettuata utilizzando un emocitometro di Thoma, mentre la vitalità era determinata mediante esclusione con colorante Trypan blue (0.16 %). Questo composto, infatti, è in grado di attraversare la membrana plasmatica solo nel caso in cui vi siano delle alterazioni a suo carico, evidenziando in questo modo la presenza di cellule morte e quindi la percentuale di necrosi della popolazione cellulare.

Trattamenti cellulari

In tutti i trattamenti sperimentali, qui di seguito descritti, sono state usate cellule ad una densità di $2 \times 10^5/5 \text{ cm}^2$, dopo 24 h dal piastramento affinché aderissero alla fiasca. Durante tutti i trattamenti sono state mantenute sempre condizioni di massima sterilità. Inoltre le cellule trattate sono state cresciute nelle stesse condizioni adoperate per il normale mantenimento in coltura.

Molecole ad azione pro-ossidante

La soluzione di diamide (20 mM) e di ditionitrobenzoato (20mM) (Sigma-Aldrich) sono state preparate in DMSO. La soluzione di paraquat (200 mM) e di xantina (100 mM) (Sigma-Aldrich) sono state preparate in acqua. La soluzione di H₂O₂ (200mM) è stata preparata diluendo 10 M H₂O₂ (Sigma-Aldrich) in acqua. Tutte le soluzioni erano preparate fresche prima

dell'esperimento e i trattamenti erano effettuati per 1 h con differenti concentrazioni delle molecole elencate, in un intervallo di concentrazione compreso tra 50 μ M e 2 mM, a 37° in terreno supplementato con il siero. Il terreno era quindi rimosso, le cellule erano lavate con terreno fresco e il recupero veniva monitorato.

Il trattamento con xantina/xantina ossidasi è stato condotto aggiungendo 0.1 U/ml dell'enzima (Sigma-Aldrich). Le differenti concentrazioni del substrato venivano quindi addizionate ogni 15 min per 1 h. Come controlli, uguali volumi di DMSO o acqua venivano aggiunti a cellule non trattate.

Modulazione del contenuto intracellulare di glutatione

D,L butionina (S,R)-sulfossimina

L'inibitore della γ -GCS (Sigma-Aldrich) è stato sciolto in PBS in modo da ottenere una soluzione madre 0.1 M poi opportunamente diluita nei terreni di coltura in modo da ottenere la concentrazione 1 mM utilizzata negli esperimenti. Il pretrattamento è stato condotto per una durata di 12 h prima di condurre gli esperimenti, quindi le cellule sono state trattate secondo protocollo addizionando il terreno di BSO durante il recupero.

N-acetilcisteina

Una soluzione madre 0.5 mM (Sigma-aldrich) è stata ottenuta sciogliendo NAC in PBS. Gli esperimenti sono stati condotti pretrattando le cellule per 1 h con una concentrazione 5 mM ottenuta diluendo opportunamente la soluzione nel mezzo di coltura. Al termine di 1 h le cellule sono state lavate, addizionate con terreno fresco e trattate secondo protocollo addizionando il terreno di NAC durante il recupero.

Inibitori delle MAP-chinasi

Gli inibitori delle MAP chinasi sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni:

- Inibitore di p38MAPK (SB203580) 15 μ M (Calbiochem)
- Inibitore di JNK (SP600125) 10 μ M (Calbiochem)

Tali concentrazioni sono state ottenute diluendo opportunamente delle soluzioni madre nel terreno di coltura. Gli inibitori sono stati addizionati 1 h prima di ciascun trattamento.

Analisi del ciclo cellulare e dell'apoptosi

Le cellule AGS ed SH-SY5Y in aderenza venivano staccate mediante l'utilizzo di tripsina e, insieme con quelle in sospensione, centrifugate, lavate con PBS e successivamente incubate con una soluzione di Triton X-100 (permeabilizzante della membrana cellulare) allo 0.1% e 50 µg/ml di ioduro di propidio, un composto fluorescente intercalante del DNA, per la marcatura dei nuclei. In seguito le cellule erano analizzate tramite citofluorimetria flusso per stabilire non solo il tipo di morte cellulare, ma anche il numero di cellule nelle varie fasi del ciclo. La percentuale delle cellule apoptotiche è stata valutata calcolando l'area del picco corrispondente ai nuclei ipodiploidi (Nicoletti *et al.*, 1991) che rappresentano i nuclei apoptotici tardivi, caratterizzati dal fatto di possedere DNA tagliato in frammenti di 200 bp o multipli di essi. I nuclei diploidi sono invece caratteristici della fase G1 del ciclo cellulare, mentre quelli tetraploidi della fase G2/S. La discriminazione tra le varie forme del DNA è possibile grazie alla diversa intensità di fluorescenza emessa dallo ioduro di propidio, direttamente proporzionale al quantitativo di DNA.

Determinazione della morte cellulare mediante conta con Trypan blue

Durante il processo apoptotico, le cellule in coltura adese al substrato assumono un aspetto tondeggiano, perdono l'aderenza e rimangono in sospensione nel terreno di coltura. Dopo ogni trattamento i terreni di coltura delle cellule AGS ed SH-SY5Y sono stati recuperati e centrifugati a 800 g per 5 min. I monostrati sono stati staccati mediante tripsina e centrifugati a 800 g per 5 min. I pellet recuperati sono stati risospesi in un volume noto di PBS e diluiti 1:1 con una soluzione in PBS di Trypan blue allo 0.16 %. Le cellule morte assumevano il colorante e all'osservazione apparivano di colore blue. La conta cellulare è stata effettuata su camera di Thoma. Mediante questa tecnica è possibile valutare la concentrazione delle cellule attraverso la moltiplicazione del numero ottenuto per la diluizione effettuata e per 10^4 /ml. Il numero totale delle cellule si ottiene moltiplicando la concentrazione per il volume della sospensione cellulare. La morte cellulare è stata quindi determinata valutando il numero totale di cellule presenti nel terreno e rapportate al numero totale delle cellule in coltura (staccate e attaccate).

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 Cu^{2+} , di alcuni residui ossidanti, 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 $-\text{SH}$ e l'istidina con l'anello imidazolico. Il prodotto della reazione di riduzione è evidenziato dalla formazione di composti colorati in azzurro che ha il massimo di assorbimento a 695 nm. La concentrazione proteica è stata calcolata in base ad una retta di taratura ottenuta utilizzando varie concentrazioni di sieralbumina bovina (BSA) come standard.

Determinazione del glutatione e dei disolfuri misti 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 $-\text{NH}_2$ terminali a 2,4-dinitrofenil derivati, dopo la reazione con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (Reed *et al.*, 1980).

Cellule AGS venivano pellettate, accuratamente lavate con PBS, e centrifugate a 1200 rpm per 7 min. I supernatanti venivano rimossi e le cellule portate a -80°C o risospese direttamente in tampone riducente costituito da PBS:HCl 0.01M in ugual proporzione. Il lisato cellulare era ottenuto mediante cicli ripetuti di congelamento e le proteine precipitate in acido metafosforico (con concentrazione finale pari al 5%). Dopo centrifugazione a 22300 g, i tioli a basso peso molecolare presenti nel supernatante, venivano derivatizzati con acido iodoacetico al 10% v/v (15mg/ml) e neutralizzati con NaHCO_3 in polvere. Dopo 1 h di incubazione al buio veniva aggiunta una soluzione di 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (reattivo di Sanger) 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 12 h al buio e la separazione dei tioli era eseguita tramite una colonna da HPLC $\mu\text{Bondpack NH}_2$, 3.9×300 mm (Waters). GSH e GSSG purificati sono stati usati come standard esterni. I risultati sono espressi come nmoli di GSH/mg di proteine presenti nel campione lisato. Per determinare i disolfuri misti

(GS-R), ovvero la percentuale di glutatione legato alle proteine tramite ponti disolfuro, si è incubato il campione con boroidruro di sodio (NaBH_4) per 30 min a 40°C (Brigelius, 1983). Il boroidruro è un agente riducente in grado di ripristinare i gruppi $-\text{SH}$ del glutatione impegnato nei ponti disolfuro e dei residui proteici di cisteina. Al termine della reazione si determina il contenuto di GSH liberato tramite HPLC.

Immunolettroforesi (Western blotting)

Per alcuni dei fattori molecolari presi in esame durante 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 membrane di nitrocellulosa o PVDF.

- 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 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 è ottimizzato con l'applicazione di un campo elettrico (100 mA) per una notte in tampone di corsa contenente TRIS 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 e metanolo al 20%. In alternativa al trasferimento classico si può applicare una corrente molto più elevata (fino a 500 mA) per un periodo di tempo limitato (2 h) mantenendo l'apparecchiatura a bassa temperatura (4°C) per evitare il surriscaldamento del gel e della membrana. L'efficienza di trasferimento è verificata colorando il gel con blue Coomassie e/o la membrana con rosso Ponceau (colorante reversibile 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 (2-3 h) a temperatura ambiente. Dopo opportuni lavaggi si opera aggiungendo un secondo anticorpo (anticorpo secondario) coniugato all'enzima perossidasi. Avvalendosi dell'uso del luminolo, substrato della perossidasi, la radiazione luminosa emessa durante la reazione viene impressionata su lastra fotografica.

Preparazione dei campioni per dosaggio elettroforetico

Lisato totale

Cellule AGS sono state centrifugate a 1300 rpm per 5 min e lavate in PBS (tampone PO_4^{2-} 10 mM, KCL 2.7 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4) mediante ulteriore centrifugazione di 5 min. La lisi è stata ottenuta mediante incubazione per 30 min in tampone di lisi (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM sodio ortovanadato) contenente inibitori delle proteasi (Roche Applied Science). I campioni sono stati quindi centrifugati a 14000 rpm per 20 min a 4°C.

Estratti nucleari

Estratti nucleari sono stati ottenuti incubando cellule AGS in nucleus buffer (1 mM K_2HPO_4 , 5mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 0,3% Triton X-100, pH 6.4) per 30 min in ghiaccio. Dopo l'incubazione le cellule sono state centrifugate a 450 x g per 10 min a 4°C.

Estratti totali e nucleari/citosolici sono stati sottoposti a d immunoelettroforesi in gel di poliacrilammide SDS-PAGE e quindi blottati su nitrocellulosa o membrana PVDF (Bio-Rad). Sono stati utilizzati per lo studio gli anticorpi primari: policlonale anti-caspasi-9, anti fosfo-p38^{MAPK}, anti-JNK1, anti-p38 e monoclonale anti-caspasi-3 (clone 3G2) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); policlonale anti-actina, anti-Nrf2, anti-SOD1, anti-Bax, monoclonale anti-PARP (clone C-210) e anti-fosfo-JNK, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); monoclonale anti-p53 (clone BP53-12) e anti-catalasi (clone CAT-505) (Sigma-Aldrich); policlonale anti-DNA-PK (StressGen); monoclonale anti-fosfo-H2A.X (clone JBW301) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); monoclonale anti-lamina A/C (clone 636) (UCS diagnostic, Roma, Italia); monoclonale anti-eme ossigenasi-1 (HO-1) (clone 23) (BD Biosciences Pharmingen). I carbonili proteici sono stati rilevati mediante l'impiego di un anticorpo diretto contro il derivato dinitrofenilidrazone che si forma in seguito a

processamento dei lisati proteici con dinitrofenilidrazina (Calbiochem). Il complesso proteico specifico è stato identificato dopo incubazione con anticorpi secondari (Sigma-Aldrich) utilizzando il sistema Fluorchem Imaging system (Alpha Innotech, M-Medical, Milano, Italia), previa incubazione con il substrato chemiluminescente ChemiGlow (Alpha Innotech).

Transfezioni

Dopo 24 h dal piastramento cellule AGS ad una confluenza del 50% sono state transfettate con una sequenza di siRNA di 21 nucleotidi diretta contro 5'-GACUCCAGUGGUAUUCUACTT-3' (sip53) (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Cellule di controllo sono state transfettate con una sequenza di siRNA scramble, che non presenta specificità per alcuna sequenza di messaggero (siRNA). Cellule AGS sono state transfettate transientemente con un vettore pmaxFPTM-Green-C vuoto o contenete codificante per la forma dominante negativa di Nrf2 (fornito dal Prof. Brüne, Istituto di Biochimica I/Zentrum für Arzneimittelforschung, -Entwicklung und -Sicherheit (ZAFES), Facoltà di medicina, Università Johann Wolfgang Goethe-, Francoforte, Germania) mediante elettroporazione utilizzando il sistema GenePulser xcell (Bio-Rad Laboratories). Al termine dell'elettroporazione le cellule sono state immediatamente piastrate in terreno fresco. Dopo 48 h dalla transfezione le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti, poichè questo tempo sperimentale era necessario a permettere un incremento significativo nell'espressione della proteina di interesse. L'efficienza di transfezione era stimata analizzando, mediante microscopia a fluorescenza, la fluorescenza associata all'epitopo maxFPTM-Green, con cui la proteina era espressa in fusione. Solo gli esperimenti con un'efficienza di transfezione almeno pari all'80% venivano presi in considerazione.

Preparazione delle cellule per microscopia a fluorescenza

Una determinazione qualitativa dei livelli e della localizzazione delle proteine intracellulari è stata 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 utilizzato prevedeva il fissaggio delle cellule su vetrino. Per fare questo, le cellule sono state fatte crescere in piastre per colture cellulari a sei pozzetti, contenenti un vetrino coprioggetti sterile. I vetrini, sui quali erano aderite le cellule, sono stati prelevati e sciacquati una volta in PBS e successivamente ricoperti con una soluzione di paraformaldeide al 4% in modo da fissare le cellule. Nel passaggio successivo, i vetrini sono stati ricoperti con una soluzione di PBS/Triton X-100 0,4% in modo da permeabilizzare le membrane cellulari. In seguito sono stati sottoposti ad un'operazione di bloccaggio delle interazioni aspecifiche con una soluzione di PBS/FBS (siero bovino fetale) al 10%. Cellule AGS erano, quindi, incubate con gli anticorpi: monoclonale anti-citochrome *c* (clone 6H2), policlonale anti-Hsp60, policlonale anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonale anti-p53 (clone BP53-12) (Sigma-Aldrich). Per gli esperimenti relativi al monitoraggio del danno nucleare cellule AGS ed SH-SY5Y erano incubate con l'anticorpo monoclonale anti-pfosfo-ser-139 dell' istone H2A.X (clone JBW301) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). In tutti gli esperimenti le cellule erano poi probate con gli anticorpi secondari appropriati coniugati con i fluorocromi Alexa Fluor568 or Alexa Fluor488. I nuclei sono stati visualizzati mediante incubazione con la sonda permeabile Hoechst 33342 (Calbiochem-Novabiochem). Le cellule sono state quindi lavate con PBS ed analizzate al microscopio a fluorescenza. Le immagini sono state digitalizzate alternativamente con la camera Cool Snap video collegata al microscopio Nikon Eclipse TE200 o con un Delta Vision Restoration Microscopy System (Applied Precision Inc., Issaquah, WA) collegato ad un microscopio Olympus IX70.

Urea-PAGE

Il metodo è stato descritto in un lavoro di Bersani e permette il monitoraggio dello stato redox della tioredossina 1 (Bersani *et al.*, 2002). I campioni vengono immediatamente lisati in Urea buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 8.2, 8 M urea, 1 mM EDTA) contenente acido iodoacetico 30 mM (IAA), per garantire la concomitante carbossimetilazione dei sulfidrilici liberi. Dopo un'incubazione di 15 min a 37° C, i sulfidrilici ossidati sono stati ridotti in presenza del riducente DTT 3.5 mM e quindi amido metilati mediante un'ulteriore incubazione di 15 min a 37° C in presenza di iodoacetammide 10 mM (IAM). I campioni sono stati quindi caricati su gel di poliacrilammide al 9% contenete urea 8 M, in maniera tale da permettere la separazione delle proteine di interesse in funzione del numero di cariche

negative incorporate nella reazione di carbossimetilazione. Al termine della corsa elettroforetica la proteina è stata visualizzata mediante tecniche di immunoblot. Lo stato redox della Trx1 è stato valutato mediante l'impiego di marker ottenuti trattando campioni proteici con il solo IAA (proteina completamente ridotta), IAM (proteina completamente ossidata) o un mix dei due reagenti, previa riduzione di tutti i sulfidrilici liberi con DTT.

Costruzione dei plasmidi e mutagenesi sito-diretta

Una RT-PCR è stata eseguita per generare il cDNA della Trx1. L'RNA totale è stato estratto da cellule AGS mediante l'impiego del reagente Trizol (Sigma-Aldrich) e quantificato per densitometria dopo caricamento su gel d'agarosio, previa marcatura con bromuro d'etidio. Le stesse quantità di RNA sono state utilizzate per la sintesi del cDNA con la trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA), utilizzando esaprimers random o, alternativamente oligodT. Il cDNA della Trx1 è stato amplificato per PCR utilizzando i seguenti primers: 5'-TCAGAATTCACCATGGTGAAGCAGATCGAG-3' e 5'-CCGGCGGCCGCTTAGACTAATTCATTAATGGTG-3', a partire dal pool di cDNA totali ottenuti dalla reazione di RT-PCR.

Il vettore di espressione è stato creato clonando il cDNA della Trx1 tra i siti di restrizione *EcoRI* e *NotI* di pcDNA/3.1 (Invitrogen).

Il sito mutato della Trx1 è stato ottenuto convertendo il residuo di Cys32 in Ser32 (pcDNA3.1-C32S), mediante mutagenesi sito-diretta: la Taq-polimerasi Pfu-turbo (Stratagene, Cedar Creek, CA) è stata utilizzata per amplificare il vettore pcDNA3.1-Trx1 a partire da primers recanti la mutazione desiderata e il Dna parentale è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione DpnI.

Analisi statistica dei dati

Tutti i dati presentati in questa tesi sono espressi come media \pm deviazione standard (S.D.). Per determinare la significatività dei dati è stato utilizzato il test statistico di Student (o *t* test). Sapendo la media dei valori analizzati, la S.D. e il numero di campioni analizzati (*n*), il *t* test permette di calcolare la probabilità che le differenze osservate siano dovute al caso; le differenze si dicono significative quando tale probabilità è minore del 5 % ($p < 0.05$).

SCOPO DEL LAVORO

Alterazioni più o meno consistenti dello stato redox intracellulare sono una caratteristica spesso riscontrata in cellule tumorali. Questa proprietà unificante ha permesso di mettere a punto strategie chemioterapiche che sfruttano lo stress ossidativo per indurre morte selettivamente in quelle cellule dove il processo di trasformazione si accompagna ad una modificata capacità di rispondere ad ulteriori cambiamenti dello stato ossido-riduttivo intracellulare.

Tuttavia nonostante i numerosi studi ed approcci sperimentali l'esistenza di marcate differenze nella risposta cellulare allo stress ossidativo può, per effetto di un diverso sistema di segnalazione cellulare, culminare in un fallimento della terapia antitumorale. Per questo è di grande interesse lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella risposta a condizioni pro-ossidanti, che sempre più sembrano essere cellula-dipendenti.

Studi condotti nel laboratorio dove è stato condotto questo lavoro sperimentale hanno dimostrato che agenti pro-ossidanti di diversa natura attivano vie di trasduzione del segnale mediato da specifiche MAP chinasi. In particolare è stato osservato lo specifico coinvolgimento della via di $p38^{\text{MAPK}}$ nell'apoptosi indotta in cellule U937 dal trattamento con glutatione ossidato (GSSG), composto impermeabile alla membrana in grado di innalzare i livelli di disolfuri misti intracellulari mediante scambio tiolo/disolfuro con le proteine transmembrana ricche in cisteina (Filomeni *et al.*, 2003b). Lo stesso trattamento, però, non era in grado di attivare vie fosforilative di qualsiasi genere se gli esperimenti venivano condotti su cellule di neuroblastoma (Filomeni *et al.*, 2005a), suggerendo che la risposta cellulare ai segnali redox potesse dipendere dal corredo proteico in grado di sentire lo stimolo e trasdurre il segnale. Successivamente è stata dimostrata l'attivazione della chinasi JNK in cellule SH-SY5Y in risposta al disolfuro di diallile (DADS), induttore di stress ossidativo di natura completamente diversa (Filomeni *et al.*, 2003a). Lo stesso DADS induceva, invece, un processo massivo di formazione di disolfuri misti tra i tioli proteici e il glutatione (GSH) in grado di preservare la normale struttura delle proteine e di proteggerle da ossidazioni irreversibili. Inoltre il trattamento era accompagnato all'inibizione della MAP chinasi ERK 1/2, fenomeno, questo, funzionale all'inibizione della normale progressione del ciclo cellulare che permetteva di garantire l'avvio di efficienti processi di riparo, garantendo la sopravvivenza cellulare (Filomeni *et al.*, 2005c). I dati ottenuti nell'analisi del pattern d'espressione e d'attivazione delle MAP chinasi cui fa seguito la morte per apoptosi della cellula hanno portato ad ipotizzare l'esistenza di specificità nell'attivazione di ciascuna via o comunque nell'attivazione

preferenziale di certe vie di segnalazione in tipi cellulari diversi. Inoltre il coinvolgimento di vie di segnalazione redox sensibili hanno spostato l'attenzione su componenti molecolari, quali i fattori di trascrizione, che potessero essere gli esecutori ultimi della risposta cellulare. Studi recenti hanno messo in luce l'esistenza di una competizione diretta tra fattori di trascrizione in grado di recepire variazioni nello stato redox della cellula, quali p53 ed Nrf2. A tale competizione sarebbe associata la scelta finale tra morte cellulare e sopravvivenza in un contesto cellulare sottoposto a stimoli di natura pro-ossidante (Faraonio *et al.*, 2005)

Questo lavoro di tesi si inserisce in un ampio progetto di ricerca volto alla caratterizzazione di specificità nei meccanismi d'attivazione di vie di segnalazione intracellulari, che marchino le differenze di risposta nelle diverse linee cellulari. Il fine ultimo è quello di arrivare a definire modalità di trasduzione del segnale che sono diverse in linee cellulari diverse, ma solo in rapporto all'istotipo cui la cellula appartiene, nonché l'identificazione dei meccanismi sottesi ai processi di resistenza, che spesso si riscontrano nelle convenzionali strategie chemioterapiche.

Cellule tumorali umane AGS di adenocarcinoma gastrico sono state scelte come modello sperimentale. Questa linea è stata utilizzata per un'analisi sistematica della risposta cellulare a diversi tipi di stress ossidativo.

La scelta degli induttori di stress da utilizzarsi nell'analisi non è stata casuale: sono stati scelti composti in grado di determinare direttamente un incremento dei ROS intracellulari (perossido di idrogeno, sistema xantina/xantina ossidasi, paraquat) e composti che provocano stress ossidativo in maniera indiretta, per alterazione dei sistemi tamponanti intracellulari (diammide, ditionitrobenzoato). La linea cellulare in esame era, infatti, sensibile in maniera marcatamente diversa ai due tipi di stimolo. Tale differenza si manifestava attraverso la differente capacità, per le due tipologie di agenti pro-ossidanti, di determinare danno esteso e persistente alle strutture cellulari: questa caratteristica era associata al solo trattamento con agenti in grado di ossidare i tioli intracellulari ed era specifica nella linea cellulare studiata. Da tale diversificazione ha preso le mosse un'analisi che è stata compiuta, in prima istanza, andando a determinare la modalità di innesco dei processi di morte e la capacità per gli induttori di stress ossidativo impiegati di modulare il contenuto intracellulare di GSH. Infine si è proceduto ad analizzare come tale modulazione potesse correlare con l'attivazione di specifiche vie di segnalazione intracellulari facenti capo ai fattori di trascrizione p53 ed Nrf2.

RISULTATI

Cellule di adenocarcinoma gastrico AGS mostrano diversa suscettibilità al trattamento con agenti pro-ossidanti

Per studiare e caratterizzare la risposta cellulare ad alterazioni dello stato redox intracellulare è stata scelta la linea cellulare umana stabilizzata in coltura di adenocarcinoma gastrico AGS.

Quali agenti pro-ossidanti sono state scelte due tipologie di induttori di stress ossidativo:

- sostanze che promuovono un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari
- sostanze che producono stress ossidativo attraverso l'alterazione dei sistemi-tampone dello stato redox intracellulare.

Come componenti della prima classe di sostanze sono stati scelti tre composti: il perossido di idrogeno (H_2O_2), il paraquat e il sistema xantina/xantina ossidasi. La prima molecola è un intermedio della riduzione dell'ossigeno ad H_2O e, pur trattandosi di specie non radicalica, è altamente reattiva. L' H_2O_2 può attraversare la membrana plasmatica andando ad ossidare, a livello intracellulare, molecole bersaglio sia direttamente, sia in seguito a formazione del radicale idrossilico ($\bullet OH$). Il paraquat e il sistema xantina/xantina ossidasi sono, invece, in grado di innescare cicli redox con la concomitante formazione di $O_2\bullet^-$. Come rappresentanti della seconda classe di agenti sono stati, invece, scelti la diammidite e il ditionitrobenzoato, composti che reagiscono rapidamente con il glutathione e i tioli intracellulari, catalizzando la formazione di disolfuri. Gli induttori di stress ossidativo sono stati impiegati in esperimenti di dose-risposta, in cui ciascuna delle cinque molecole pro-ossidanti è stata somministrata a tre differenti concentrazioni scelte sulla base di indicazioni contenute nella letteratura scientifica e sempre comprese in un intervallo che andava da $50 \mu M$ a $2 mM$. In dettaglio il protocollo utilizzato prevedeva di somministrare uno dei cinque induttori di stress ossidativo alle diverse concentrazioni per 1 h, togliere il terreno, lavare con mezzo fresco e seguire la risposta cellulare dopo 24 h dallo stimolo applicato (recupero). Dopo le 24 h di recupero le cellule venivano analizzate in citofluorimetria previa marcatura con ioduro di propidio, composto fluorescente intercalante del DNA. Lo ioduro di propidio riesce, infatti, ad evidenziare la quantità di DNA presente in ogni nucleo in base alla intensità di fluorescenza emessa. Un istogramma tipico mostra in questo modo diverse sottopopolazioni nucleari: quelle in fase G1 (con contenuto di DNA pari a $2n$), quelle in fase G2/M (con contenuto di DNA pari a $4n$) e quelle in fase S (popolazione a fluorescenza intermedia). Tale metodica è

comunemente utilizzata per determinare i nuclei apoptotici o ipodiploidi, nuclei, cioè, con fluorescenza minore di quelli in fase G1 a causa dei tagli internucleosomali operati negli ultimi stadi del processo di morte cellulare programmata. Le percentuali delle cellule in fase subG1 in seguito a ciascun trattamento e alle concentrazioni indicate sono riportati nella tabella 1.

Paraquat		Xantina/ Xantina ossidasi		Perossido di idrogeno		Ditionitrobenzoato		Diammide	
mM	Apoptosi (%)	mM	Apoptosi (%)	mM	Apoptosi (%)	mM	Apoptosi (%)	mM	Apoptosi (%)
0	6.65 ± 2.11	0	5.84 ± 1.35	0	5.68 ± 1.00	0	5.91 ± 1.12	0	6.12 ± 2.08
0.5	8.59 ± 1.78	0.25	5.19 ± 2.33	0.1	8.59 ± 0.92	0.05	18.30 ± 3.62	0.05	21.19 ± 3.19
1.0	9.86 ± 2.99	0.5	4.76 ± 1.83	0.2	9.86 ± 2.65	0.1	22.44 ± 3.63	0.1	25.76 ± 4.06
2.0	11.70 ± 3.03	1.0	6.96 ± 1.45	0.5	11.91 ± 3.12	0.2	35.77 ± 5.91	0.2	46.96 ± 4.41

Tabella 1

Analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS con paraquat, xantina/xantina ossidasi, H₂O₂, ditionitrobenzoato e diammide

Cellule AGS sono state trattate con concentrazioni crescenti degli induttori di stress ossidativo indicati per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e lasciate in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale della popolazione con la fluorescenza minore (sub-G1 – apoptotica) è stata valutata nella successiva analisi degli istogrammi citofluorimetrici ottenuti. In tabella sono riportate le medie ottenute da n=3 esperimenti.

I risultati indicano che le cellule AGS sono particolarmente resistenti all'azione ROS-mediata della prima classe di agenti pro-ossidanti, mentre la percentuale di cellule in fase subG1 cresce al crescere delle concentrazioni di trattamento utilizzato nel caso dei composti che vanno ad agire sui tioli intracellulari.

Sulla base di questi risultati l'H₂O₂ è stata scelta come modello di induttore di stress ossidativo ad azione ROS-mediata e di resistenza a tale tipologia di sbilanciamento redox, mentre la diammide è stata scelta come modello di composti in grado di ossidare i tioli e di provocare morte cellulare, nella linea di adenocarcinoma in esame. In fig. 1 sono riportati gli istogrammi citofluorimetrici ottenuti in seguito al trattamento delle cellule AGS con 200 µM H₂O₂ e 100 o 200 µM diammide. Gli istogrammi citofluorimetrici confermano i dati descritti in precedenza. In particolare alle due concentrazioni massime di ciascun trattamento, che saranno poi impiegate in tutte le successive analisi, non si osserva un incremento

significativo della percentuale di cellule nella regione subG1 dell'istogramma in seguito al trattamento con H_2O_2 , mentre è evidente l'incremento di questa percentuale in seguito a trattamento con diammidide (Fig. 1).

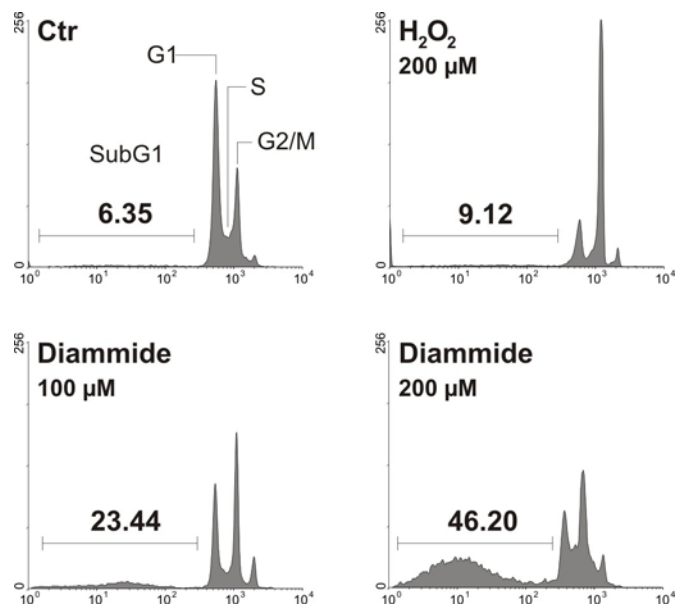


Figura 1
Analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS con H_2O_2 e diammidide

Cellule AGS sono state trattate con H_2O_2 a concentrazioni pari a 200 μM e diammidide a concentrazioni pari a 100 e 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e lasciate in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. Gli istogrammi riportati mostrano la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare: fase G1 (nuclei diploidi - 2n), S (contenuto di DNA intermedio - 2n→4n) e G2/M (nuclei tetraploidi - 4n). La popolazione con fluorescenza minore (subG1 - apoptotica) rappresenta i nuclei con contenuto di DNA inferiore a 2n a causa dei tagli internucleosomali che accompagnano le fasi finali del programma apoptotico ed è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. L'esperimento riportato è rappresentativo di n = 4 esperimenti che hanno prodotto gli stessi risultati.

Successivamente, a conferma del fatto che il picco sub-G1 potesse essere un buon indice del tasso di apoptosi, abbiamo operato conte dirette al

microscopio previa colorazione con Trypan blue, calcolando come cellule apoptotiche la percentuale di cellule staccate dal substrato (in sospensione nel mezzo di coltura), ma ancora negative alla marcatura con Trypan blue. Come è possibile osservare dagli istogrammi ottenuti la differenza osservata per le percentuali di morte tra controlli e trattati veniva mantenuta (Fig. 2).

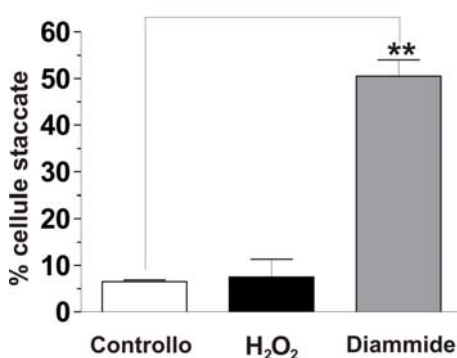


Figura 2
Conta diretta di cellule AGS per esclusione con Trypan blue, dopo trattamento con H₂O₂ e diammide

Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammide a concentrazioni pari a 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e lasciate in coltura per 24 h. Le cellule presenti nel terreno e quelle attaccate, previa tripsinizzazione, sono state colorate con Trypan blue per effettuare conte dirette al microscopio ottico. Gli istogrammi riportano i risultati ottenuti in n=3 esperimenti con **, $p < 0.01$ rispetto al controllo.

La suscettibilità al trattamento con molecole che alterano lo status tiolico è specifica in cellule AGS

Per dimostrare l'esclusività della risposta cellulare osservata nel nostro modello, cellule di neuroblastoma SH-SY5Y sono state trattate con 100 e 200 μ M diammide. Dopo 24 h di recupero le cellule sono state analizzate in citofluorimetria previa marcatura con ioduro di propidio. Dagli istogrammi citofluorimetrici è possibile osservare l'assenza di un incremento significativo della percentuale di cellule nella regione sub-G1 (Fig. 3).

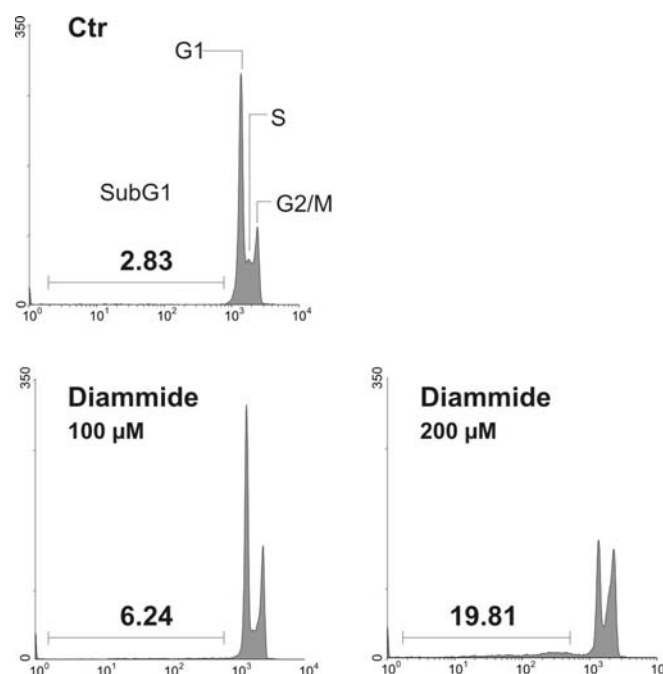


Figura 3
Analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule SH-SY5Y con diamide 100 e 200 μ M

Cellule SH-SY5Y sono state trattate con diamide a concentrazioni pari a 100 e 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e lasciate in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. Gli istogrammi riportati mostrano la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare: fase G1 (nuclei diploidi - 2n), S (contenuto di DNA intermedio - 2n \rightarrow 4n) e G2/M (nuclei tetraploidi - 4n). La popolazione con fluorescenza minore (subG1 - apoptotica) rappresenta i nuclei con contenuto di DNA inferiore a 2n a causa dei tagli internucleosomali che accompagnano le fasi finali del programma apoptotico ed è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. L'esperimento riportato è rappresentativo di n = 4 esperimenti che hanno prodotto gli stessi risultati.

Anche in questo caso la conferma dei dati ottenuti in citofluorimetria è stata ottenuta da conte dirette per esclusione con Trypan blue. In questo caso le cellule sono state trattate per un'ora con H₂O₂ e diamide 100 μ M. Il dimezzamento delle dosi dei due induttori di stress ossidativo è stato deciso in considerazione della elevata suscettibilità di questa linea cellulare allo

stress ossidativo e nel rispetto delle dosi che vengono utilizzate in letteratura per indurre lo stesso in modelli di neuroblastoma. Dopo 24 h di recupero le cellule sono utilizzate per effettuare conte dirette per esclusione con Trypan blue (Fig. 4).

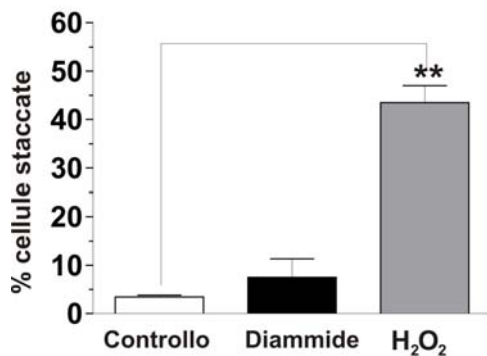


Figura 4

Conta diretta delle cellule SH-SY5Y per esclusione con Trypan blue, dopo trattamento con H₂O₂ o diammide

Cellule SH-SY5Y sono state trattate con H₂O₂ e diammide a concentrazioni pari a 100 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e lasciate in coltura per 24 h. Le cellule presenti nel terreno e quelle attaccate, previa tripsinizzazione, sono state colorate con Trypan blue per effettuare conte dirette al microscopio ottico. Gli istogrammi riportano i risultati ottenuti in n=3 esperimenti con **p < 0.01 rispetto al controllo.

Come è possibile osservare nella Fig. 4 un'alterazione significativa della vitalità cellulare si osservava solamente in seguito a trattamento con H₂O₂, mentre nessuna suscettibilità era riscontrata in seguito al trattamento con diammide. Questi risultati dimostravano l'escusiva sensibilità delle cellule AGS al trattamento con molecole in grado di ossidare il pool tiolico intracellulare.

Il trattamento delle cellule AGS con diammide determina l'attivazione dell'apoptosi attraverso la via mitocondriale

Allo scopo di caratterizzare in maniera rigorosa la modalità di innesco dei processi di morte per apoptosi operata dalla diammide, abbiamo analizzato il coinvolgimento della via mitocondriale.

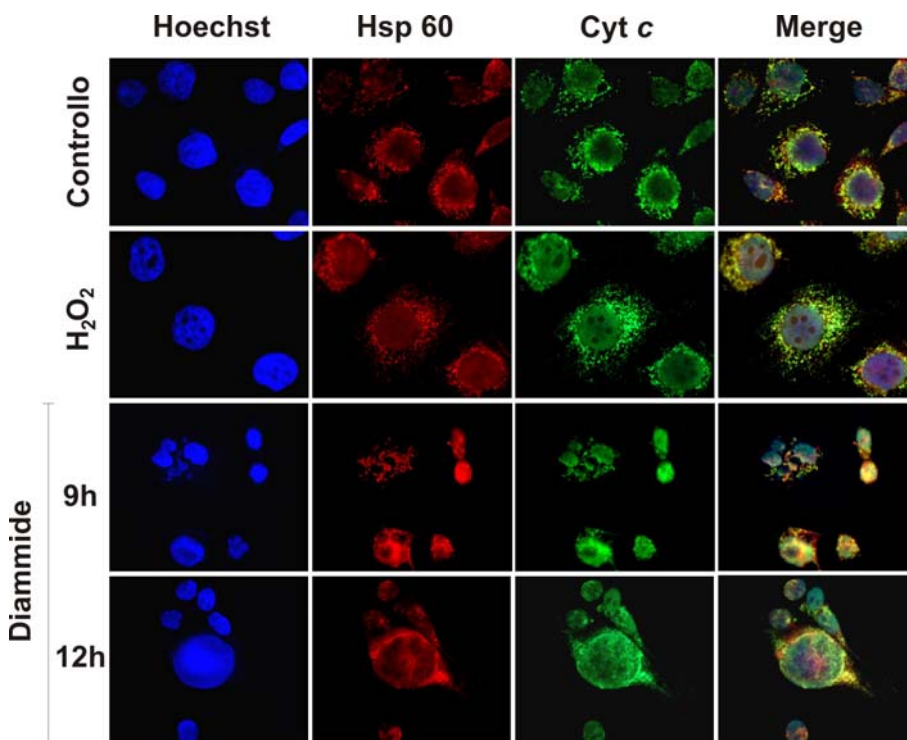


Figura 5
Analisi in microscopia a fluorescenza dei processi di rilascio del citocromo c dal mitocondrio, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diammide

Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammide 200 μ M dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Dopo 1 h le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con gli anticorpi: monoclonale per il citocromo *c* (verde) e policlonale per l'Hsp60 (rosso) e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza

Le cellule AGS sono state trattate con H_2O_2 e diammido alla concentrazione di $200 \mu M$ per 1 h e quindi analizzate, ai tempi sperimentali di recupero indicati, per l'attivazione di diversi marcatori molecolari di tale via di segnalazione.

Dopo 12 h di trattamento con H_2O_2 e dopo 9 e 12 h di trattamento con diammido le cellule sono state fissate con paraformaldeide e marcate utilizzando anticorpi diretti contro Hsp60 (Heat Shock Protein 60), che, in quanto chaperone mitocondriale, permetteva l'identificazione della struttura della rete mitocondriale durante i trattamenti, e il citocromo *c*. Il successivo impiego di specifici anticorpi secondari, coniugati con un gruppo fluorescente, ha permesso di analizzare le cellule in microscopia a fluorescenza (Fig. 5). La completa sovrapposizione delle due marcature utilizzate, ben evidente in cellule di controllo e in seguito al trattamento con H_2O_2 , veniva persa già a partire dalle 9 h ed in maniera più evidente alle 12 h di trattamento con la diammido. Il fenomeno stava ad indicare un processo efficiente di rilascio del citocromo *c* dai mitocondri, evento, questo, propedeutico alla formazione del complesso proteico dell'apoptosoma di cui il citocromo *c* è, insieme ad Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), una delle componenti.

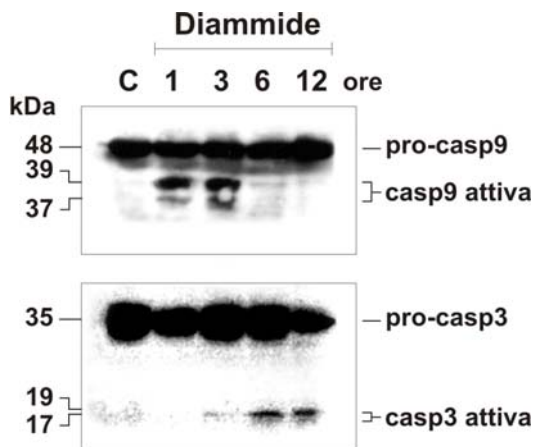


Figura 6

Analisi in Western blot di livelli di attivazione delle Caspasi-9 e -3, dopo trattamento delle cellule AGS con diammido $200 \mu M$

Cellule AGS sono state trattate con diammido $200 \mu M$ per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e $30 \mu g$ di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% contenute SDS e trasferiti su nitrocellulosa. Gli anticorpi per la casp-9 e per la casp-3 sono stati utilizzati per riconoscere le proteine. Gli immunocomplessi con anticorpi secondari specifici coniugati con perossidasi sono stati rilevati in chemiluminescenza.

In parallelo è stata condotta un'analisi in Western blot dell'attivazione delle Caspasi-9 e -3. Questa metodica permette la caratterizzazione dell'attivazione di tali enzimi, mediante l'impiego di anticorpi in grado di riconoscere la forma integra, nonché quella proteolizzata delle proteine, poiché l'evento di proteolisi è, in questo caso, necessario all'attivazione enzimatica. La Caspasi-9 veniva efficientemente cleavata a partire da un'ora di trattamento con diammidè; a valle dell'attivazione della Caspasi-9, anche la proteolisi della Caspasi-3 poteva essere visualizzata a tempi di trattamento più lunghi (a partire dalle 3 h), indicando una sequenzialità di eventi che ricalcava perfettamente quanto noto in letteratura circa il meccanismo di attuazione della via mitocondriale (Fig.6).

Un'ulteriore conferma all'effettiva operatività della via mitocondriale è stata poi ottenuta, sempre in Western blot, dall'analisi dei livelli di proteolisi della proteina nucleare PARP (Poli-ADP Ribosio Polimerasi), target specifico di processamento ad opera della Caspasi-3. I risultati riportati in Fig. 7 mostrano come la proteina veniva efficientemente proteolizzata a partire dalle 3 h di trattamento con diammidè, come dimostrato dalla comparsa di bande specifiche di più basso peso molecolare.

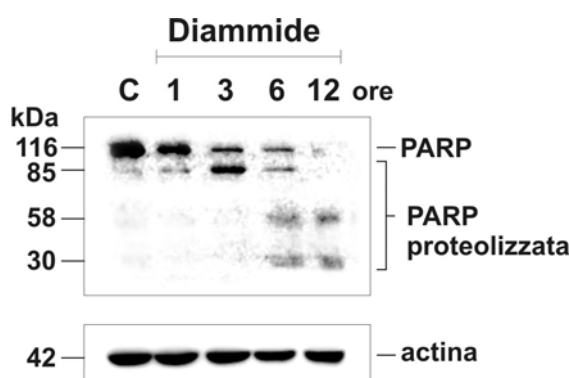


Figura 7

Analisi in Western blot di livelli di PARP, dopo trattamento di cellule AGS con diammidè 200 μ M

Cellule AGS sono state trattate con diammidè 200 μ M per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 30 μ g di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per PARP è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

I processi di resistenza e di suscettibilità allo stress ossidativo sono correlati alla modulazione del pool intracellulare del glutatione

Poiché i composti utilizzati sono in grado di reagire con il glutatione (GSH) attraverso modalità differenti, abbiamo analizzato, in cellule AGS, le variazioni dei livelli di GSH intracellulare e l'alterazione dello *status* intracellulare del tripeptide.

Il sistema del GSH riveste infatti un ruolo fondamentale nel mantenimento dello stato redox intracellulare, sia attraverso la riduzione dei ROS, diretta o mediata dalla glutatione perossidasi (GPx), sia attraverso la formazione di derivati *S*-glutationilici sulle cisteine proteiche, processo altresì importante come prima linea di difesa contro le ossidazioni irreversibili.

Alla luce di tali evidenze le cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ per 1 h e, ai tempi sperimentali indicati, i livelli intracellulari di GSH, GSSG e di disolfuri misti (GS-R), la forma in cui il glutatione si associa con le cisteine delle proteine per ossidazione dei gruppi tiolici, sono stati dosati mediante HPLC (Fig. 8a). I risultati riportati in figura mostrano come questa linea cellulare possieda elevati livelli basali di GS-R (3-4 nmol/mg prot). Tale fenomeno sembrava peculiare di questa linea dato che normalmente i GS-R sono la specie del glutatione meno rappresentata a livello intracellulare. In Fig. 8a si può osservare, inoltre, come al trattamento facesse seguito una tendenza all'aumento del contenuto di GSH, accompagnato da un aumento dei disolfuri misti sino alle 6 h, per abbassarsi poi nelle successive 12 e 24 h. Nessuna variazioni dei livelli di GSSG veniva invece osservata ai tempi sperimentali indicati, suggerendo per il GSH un ruolo di tampone rispetto allo stress ossidativo indotto dall'H₂O₂ e per i GS-R un ruolo di protezione dei tioli proteici da gradi di ossidazione ulteriore e quindi irreversibili. Per confermare il ruolo protettivo svolto dal GSH nella positiva risposta cellulare al trattamento con H₂O₂, le cellule sono state depletate del contenuto di GSH. L'inibizione della neo-sintesi di GSH è stata ottenuta mediante pre-trattamento di 12 h con D,L butionina (S,R)-sulfossimina (BSO), un inibitore specifico della γ -GCS, enzima che catalizza la prima reazione di formazione del tripeptide. Dopo aver ottenuto l'abbassamento dei livelli di GSH da circa 12 nmol/mg prot a valori al limite della disabilità, utilizzando una concentrazione di BSO 1 mM, è stata somministrata H₂O₂ 200 μ M per 1 h e quindi seguita la vitalità nelle successive 24 h. In Fig. 8b sono riportati i risultati ottenuti nell'analisi citofluorimetrica dopo marcatura con ioduro di propidio.

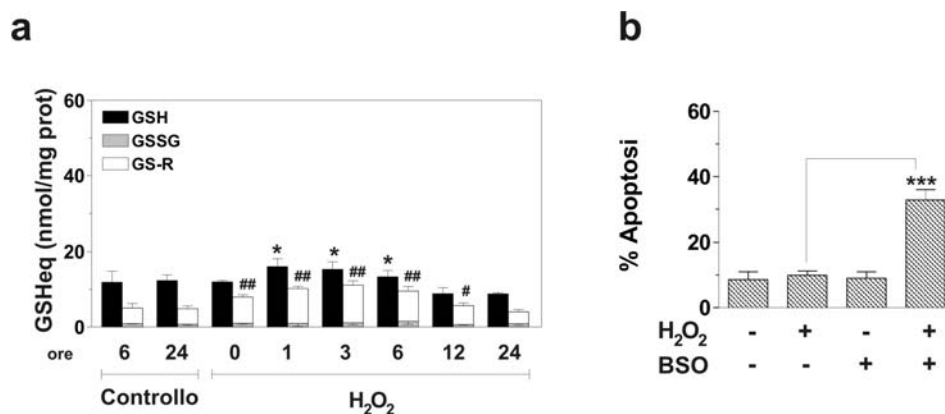


Figura 8

Analisi dei livelli di GSH, GSSG e GS-R mediante HPLC, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ 200 μM e della percentuale di apoptosi in seguito a pre-incubazione con BSO

a: Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco, mantenute in coltura e staccate ai tempi sperimentali indicati. I campioni così ottenuti sono stati preparati per la successiva analisi cromatografica. I valori di GSH e GSSG, espressi in nmol GSHeq/mg prot, sono stati ottenuti comparando le aree dei picchi corrispondenti alla forma ridotta ed ossidata del tripeptide con quelle di standard esterni. I valori di GS-R, anch'essi espressi come nmol GSHeq/mg prot, invece, sono stati ottenuti sottraendo le aree del GSH precedentemente acquisite, alle aree ottenute dopo trattamento con NaBH₄. Gli istogrammi riportano i risultati ottenuti in n=3 esperimenti. Per il GSH: *, p<0.05; ***, p<0.001. Per i GS-R: #, p<0.05; ##, p<0.01, rispetto al controllo.

b: Cellule AGS sono state incubate con BSO 1 mM per 12 h e quindi trattate con H₂O₂ 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 ottenuta in n=5 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. ***, p<0.001 rispetto al controllo.

L'analisi citofluorimetrica mostrava, in seguito a pre-incubazione con BSO, e quindi in condizioni di deplezione del contenuto intracellulare di glutatione, un aumento significativo della percentuale di cellule in fase sub-G1, confermando il ruolo protettivo svolto da questo determinante dello stato redox intracellulare nella positiva risposta delle cellule AGS al trattamento con H₂O₂. Lo stesso tipo di analisi dei livelli di GSH, GSSG e GS-R è stato condotto anche in seguito a trattamento con diammidio. In Fig. 9a sono riportati i risultati ottenuti ai tempi sperimentali indicati. In queste condizioni sperimentali si osservava un drastico incremento dei livelli di GSH (da 13 a

40 nmol/mg prot) ed una significativa ossidazione dello stesso, i livelli del GSSG passavano, infatti, da 0,75 nmol/mg prot a 26 nmol/mg prot. In concomitanza si osservava un decremento, sotto i limiti di sensibilità dello strumento, dei GS-R, che tornavano ad essere dosabili nei tempi sperimentali in cui le cellule andavano incontro a morte per apoptosi. Le cellule sono state, quindi, pre-incubate con un antiossidante tiolico, L’N-acetil-cisteina (NAC) alla concentrazione 5 mM. Il trattamento permetteva di arricchire, in questo caso, il pool tiolico intracellulare; è stata, quindi, somministrata diammidite 200 μ M per 1 h e seguita la vitalità nelle successive 24 h. In Fig. 9b sono riportati i risultati ottenuti nell’analisi citofluorimetrica dopo marcatura con ioduro di propidio.

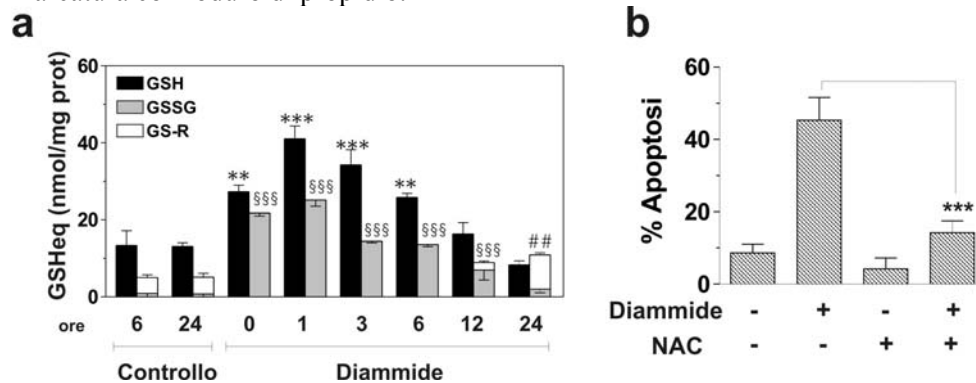


Figura 8

Analisi dei livelli di GSH, GSSG e GS-R mediante HPLC dopo trattamento di cellule AGS con diammidite 200 μ M e della percentuale di apoptosi in seguito a pre-incubazione con NAC

a: Cellule AGS sono state trattate con diammidite 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco, mantenute in coltura e staccate ai tempi sperimentali indicati. I campioni così ottenuti sono stati preparati per la successiva analisi cromatografica. I valori di GSH e GSSG, espressi in nmol GSHeq/mg prot, sono stati ottenuti comparando le aree dei picchi corrispondenti alla forma ridotta ed ossidata del tripeptide con quelle di standard esterni. I valori di GS-R, anch’essi espressi come nmol GSHeq/mg prot, invece, sono stati ottenuti sottraendo le aree del GSH precedentemente acquisite, alle aree ottenute dopo trattamento con NaBH₄. Gli istogrammi riportano i risultati ottenuti in n=3 esperimenti. Per il GSH: ***p*<0.01; ****p*<0.001. Per il GSSG: ^{SSS}*p*<0.001. Per i GS-R: ##*p*<0.01.

b: Cellule AGS sono state incubate con NAC 5 mM per 1 h e quindi trattate con diammidite 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 di n=5 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. ****p*<0.001 rispetto al controllo.

L'analisi citofluorimetrica mostrava una riduzione della percentuale di cellule sub-G1 di circa la metà, confermando il ruolo protettivo del pool di GSH intracellulare nella risposta allo stress ossidativo.

Le cellule AGS mostrano danno ossidativo solo in seguito al trattamento con diammidie

La capacità dei due trattamenti pro-ossidanti impiegati di produrre danno ossidativo è stata valutata a livello di diversi target molecolari. E' stata, innanzitutto analizzata la produzione di danno ossidativo a carico delle proteine. Le cellule AGS sono state trattate con H_2O_2 e diammidie alla concentrazione di $200 \mu M$ per 1 h e quindi, ai tempi sperimentali indicati, sono stati misurati i livelli dei carbonili proteici mediante Western blot. Questo tipo di analisi veniva effettuato dopo aver fatto reagire gli eventuali gruppi carbonilici delle proteine con dinitrofenilidrazina (DNP). La successiva formazione di dinitrofenilidrazone era quindi rilevata utilizzando un anticorpo diretto contro questa specie molecolare (Fig. 10).

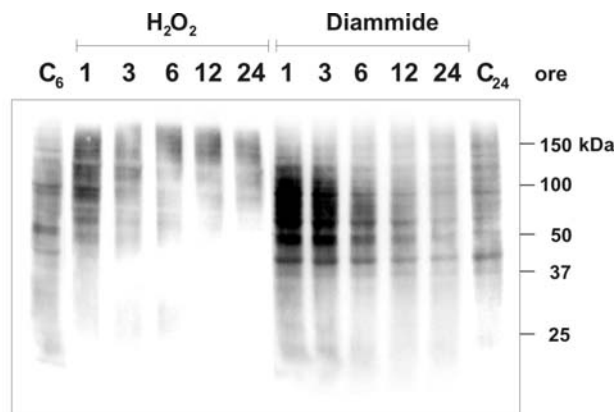


Figura 10

Analisi della carbonilazione proteica, dopo trattamento di cellule AGS con H_2O_2 e diammidie $200 \mu M$

Cellule AGS sono state trattate con diammidie $200 \mu M$ per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati $5 \mu g$ di estratto cellulare totale sono stati derivatizzati con DNP, caricati su gel di poliacrilammide al 10% e trasferiti su nitrocellulosa. L'immunocomplesso dell'anticorpo primario in grado di riconoscere i carbonili derivatizzati con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza.

L'incubazione con H_2O_2 produceva un moderato incremento dei carbonili proteici alla prima ora di recupero; tale incremento veniva prontamente

tamponato ai successivi tempi sperimentali. Il trattamento con diammidide era, invece accompagnato da un sostenuto aumento dei livelli di carbonilazione sino alle 3 h di recupero, per scendere poi ai livelli del controllo in corrispondenza dell'induzione della morte cellulare.

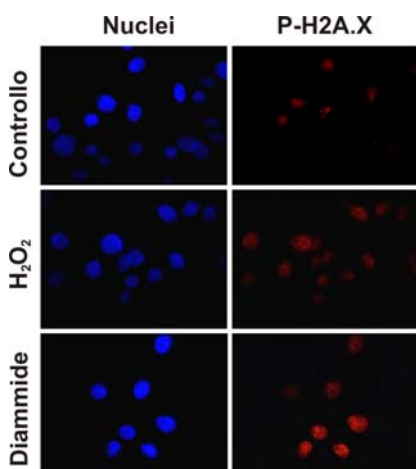


Figura 5

Analisi in microscopia a fluorescenza dei livelli di fosforilazione dell'istone H2A.X, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diammidide 200 μ M

Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammidide 200 μ M dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Dopo 1 h le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Alle 3 h di recupero cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con l'anticorpo monoclonale per l'istone H2A.X fosforilato e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza.

Il danno nucleare è stato monitorato seguendo i livelli di fosforilazione della proteina istonica H2A.X mediante microscopia a fluorescenza (Fig. 11). L'istone H2A.X viene specificamente fosforilato, in corrispondenza di rotture sulla doppia elica di DNA, a livello della ser139. La sua fosforilazione, operata da numerose chinasi, viene abitualmente utilizzata in letteratura come indice dell'avvenuto danno al DNA e si ritiene che possa rappresentare un segnale per il reclutamento di sistemi di riparo (Tanaka *et al.*, 2006). L'analisi mediante microscopia a fluorescenza dei nuclei marcati con l'anticorpo diretto contro la forma fosforilata della proteina ha messo in evidenza la massiccia fosforilazione della stessa, ulteriormente evidenziata dalla formazione di *foci* nucleari, le strutture in cui l'istone recluterebbe altre proteine importanti per il riparo, in seguito al trattamento con diammidide. Nessuna modificazione della fluorescenza, rispetto alle cellule di controllo,

veniva osservata, invece, dopo recupero da H_2O_2 . Il dato è stato poi ulteriormente confermato mediante Western blot su frazioni nucleari. A 3 h di recupero dal trattamento con diammido veniva evidenziato un aumento della banda immuno-reattiva relativa a P-H2A.X di oltre 3 volte rispetto ai controlli (Fig. 12a).

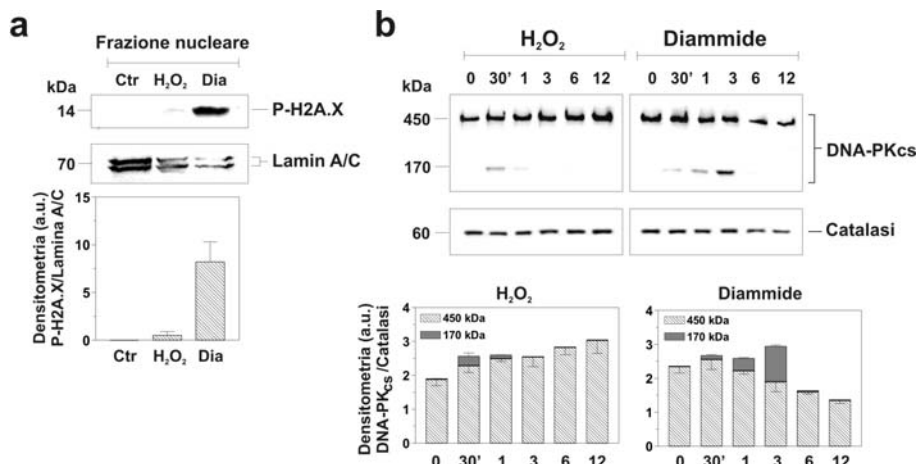


Figura 12

Analisi in Western blot dei livelli di di fosforilazione dell'istone H2A.X e di attivazione della DNA-PK, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diammido 200 μM

a: Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammido 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dei nuclei. 30 μg di estratto nucleare sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 12% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per P-H2A.X è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per la lamina A/C è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

b: Cellule AGS sono state trattate con diammido 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 5 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 6% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per la DNA-PKcs è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per la catalasi è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

Il danno nucleare è stato poi ulteriormente caratterizzato analizzando i livelli di attivazione della protein chinasi DNA-dipendente (DNA-PK). Tale

attivazione viene tradizionalmente associata ad un aumento dei livelli di espressione della subunità catalitica dell'enzima (DNA-PKcs) (Xu *et al.*, 2000). L'analisi in Western blot su lisati totali metteva in evidenza un aumento tempo-dipendente della DNA-PKcs dopo trattamento con H₂O₂ ed una riduzione della stessa dopo trattamento con diammidici (Fig. 12b). In concomitanza a queste variazioni dei livelli di espressione della DNA-PKcs, si osservava inoltre la comparsa di una banda di minor peso molecolare (~ 170 kDa), che, in letteratura, viene indicata come una banda specifica di degradazione ad opera delle caspasi (Han *et al.*, 1996). Il prodotto di degradazione era sostenuto nel tempo solo in seguito a trattamento con diammidici.

La produzione di danno ossidativo ad opera di agenti che alterano lo status tiolico è specifica in cellule AGS

La specificità di risposta in cellule AGS è stata confermata analizzando il danno ossidativo a livello proteico e nucleare in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con H₂O₂ e diammidici alla concentrazione di 100 µM per 1 h e quindi, ai tempi sperimentali indicati, sono stati misurati i livelli dei carbonili proteici mediante Western blot (Fig. 13a). Nessuna formazione di carbonili proteici era evidenziata ai diversi tempi di recupero dal trattamento con la diammidici, mentre un aumento significativo nei livelli degli stessi era osservabile sino alle 3 h di recupero con H₂O₂.

E' stata, quindi condotta un'analisi mediante microscopia a fluorescenza della fosforilazione della proteina H2A.X, che ha messo in evidenza la sostenuta comparsa di *foci* nucleari solo in seguito a recupero con H₂O₂ (Fig. 13b).

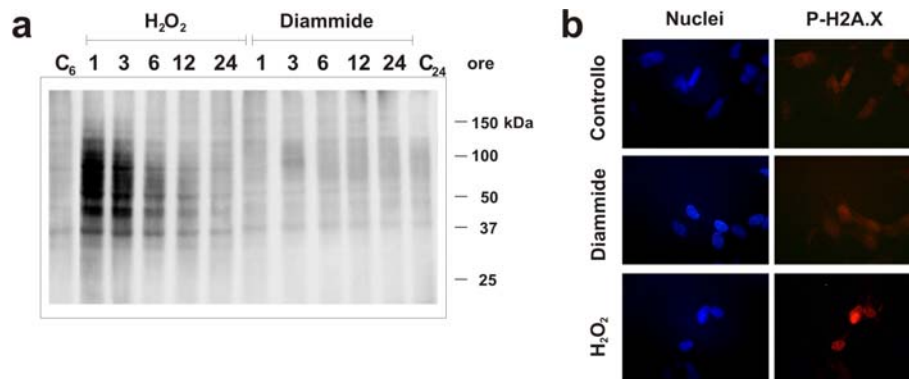


Figura 10

Analisi della carbonilazione proteica e dei livelli di fosforilazione dell'istone H2A.X, dopo trattamento di cellule SH-SY5Y con H₂O₂ e diamide 100 μM

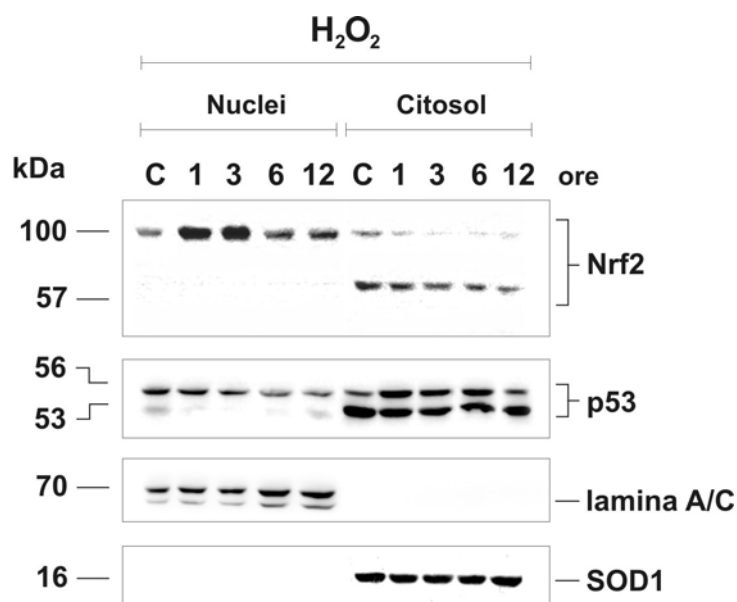
a: Cellule SH-SY5Y sono state trattate con H₂O₂ o diamide 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati 5 μg di estratto cellulare totale sono stati derivatizzati con DNP, caricati su gel di poliacrilammide al 10% e trasferiti su nitrocellulosa. L'immunocomplesso dell'anticorpo primario in grado di riconoscere i carbonili derivatizzati con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza.

b: Cellule SH-SY5Y sono state trattate con H₂O₂ o diamide 200 μM dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Dopo 1 h le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Alle 3 h di recupero cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con l' anticorpo monoclonale per l'istone H2A.X fosforilato e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza.

H₂O₂ e diammidie modulano specificamente l'attività dei fattori di trascrizione Nrf2 e p53

Alla luce dei risultati ottenuti l'attenzione è stata quindi rivolta al possibile coinvolgimento nella risposta cellulare all'H₂O₂ e alla diammidie dei fattori di trascrizione p53 e di Nrf2, la cui regolazione redox è ben caratterizzata in letteratura (Liu *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2004). Condizioni di stress ossidativo, infatti, stabilizzano p53 e garantiscono la sua attività trascrizionale sui promotori di geni in grado di innescare processi apoptotici, tra cui Bax. Nrf2 perde, invece, la sua interazione con l'inibitore fisiologico Keap-1 in condizioni di stress ossidativo e può essere in tal modo traslocato nel nucleo e attivare la trascrizione di geni coinvolti nella risposta antiossidante, tra cui l'eme-ossigenasi-1. Le cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ alla concentrazione di 200 µM per 1 h e quindi analizzate, ai tempi sperimentali di recupero indicati, per i livelli di espressione e di localizzazione nucleare di p53 e di Nrf2 (Fig. 14).

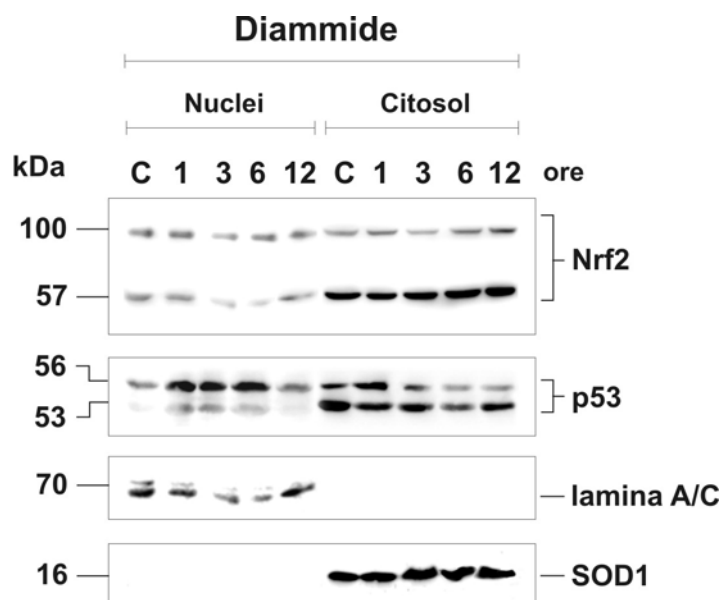
In Fig. 14 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi in Western blot condotta su frazioni nucleari e citosoliche. Nrf2 si accumulava precocemente all'interno dei nuclei in seguito al trattamento con H₂O₂. L'accumulo descritto interessava la banda con peso molecolare pari a 100 kDa, descritta in letteratura come la forma attiva del fattore di trascrizione in cui lo stesso interagisce, mediante legame covalente, con l'actina (Kang *et al.*, 2002). Nessuna traslocazione all'interno dei nuclei era, invece, osservabile per il fattore p53.

**Figura 14**

Analisi in Western blot dei livelli di p53 e Nrf2 nei nuclei, dopo trattamento di cellule AGS con H_2O_2 200 μM

Cellule AGS sono state trattate con H_2O_2 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dei nuclei. 15 μg di estratto nucleare e citosolico sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. Gli anticorpi per p53 ed Nrf2 sono stati utilizzati per riconoscere le proteine. Gli immunocomplessi con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo gli anticorpi per la lamina A/C e per la SOD1 sono stati utilizzati quali controllo del corretto caricamento e della purezza delle frazioni.

Lo stesso tipo di analisi è stato condotto anche in seguito al trattamento di cellule AGS con diammido 200 μM (Fig. 15).

**Figura 15**

Analisi in Western blot dei livelli di p53 e Nrf2 nei nuclei, dopo trattamento di cellule AGS con diammide 200 μ M

Cellule AGS sono state trattate con diammide 200 μ M per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dei nuclei. 15 μ g di estratto nucleare e citosolico sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. Gli anticorpi per p53 ed Nrf2 sono stati utilizzati per riconoscere le proteine. Gli immunocomplessi con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo gli anticorpi per la lamina A/C e per la SOD1 sono stati utilizzati quali controllo del corretto caricamento e della purezza delle frazioni.

In questo caso l'accumulo nucleare era osservabile solo per il fattore p53 e ancora una volta lo si associava alla forma di più alto peso molecolare, che probabilmente corrisponde ad una iperfosforilazione funzionale all'attivazione di p53 (Hecker *et al.*, 1996). I risultati descritti sono stati ulteriormente confermati mediante analisi in microscopia a fluorescenza: alle 3 h di recupero con H_2O_2 e diammide le cellule sono state fissate con paraformaldeide e marcate utilizzando anticorpi diretti contro Nrf2 e actina per permettere la visualizzazione della struttura citoscheletrica (Fig. 16).

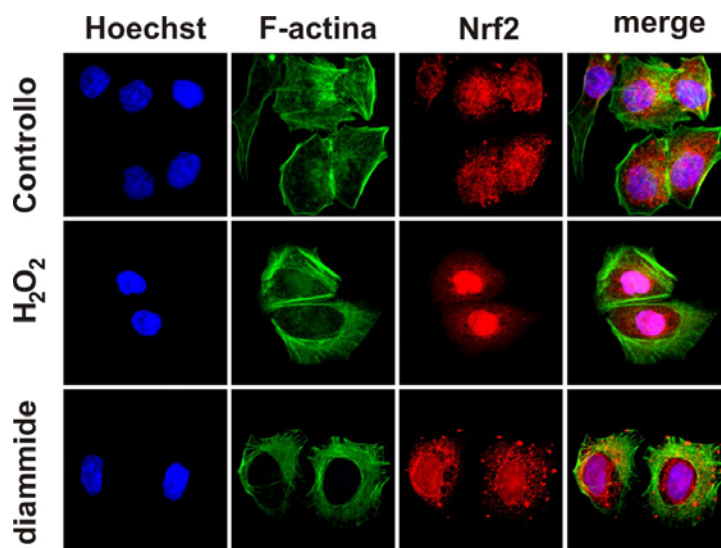


Figura 16
Analisi in microscopia a fluorescenza della traslocazione nucleare del fattore Nrf2, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diammide

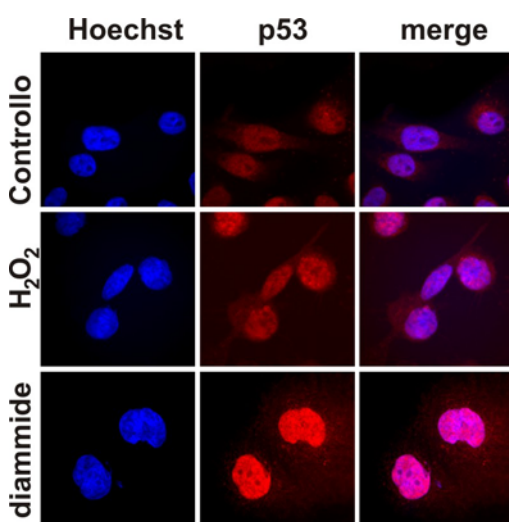
Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammide 200 μ M dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Dopo 1 h le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con gli anticorpi: monoclonale per l'F-actina (verde) e policlonale per Nrf2 (rosso) e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza

Dalle immagini riportate in Fig. 16 è possibile osservare come l'H₂O₂ fosse in grado di determinare una sostenuta mobilizzazione del fattore Nrf2 dai filamenti di actina (visualizzata mediante marcatura con un anticorpo secondario fluorescente verde) verso il nucleo e come tale rilocalizzazione fosse solo in parte osservabile al recupero con diammide. Inoltre una completa assenza di sovrapposizione tra la struttura citoscheletrica ed Nrf2 faceva seguito al trattamento con H₂O₂, mentre l'accumulo dello stesso in

strutture discrete e periferiche, a localizzazione citoscheletrica, era evidente in seguito al trattamento con diammidide.

Per quanto concerne il fattore p53, invece, le cellule sono state trattate con H₂O₂ e diammidide e dopo 3 h di recupero marcate con un anticorpo diretto contro p53, in seguito a fissazione con paraformaldeide (Fig. 17).

Figura 17
Analisi in microscopia a fluorescenza della traslocazione nucleare del fattore p53, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diammidide



Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diammidide 200 μM dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Dopo 1 h le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con l'anticorpo monoclonale per p53 (rosso) e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza

L'H₂O₂ produceva un lieve incremento della fluorescenza associata al fattore di trascrizione, mentre la diammidide induceva un sostenuto accumulo della proteina a livello nucleare. Tale conferma dei dati ottenuti nell'analisi in Western blot supportava l'ipotesi che ciascuno dei due trattamenti utilizzati potesse attivare in maniera selettiva una via di segnalazione in grado di innescare a sua volta una specifica risposta: sopravvivenza o morte cellulare per apoptosi.

Per rafforzare l'ipotesi e per dimostrare al contempo che l'accumulo a livello nucleare fosse accompagnato dall'effettiva acquisizione ad opera dei due fattori delle proprie attività trascrizionali, i livelli di espressione

dell'eme ossigenasi-1 (HO-1) e di Bax sono stati valutati mediante analisi in Western blot (Fig.18).

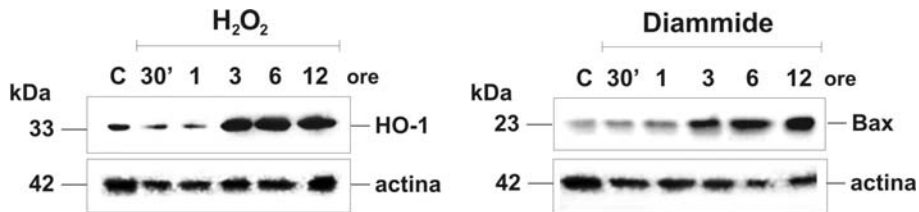


Figura 18

Analisi in Western blot di livelli dell'HO-1, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e di Bax, dopo trattamento di cellule AGS con diamide 200 μM

a: Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 30 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per l'HO-1 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

b: Cellule AGS sono state trattate con diamide 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 15 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per Bax è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

Come è possibile valutare in Fig. 18 i livelli delle due proteine aumentano alle 3 h di trattamento. In particolare l'HO-1, uno dei target meglio caratterizzati dell'attività trascrizionale di Nrf2, veniva attivata in risposta al trattamento con H₂O₂, mentre Bax, che è trascritto ad opera di p53, si overesprimeva in seguito al solo trattamento con diamide, a conferma dell'effettiva operatività dei due fattori in esame.

L'inibizione di Nrf2 e di p53 reverte la risposta cellulare

Per valutare il ruolo di p53 nell'induzione della morte cellulare per apoptosi, cellule AGS sono state transfettate con una sequenza siRNA (small interference RNA) diretta contro la proteina. L'efficacia della sequenza nella riduzione dei livelli di espressione di p53 è stata valutata analizzando, a differenti tempi dalla transfezione, i livelli della proteina. Inoltre la specificità dell'effetto osservato è stata valutata mediante confronto di tali livelli con quelli di cellule transfettate con una sequenza di controllo aspecifica Scr (scramble)

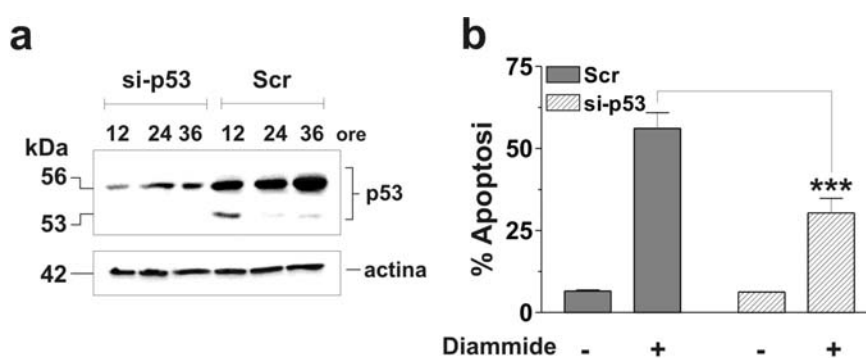


Figura 19

Analisi in Western blot dell'efficienza dell'siRNA per p53 e della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS con diamide 200 μM in condizioni di mancata attivazione del fattore p53

a: Cellule AGS sono state transfettate con una sequenza di siRNA specifica per p53 (sip53) ed una di controllo (SCR). Ai tempi indicati dalla transfezione le cellule sono state lisate e 15 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% contenente SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per p53 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

b: Cellule AGS sono state transfettate con la sequenza sip53 ed una sequenza di controllo SCR. Dopo 12 h dalla transfezione le cellule sono state trattate con diamide 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 di n=5 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDL. ***, p<0.001 rispetto al controllo.

In Fig. 19a è possibile osservare l'analisi in Western blot dei livelli di espressione di p53. Essi erano notevolmente ridotti alle 12 h dalla transfezione rispetto a cellule di controllo, per cui questo tempo sperimentale è stato scelto per analizzare gli effetti del trattamento con diammidio quando l'attivazione di p53 era inibita (Fig.19b).

L'analisi citofluorimetrica delle cellule, previa marcatura con ioduro di propidio, è stata utilizzata per valutare la percentuale di cellule apoptotiche dopo 24 h di recupero dal trattamento con diammidio. Tale percentuale risultava ridotta di circa il 35% in cellule transfettate con la sequenza specifica per p53 rispetto a cellule di controllo (Fig. 19b).

Un approccio analogo è stato utilizzato anche per valutare il ruolo di Nrf2 nella risposta di sopravvivenza.

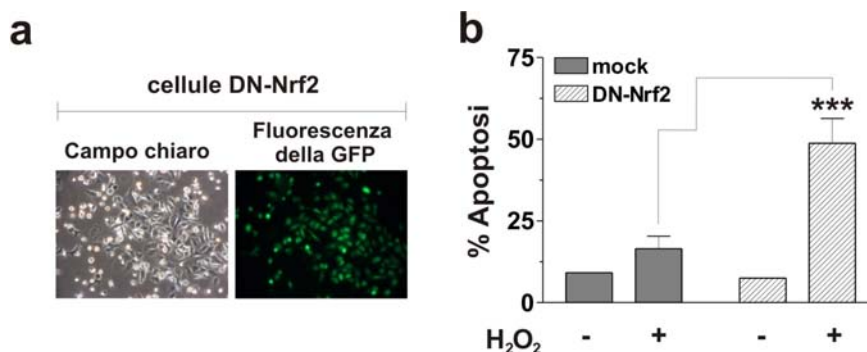


Figura 20

Analisi in fluorescenza dell'efficienza di transfezione con DN-Nrf2 e della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ 200 μM in condizioni di mancata attivazione del fattore Nrf2

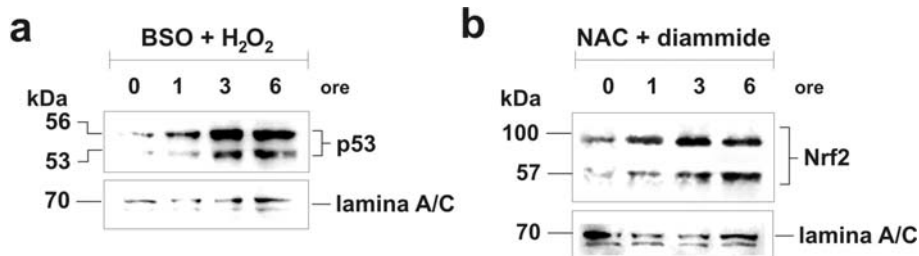
a: Cellule AGS sono state transfettate con il plasmide che codifica per la forma DN del fattore NRF2. Dopo 48 h dalla transfezione le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza per valutare efficienza di transfezione.

b: Cellule AGS sono state transfettate con il vettore vuoto (cellule mock) e con il vettore che porta clonata la proteina DN-Nrf2. Dopo 48 h dalla transfezione le cellule sono state trattate con H₂O₂ 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h. Le cellule presenti nel terreno e quelle attaccate, previa tripsinizzazione, sono state colorate con Trypan blue per effettuare conte dirette al microscopio ottico. Gli istogrammi riportano i risultati ottenuti in n=3 esperimenti con ***, p < 0.001 rispetto al controllo.

In questo caso le cellule sono state transfettate transientemente con un vettore che codifica la forma dominante negativa del fattore di trascrizione DN-Nrf2 (Alam et al., 1999). Questa forma mutata della proteina è deleta all'N-terminale e pur essendo in grado di legare le specifiche regioni di DNA di Nrf2, competendo in tal modo con la proteina endogena, manca dei siti di interazione con i coattivatori della trascrizione e non è, pertanto, in grado di dirigere la trascrizione dei geni a valle.

L'efficienza della transfezione era valutata mediante microscopia a fluorescenza, in virtù della fusione con un epitopo fluorescente verde (Fig. 20a). Dopo 48 h dalla transfezione le cellule sono state trattate con H₂O₂ e la percentuale di apoptosi è stata valutata mediante analisi citoflorimetrica delle cellule marcate con ioduro di propidio alle 24 h di recupero (Fig. 20b). La percentuale delle cellule apoptiche, era in queste condizioni di inibizione dell'attività trascrizionale di Nrf2, incrementata di circa 3 volte rispetto alle cellule di controllo (mock) transfettate con il vettore privo della proteina di interesse.

Per valutare il ruolo dei livelli intracellulari di GSH nell'attivazione selettiva dei due fattori di trascrizione, cellule AGS sono state pre-incubate con BSO 1 mM per 12 h e quindi trattate con H₂O₂. Ai tempi sperimentali indicati i livelli nucleari di p53 sono stati analizzati mediante Western blot (Fig. 21a). In Fig. 21a è possibile osservare come, in condizioni di deplezione di GSH, p53 era rapidamente traslocato all'interno del nucleo in risposta al trattamento con H₂O₂. Viceversa l'arricchimento del pool tiolico intracellulare, ottenuto mediante pre-incubazione delle cellule con NAC 5 mM correlava con la traslocazione nucleare di Nrf2 in seguito a trattamento con diammidio, ai tempi sperimentali indicati (Fig. 21b).

**Figura 21**

Analisi in Western blot dei livelli di p53 e di Nrf2 nei nuclei, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ in condizioni di deplezione del GSH e con diamide 200 μM in condizioni di arricchimento del pool tiolico intracellulare, rispettivamente

a: Cellule AGS sono state incubate con BSO 1 mM per 12 h e quindi trattate con H₂O₂ 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dei nuclei. 15 μg di estratto nucleare sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per p53 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per la lamina A/C è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

b: Cellule AGS sono state incubate con NAC 5 mM per 1 h e quindi trattate con diamide 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dei nuclei. 15 μg di estratto nucleare sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenete SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per Nrf2 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per la lamina A/C è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

L'ossidazione della Trx1 correla con la fosforilazione di p53 mediata da p38^{MAPK}

I risultati ottenuti permettevano di ipotizzare il coinvolgimento, nelle opposte risposte cellulari al trattamento con agenti pro-ossidanti, di un fattore molecolare in grado di sentire variazioni dello stato redox intracellulare. L'attenzione è stata pertanto rivolta alla tioredossina-1 (Trx-1), in quanto uno dei determinanti dello stato redox intracellulare, perché in grado di reagire con agenti che ossidano i tioli e perché in grado di partecipare all'induzione della morte cellulare per apoptosi mediata dalle MAP-chinasi. Abbiamo monitorato lo stato redox della proteina mediante Urea-PAGE, associata ad analisi in Western blot. Questa metodica prevede il trattamento dei lisati cellulari con acido iodoacetico al fine di introdurre cariche negative laddove siano presenti cisteine in forma ridotta. Viene, quindi, effettuata un'incubazione in presenza di riducente, fatta seguire dalla reazione con iodoacetammide, un agente alchilante privo di carica, in grado di legarsi irreversibilmente alle cisteine ora ridotte. In tal modo è possibile valutare la proporzione della proteina di interesse presente in forma ridotta rispetto a quella in forma ossidata, sulla base della velocità di migrazione nel campo elettroforetico. Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ e diammidio 200 μM e, ai tempi sperimentali indicati, i campioni sono stati preparati per la successiva analisi (Fig. 22).

In Fig. 22 è possibile osservare la completa assenza di ossidazione della Trx-1 in seguito a trattamento con H₂O₂, il quale si associava ad una semplice over-espressione della proteina nella sua forma ridotta a partire dalle 6 h di recupero. La comparsa della banda relativa alla forma ossidata della stessa si accompagnava, invece, al trattamento con diammidio, con un incremento di circa una volta del rapporto forma ridotta/forma ossidata.

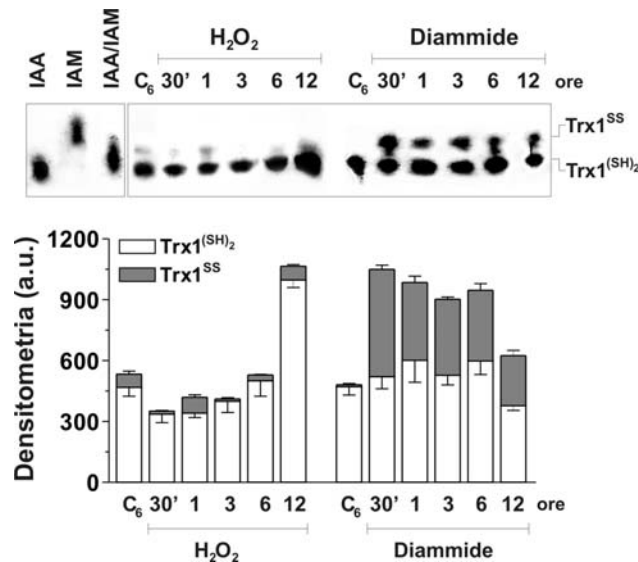


Figura 22
Analisi in Urea PAGE dello stato redox della Trx1, dopo trattamento di cellule AGS con H₂O₂ e diamide 200 μM

Cellule AGS sono state trattate con H₂O₂ o diamide 200 mM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono lisate in urea buffer contenente acido iodoacetico (IAA) per la marcatura dei tioli ridotti, sottoposte a riduzione in presenza di DTT e quindi trattate con iodoacetammide (IAM) per la marcatura dei tioli ossidati. I campioni così preparati sono stati caricati su gel di poliaccrilammide contenente urea 8M. L'anticorpo per la Trx1 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo standard di migrazione sono stati ottenuti trattando le cellule in presenza di solo IAA, di sola IAM o di un mix dei due.

Poiché la Trx-1 svolge la sua funzione regolatoria nell'induzione dell'apoptosi attraverso il legame inibitorio con la chinasi ASK1, coinvolta nella fosforilazione di JNK e di p38^{MAPK}, abbiamo deciso di verificare il coinvolgimento delle due chinasi nell'induzione della morte in seguito a trattamento con diamide (Fig. 23).

In Fig. 23a sono riportati i risultati ottenuti in seguito al trattamento delle cellule AGS con diamide 200 μM per 1 h. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state utilizzate per verificare i livelli di attivazione delle due chinasi in esame. A tal fine sono stati impiegati anticorpi diretti contro la

forma basale e quella fosfo-attiva delle proteine in esame, per effettuare un'analisi in Western blot dell'attivazione delle stesse. I livelli della forma fosforilata di $p38^{MAPK}$ aumentavano rapidamente a partire dai 30 min di recupero in seguito a trattamento con diammidio, mentre nessuna variazione era osservata per la forma basale della proteina, i cui livelli si mantenevano costanti a tutti i tempi sperimentali. Viceversa nessuna attivazione era associata alla chinasi JNK per la quale sia i valori basali, sia quelli della forma attiva si mantenevano stabili nel corso dell'esperimento (Fig. 23a).

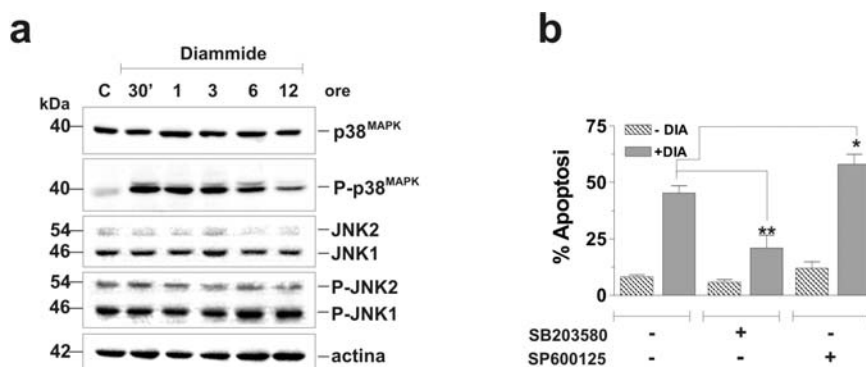


Figura 23

Analisi in Western blot di livelli di attivazione delle chinasi JNK e $p38^{MAPK}$, e della vitalità cellulare dopo inibizione di tali chinasi e trattamento di cellule AGS con diammidio 200 μM

a: Cellule AGS sono state trattate con diammidio 200 μM per 1 h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 30 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% contenente SDS e trasferiti su nitrocellulosa. Gli anticorpi per JNK, P-JNK, $p38^{MAPK}$ e P- $p38^{MAPK}$ sono stati utilizzati per riconoscere le proteine. Gli immunocomplessi con gli anticorpi secondari specifici coniugati con perossidasi sono stati rilevati in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

b: Cellule AGS sono state incubate con SB203580 e SP600125 per 1 h e quindi trattate con diammidio 200 μM per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h, staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 di n=5 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Il contributo relativo delle due chinasi in esame nei processi di induzione di morte è stato valutato mediante l'impiego di specifici inibitori chimici. Cellule AGS sono state pre-incubate con gli inibitori della chinasi p38^{MAPK} (SB203580) o della chinasi JNK (SP600125) per 1 h. Quindi le cellule sono state trattate per 1 h con diammidine 200 μ M e mantenute in coltura per ulteriori 24 h in presenza di uno dei due inibitori. La sola inibizione di p38^{MAPK} era associata ad un recupero dalla morte per apoptosi pari a circa il 50%, come riscontrato nell'analisi citofluorimetrica effettuata previa marcatura dei nuclei con ioduro di propidio (Fig. 23b).

Per determinare l'esistenza di un eventuale interazione funzionale tra p38^{MAPK} e p53 nell'induzione della morte per apoptosi, cellule AGS sono state trattate con diammidine in presenza del suo inibitore specifico. L'attivazione delle due proteine è stata analizzata ad 1 h di recupero in microscopia a fluorescenza dopo fissazione delle cellule e marcatura con anticorpi specifici diretti contro P-p38^{MAPK} e p53 (Fig. 24).

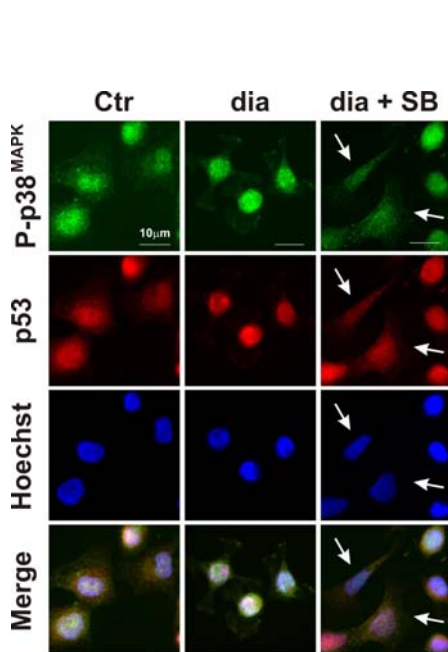


Figura 24

Analisi in microscopia a fluorescenza dei livelli di fosforilazione della chinasi p38^{MAPK} e di attivazione di p53, dopo trattamento di cellule AGS con diammidine 200 μ in presenza dell'inibitore SB203580

Cellule AGS Cellule AGS sono state incubate con SB203580 per 1 h e quindi trattate con diammidine 200 μ M per 1 h dopo 24 h dal piastramento su vetrini sterili. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ad 1h di recupero cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con l'anticorpo monoclonale per p53 (rosso) e policlonale per P-p38^{MAPK} (verde) e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza.

Come atteso p38^{MAPK} e p53 erano attivati precocemente nel trattamento con diammidato e l'attivazione di p38^{MAPK} veniva inibita in presenza del suo inibitore farmacologico. L'inibizione di tale attivazione, inoltre, era fortemente correlata ad una riduzione nei livelli di attivazione e accumulo nucleare del fattore p53.

Questi risultati sono stati successivamente confermati dall'analisi in Western blot dei livelli di attivazione di p53 in seguito al trattamento con diammidato, in presenza dell'inibitore chimico di p38^{MAPK}, a supporto dell'effettiva esistenza di un dialogo funzionale fra le due proteine nella risposta di morte al trattamento con diammidato (Fig. 25).

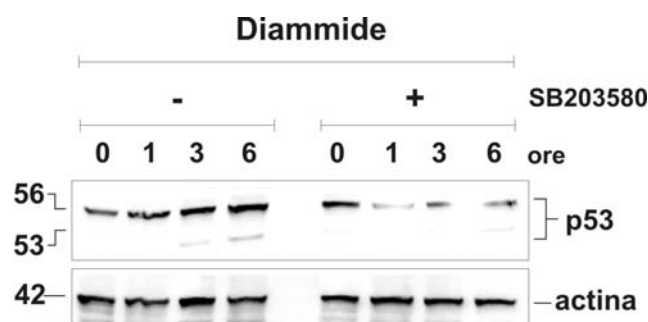


Figura 25

Analisi in Western blot di livelli di attivazione di p53, dopo trattamento di cellule AGS con diammidato 200 μM in presenza dell'inibitore SB203580

Cellule AGS Cellule AGS sono state incubate con SB203580 per 1 h e quindi trattate con diammidato 200 μM per 1h, lavate con terreno fresco e mantenute in coltura. Ai tempi sperimentali indicati le cellule sono state lisate e 15 μg di estratto cellulare totale sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 10% contenente SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per p53 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con l'anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza. In parallelo l'anticorpo per l'actina è stato utilizzato quale controllo del corretto caricamento.

La Trx1 è il discriminante molecolare alla base della risposta allo stress ossidativo tiolico

Per caratterizzare ulteriormente il ruolo della Trx1 nella risposta cellulare al trattamento con la diammidio, la proteina è stata clonata nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3. Cellule AGS sono state utilizzate a 24 h dal piastramento per estrarre l'RNA totale. Dopo quantificazione spettrofotometrica e valutazione dell'integrità dello stesso mediante elettroforesi su gel d'agarosio RNasi *free* (Fig. 26a), 1 µg di RNA totale è stato utilizzato per effettuare una reazione di RT-PCR. A tal fine sono stati utilizzati primers di due tipi: oligo dT per l'amplificazione dei messaggeri a partire dalle code di poliA che li caratterizzano ed esa-primers, combinazioni casuali di oligonucleotidi per l'appaiamento random e successiva retro-trascrizione degli RNA messaggeri. Le due reazioni di retrotrascrizione sono state condotte in parallelo e al termine delle stesse la medesima quantità del mix di reazione è stato impiegato per effettuare l'amplificazione del gene per la Trx1, utilizzando primers specifici (Fig. 26b).

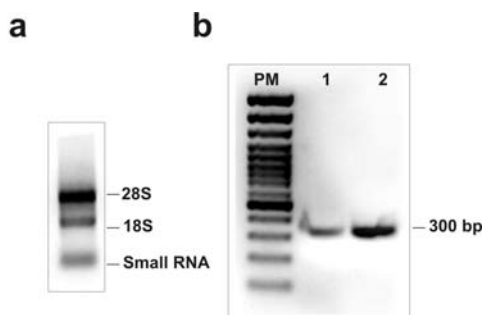


Figura 26

Estrazione dell'RNA totale ed RT-PCR del gene per la Trx1

a: Cellule AGS sono state utilizzate, dopo 24 h dal piastramento, per l'estrazione dell'RNA totale.

b: 1 µg di RNA totale è stato utilizzato per effettuare due reazioni di RT-PCR:

1. in presenza di primers oligo dT

2. in presenza di esa-primers

L'efficienza della reazione è stata valutata dopo caricamento su gel d'agarosio al 2%, previa marcatura con bromuro d'etidio.

L'efficienza e la specificità di reazione sono state valutate su gel d'agarosio, che ha messo in luce l'effettiva amplificazione del trascritto di interesse, seppure con efficienza diversa nei due pool di reazione. Il gene di interesse è stato quindi quantificato ed utilizzato in una reazione di ligasi con il plasmide pcDNA3.

Completato il procedimento di clonaggio della proteina di interesse, il plasmide ottenuto è stato utilizzato, dopo amplificazione, per effettuare una mutagenesi sito-diretta di una delle due cisteine del sito attivo. La cisteina di interesse, cys32, è stata mutata in serina utilizzando primers che portavano una mutazione puntiforme in grado di determinare la codifica del nuovo amminoacido. La scelta di mutare il residuo di cisteina in serina è stato motivato da diverse ragioni:

1. la prima è associata al fatto che i due amminoacidi sono codificati da triplette che differiscono in una sola base e quindi il processo di mutagenesi consta nella semplice introduzione di una mutazione puntiforme.
2. la cisteina e la serina sono amminoacidi strutturalmente simili, per cui la sostituzione dell'uno con l'altro non dovrebbe associarsi a variazioni nella struttura tridimensionale della proteina.
3. la serina non ha le proprietà chimiche della cisteina e non può prender parte a reazioni di ossido-riduzione.
4. il mutante in una delle due cisteine del sito attivo della Trx1 sembra avere la proprietà di associarsi in maniera irreversibile alla chinasi ASK1, bloccando di fatto la via di segnalazione redox che dalla Trx1 convoglia stimoli in grado di originare stress ossidativo alle MAP chinasi effettrici capaci di innescare morte cellulare per apoptosi, tra cui p38^{MAPK}.

Il protocollo utilizzato prevedeva una sequenza di più passaggi schematizzati in Fig. 27a. Dopo aver effettuato l'amplificazione di due diverse quantità di plasmide pcDNA3 recante la Trx1, utilizzando i primers che portavano la mutazione, i prodotti di reazione sono stati caricati su gel d'agarosio (Fig. 27b). La corsa elettroforetica metteva in evidenza la presenza di due bande, una relativa al DNA parentale ed una relativa al prodotto di PCR, con migrazione elettroforetica minore, in quanto non ligato. Successivamente il mix di reazione così ottenuto è stato sottoposto a digestione ad opera dell'enzima di restrizione DnpI, che ha specificità per il DNA metilato e che, quindi, è in grado di digerire il solo DNA parentale, ma non il prodotto di PCR (Fig. 27a). Da ultimo il plasmide, recante la mutazione C32S, è stato amplificato e la presenza effettiva della mutazione è stata valutata mediante sequenziamento.

I plasmidi così ottenuti, sono stati utilizzati in esperimenti di transfezione transiente. Cellule AGS sono state transfettate con il plasmide codificante per la proteina Trx1 wilde type (Trx1wt) e la sua forma mutata (Trx1C32S). Dopo 24 h dalla transfezione le cellule sono state trattate con diammidie e la percentuale di apoptosi è stata valutata mediante analisi citoflorimetrica delle cellule marcate con ioduro di propodio alle 24 h di recupero (Fig 28).

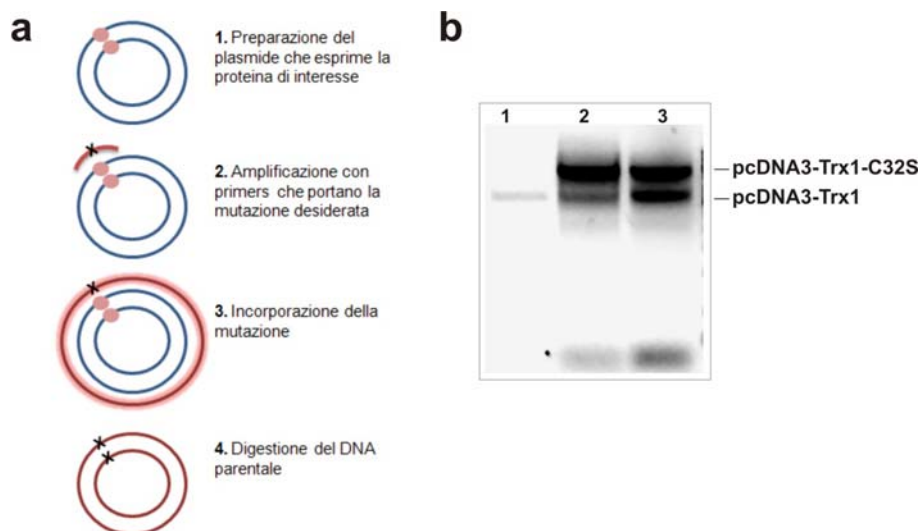


Figura 27
Mutagenesi sito-diretta del residuo cisteina 32 della Trx1 in serina

a: Schema che illustra i diversi passaggi utilizzati per mutaganizzare la cys32 del gene per la Trx1 in serina.

b: L'efficienza della reazione è stata valutata dopo caricamento su gel d'agarosio all' 1%, previa marcatura con bromuro d'etidio:

1.pcDNA3

2.reazione di amplificazione condotta utilizzando 25 ng di plasmide pcDNA3

3.reazione di amplificazione condotta utilizzando 50 ng di plasmide pcDNA3

In entrambi i casi era osservata una forte diminuzione della percentuale di cellule apoptotiche, più marcata nel mutante Trx1C32S. Il risultato confermava il ruolo della Trx1 nella risposta cellulare al trattamento con diammidici sia in quanto proteina in grado di reagire direttamente con questo ossidante dei tioli, sia in quanto coinvolta nella via di segnalazione innescata in risposta alla somministrazione della diammidici. In particolare la maggiore protezione osservata nel singolo mutante lasciava ipotizzare una cooperatività dei due effetti poiché questa forma della Trx1 conserva comunque almeno una delle cinque cisteine della proteina in grado di prender parte virtualmente a reazioni di ossidazione ad opera della diammidici (Fig. 28).

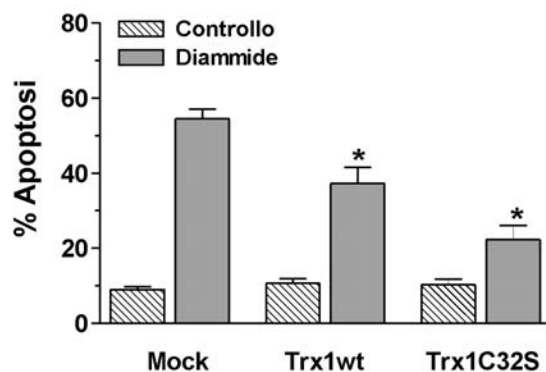


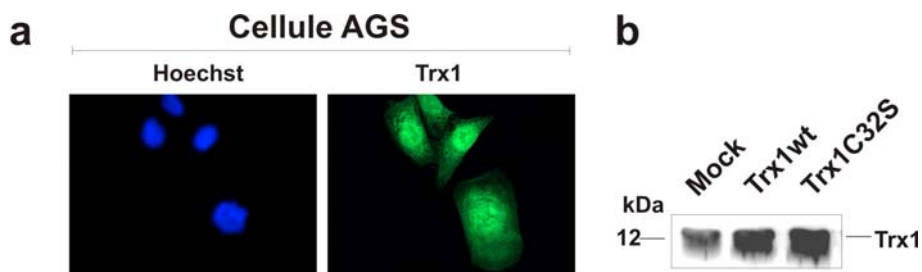
Figura 28

Analisi della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS con diammide 200 μ M in seguito ad overespressione della Trx1wt o della Trx1C32S

Cellule AGS sono state transfettate con il plasmide che codifica per la Trx1wt e per la Trx1C32S. Dopo 24 h dalla transfezione le cellule sono state trattate con diammide 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h. Le cellule sono state quindi staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 di n=3 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. *, p<0.05 rispetto al controllo.

Contemporaneamente cellule esprimenti stabilmente le due proteine sono state selezionate mediante passaggi in coltura in presenza di diverse concentrazioni dell'antibiotico eucariotico G418.

Al termine della selezione è stata valutata l'effettiva espressione della Trx1wt e del mutante Trx1C32S. In particolare in Fig. 29a sono state riportate delle immagini relative ai livelli di espressione basale della Trx1 nelle cellule AGS, così come evidenziabili in microscopia a fluorescenza dopo marcatura con un anticorpo specifico per la Trx1. Questa linea cellulare presentava alti livelli basali di espressione della proteina. Tali livelli erano notevolmente incrementati dopo transfezione e selezione di linee stabili esprimenti la Trx1wt e la Trx1C32S rispetto a cellule transfettate con il solo vettore pcDNA3 (cellule Mock), come evidenziato dall'analisi in Western blot (Fig. 29b).

**Figura 29**

Analisi in microscopia a fluorescenza dei livelli di espressione della Trx1 in cellule AGS e dell'effettiva overespressione della proteina dopo selezione di cellule AGS stabilmente transfettate

a: Cellule AGS sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide, lavate con PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton X-100. Le cellule così preparate sono state utilizzate per la marcatura con l'anticorpo policlonale per la Trx1 (verde) e i nuclei sono stati al contempo marcati con Hoechst. I vetrini così preparati sono stati, quindi, montati su portaoggetti interponendo una goccia di PBS-glicerolo e analizzati in fluorescenza.

b: Cellule Mock e stabilmente transfettate con i vettori recanti la Trx1wt e la Trx1C32S sono state lisate. 30 μ g di estratto cellulare sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 13% contenente SDS e trasferiti su nitrocellulosa. L'anticorpo per la Trx1 è stato utilizzato per riconoscere la proteina. L'immunocomplesso con l'anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi è stato rilevato in chemiluminescenza.

Le tre linee cellulari così ottenute sono state trattate con diammidio 200 μ M e la percentuale di apoptosi è stata valutata in citofluorimetria dopo marcatura dei nuclei con ioduro di propidio.

I risultati ottenuti confermavano il parziale recupero dalla morte delle cellule overesprimenti ambedue le forme della Trx1 rispetto a cellule mock (Fig. 30), rafforzando ulteriormente l'idea di un coinvolgimento diretto della proteina nella risposta al trattamento con la diammidio e mettendo in luce il suo ruolo come target molecolare di nuove possibili strategie chemioterapiche.

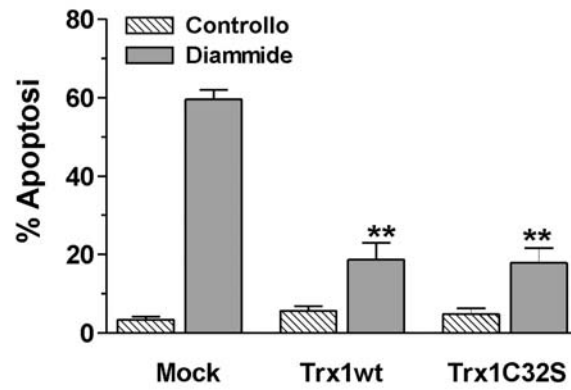


Figura 30

Analisi della vitalità cellulare, dopo trattamento di cellule AGS stabilmente transfettate con diamide 200 μ M in seguito ad overespressione della Trx1wt o della Trx1C32S

Cellule Mock o overesprimenti la Trx1wt e la Trx1C32S sono state trattate con diamide 200 μ M per 1 h. Successivamente le cellule sono state lavate con terreno fresco e mantenute in coltura per 24 h. Le cellule sono state quindi staccate con tripsina e marcate con una soluzione di ioduro di propidio con Triton X-100 allo 0.1 %. La percentuale di cellule in fase sub-G1 di n=3 esperimenti è stata valutata utilizzando la versione 2.8 del software WinMDI. **, p<0.01 rispetto al controllo.

CONCLUSIONI

Il fenomeno della resistenza alle convenzionali strategie chemioterapiche, basate sull'impiego di molecole con attività pro-ossidante, si osserva in numerosi istotipi cellulari, tra cui i carcinomi gastrici e dell'intestino. Si tratta di un processo innescato dall'espressione di enzimi anti-ossidanti e coinvolti nella detossificazione, che permettono l'attivazione selettiva di vie di sopravvivenza in grado di rispondere positivamente all'azione proapoptotica di tali trattamenti. L'isoforma gastro-intestinale della glutatione perossidasi (GI-GPx), ad esempio, è stata identificata come diretta artefice dei processi di resistenza nei due istotipi citati in precedenza (Banning *et al.*, 2005; Filomeni *et al.*, 2005b). In questo lavoro sperimentale è stata osservata, in cellule umane di adenocarcinoma gastrico AGS, una marcata resistenza al trattamento con induttori di ROS, quali l' H_2O_2 , il sistema xantina/xantina ossidasi e il paraquat, anche quando utilizzati a concentrazioni dell'ordine del mM. Abbiamo dimostrato che tale resistenza può essere aggirata se si tratta la linea cellulare in esame provocando stress ossidativo con agenti che agiscono a livello dei tioli intracellulari, quali il ditionitrobenzoato e la diammidio, la quale in maniera particolare è in grado di indurre morte cellulare per apoptosi attraverso la via mitocondriale.

Le cellule AGS sono state precedentemente caratterizzate per la loro resistenza al trattamento con il disolfuro di diallile, un composto della frazione liposolubile dell'estratto d'aglio, il quale è in grado di indurre stress ossidativo attraverso un diretto incremento dei ROS intracellulari. La resistenza a tale trattamento era correlata all'attività della GPx, ai sistemi antiossidanti correlati al glutatione (GSH), nonché alla propensione, che questa linea cellulare mostrava in maniera del tutto caratteristica, al fenomeno di S-glutatioilazione, come processo in grado di proteggere la struttura e la funzionalità proteica da ossidazioni irreversibili. Il trattamento con H_2O_2 era in grado di indurre un transiente incremento nei livelli di GSH e di disolfuri misti (GS-R), senza alcun effetto significativo sul pool di glutatione ossidato (GSSG). Viceversa il trattamento con diammidio si accompagnava ad un drammatico aumento del GSSG, con una deplezione completa dei livelli di GS-R. Inoltre dopo il trattamento con diammidio si osservava un precoce incremento del GSH, che indicava l'innescamento della sua neo-sintesi o, più probabilmente, il rilascio della molecola dalla frazione proteica, cui esso è associato, in misura significativa e ben dosabile, anche in condizioni basali. Questi risultati, in combinazione con i dati relativi all'attività della GPx, lasciavano ipotizzare per il GSH un duplice ruolo: di indiretta partecipazione alla detossificazione dell' H_2O_2 , in quanto cofattore dell'enzima GPx, e diretto attraverso la reazione di S-glutatioilazione con i

tioli proteici. La diammidio, invece, permetteva il rilascio della frazione di GSH associato alle proteine, mediando in tal modo reazioni di ossidazione ulteriore ed irreversibile a livello di proteine particolarmente sensibili a tali processi. Tra di esse, la DNA-PK rappresenta un esempio recentemente caratterizzato; la diammidio sembra essere in grado di destabilizzare il complesso dell'enzima con il DNA, compromettendo, in tal modo, l'assemblaggio dei sistemi di riparo (Andrews *et al.*, 2006).

In linea con tali evidenze, nel nostro sistema sperimentale, il trattamento con la diammidio si accompagnava ad un esteso danno alla doppia elica di DNA.

Un altro esempio ben caratterizzato di proteine in grado di essere regolate dallo stato redox di tioli sensibili al processo di ossidazione è la tioredossina 1 (Trx1): in condizioni di stress ossidativo le cisteine vicinali del sito attivo vanno incontro alla formazione di un ponte disolfuro, mediando il rilascio e la successiva attivazione della chinasi ASK1 (Apoptosis Signalling-related Kinase-1). Questo evento è seguito dall'induzione della via apoptotica mediata dalla MAP chinasi p38^{MAPK} con il successivo innesco della via mitocondriale (Saitoh *et al.*, 1998; Filomeni *et al.*, 2003b).

I nostri risultati supportano l'attivazione, ad opera della diammidio, della via di segnalazione regolata da Trx1/p38^{MAPK}, anche se ulteriori studi sono necessari alla piena caratterizzazione della sequenza di eventi che coinvolgono la chinasi a monte ASK1, quale induttore primario della cascata fosforilativa che conduce alla morte cellulare, in risposta al trattamento con la diammidio. In questo lavoro è stato, invece, ben delineato il ruolo di p38^{MAPK} nell'attivazione del fattore p53, l'inibizione farmacologica della chinasi correlava, infatti, con la ridotta attivazione di p53 e con un parziale recupero dalla morte indotta in cellule AGS dalla diammidio. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura circa il ruolo di p38^{MAPK} nell'attivazione di p53 in risposta a numerosi stimoli, quali il danno al DNA indotto da stress meccanici (Mayr *et al.*, 2002), l'infezione del virus dell'HIV (Perfettini *et al.*, 2005; Perfettini *et al.*, 2008), il trattamento con la 6-idrossidopamina (Gomez-Lazaro *et al.*, 2008) e l'esposizione agli UV (Hildesheim *et al.*, 2002). Inoltre è stata osservata un'attivazione specifica di p38^{MAPK} in risposta al trattamento con diammidio, che ben correla con l'ossidazione della Trx1 che implicherebbe, in seguito a stress ossidativo provocato da agenti in grado di ossidare i sulfidrilici intracellulari, l'innesco dell'evento apoptotico, attraverso la via p38^{MAPK}/p53.

Nrf2 è un altro dei fattori di trascrizione redox sensibili meglio caratterizzati; come p53 è attivato in risposta a stimoli di natura pro-

ossidante ed è in grado di innescare, a valle di essi, risposte di sopravvivenza.

In questo lavoro è stata osservata un'attivazione selettiva dei due fattori di trascrizione, con Nrf2 coinvolto nei processi di sopravvivenza e/o resistenza e p53 nell'induzione della morte cellulare per apoptosi. L'osservazione che Nrf2 è in grado di traslocare precocemente nel nucleo di cellule AGS trattate con produttori di ROS quali l' H_2O_2 e l'opposto comportamento per p53 lasciavano ipotizzare una responsività selettiva dei due fattori ed una selettività di attivazione ad opera di molecole che agiscono inducendo stress ossidativo secondo modalità diverse.

I risultati presentati confermano l'opposto ruolo giocato da Nrf2 e p53 e forniscono dati innovativi per la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella risposta cellulare all stress ossidativo. In particolare la riduzione dei livelli di GSH mediante incubazione con l'inibitore specifico della sua neo-sintesi, la butionina sulfossimina (BSO), è in grado di innescare l'attivazione di p53 e la risposta di morte che ne consegue quando le cellule AGS sono trattate con H_2O_2 . Per contro, l'arricchimento del pool sulfidrilico intracellulare, mediante pre-incubazione con N-acetilcisteina (NAC), produceva l'attivazione di Nrf2 e meccanismi di sopravvivenza in seguito al trattamento con diammidici. Tale antitesi nella risposta a stimoli pro-ossidanti dimostrava l'esistenza di una specificità di attivazione di vie selettive sulla base delle diverse tipologie di stress ossidativo, ma permetteva anche di ipotizzare una correlazione diretta tra l'intensità dello stimolo applicato e l'innescamento di tali vie di segnalazione. Benchè, infatti, H_2O_2 e diammidici abbiano meccanismi di reazione completamente diversi, hanno, entrambi, la potenzialità di originare danno alle strutture biologiche, come dimostrato dalla capacità manifestata anche dall' H_2O_2 di determinare danno ossidativo a carico del DNA e delle proteine, seppur in proporzione molto minore rispetto alla diammidici.

I dati presentati in questo lavoro di tesi, dimostrano, pertanto, che resistenza e sensibilità allo stress ossidativo non solamente dipendono dallo specifico corredo anti-ossidante di cui è provvista la cellula, ma che l'attivazione iniziale di componenti redox sensibili delle vie di segnalazione possono influenzare profondamente la risposta cellulare definitiva.

BIBLIOGRAFIA

- Adams J.M. and Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. In Apoptosis – special section. *Science*. **281**:1322-1326.
- Adler V., Yin Z., Tew K.D., and Ronai Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. **18**:6104-6111.
- Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M., and Cook J.L. (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 26071-26078.
- Andrews B.J., Lehman J.A., and Turchi J.J. (2006) Kinetic analysis of the Ku-DNA binding activity reveals a redox-dependent alteration in protein structure that stimulates dissociation of the Ku-DNA complex. *Journal of Biological Chemistry*. **281**: 13596-13603.
- Aoshima H., Satoh T., Sakai N., Yamada M., Enokido Y., Ikeuchi T., and Hatanaka H. (1997) Generation of free radicals during lipid hydroperoxide-triggered apoptosis in PC12h cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1345**:35-42.
- Arnér E.S., and Holmgren A. (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin. Cancer. Biol.* **16**:420-426.
- Arrigo A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:936-944.
- Ashkenazi A., and Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**:1305-1308.
- Aw T.Y. (1999) Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**:557-565.
- Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., and Rhee S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**:217-221.
- Baker S.J., and Reddy E.P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*. **12**:1-9.
- Banning A., Deubel S., Kluth D., Zhou Z., and Brigelius-Flohe R (2005) The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell Biol.*, **25**:4914-4923.
- Barra D., Schinina M.E., Simmaco M., Bannister J.V., Bannister W.H., Rotilio G., and Bossa F. (1984) The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **259**:12595-12601.
- Barrett W.C., DeGnore J.P., Keng Y.F., Zhang Z.Y., Yim M.B., and Chock P.B. (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction

- mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **274**:34543-34546.
- Baty J.W., Hampton M.B., and Winterbourn C.C. (2005) Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem. J.* **389**:785-795.
- Behrend L., Henderson G., and Zwacka R.M. (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transaction.* **31**: 1441-1444.
- Bersani N.A., Merwin J.R., Lopez N.I., Pearson G.D., AND Merrill G.F. (2002) Protein electrophoretic mobility shift assay to monitor redox state of thioredoxin in cells. *Methods in Enzymology* **347**: 317-326.
- Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., and Wright W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* **279**:349-352.
- Brigelius R., Muckel C., Akerboom T.P., and Sies H. (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol.* **32**:2529-2534.
- Broome J.D., and Jeng M.W. (1973) Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides in vitro. Effects on mouse lymphoma cells in comparison with splenic lymphocytes. *J. Exp. Med.* **138**:574-592.
- Cai J., and Jones D.P. (1998) Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* **273**:11401-11404.
- Carew J.S., Zhou Y., Albitar M., Carew J.D., Keating M.J., and Huang P. (2003) Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia.* **17**:1437-1447.
- Casanovas O., Hicklin D.J., Bergers G., and Hanahan D. (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell.* **8**:299-309.
- Cerutti P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* **22**:375-381.
- Chan A.O., Luk J.M., Hui W.M., and Lam S.K. (1999) Molecular biology of gastric carcinoma: from laboratory to bedside. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**:1150-1160.

- Chen C., and Kong A.N. (2004) Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:1505-1516.
- Chen C., Pung D., Leong V., Hebbar V., Shen G., Nair S., Li W., and Kong A.N. (2004) Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:1578-1590.
- Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., and Wahl G.M. (2006) Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66**:9339-9344.
- Correa P. (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention *Cancer Res* **52**:6735-6740.
- Cotgreave I.A., and Gerdes R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**:1-9.
- Danesh J. (1999) Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**:851-856.
- Daniel P.T., Wieder T., Sturm I., and Schulze-Osthoff K. (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* **15**:1022-1032.
- Dass C.R., and Choong P.F. (2008) Cancer angiogenesis: targeting the heel of Achilles. *J Drug Target* **16**:449-454.
- Di Simplicio P., Cacace M.G., Lusini L., Giannerini F., Giustarini D., and Rossi R. (1998) Role of protein -SH groups in redox homeostasis--the erythrocyte as a model system. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**:145-152.
- Dypbukt J.M., Ankarcrona M., Burkitt M., Sjöholm A., Strom K., Orrenius S., and Nicotera P. (1994) Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.* **269**:30553-30560.
- Egglar A.L., Gay K.A., and Mesecar A.D. (2008) Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.* **1**:S84-94.
- Ernest M.J., and Kim K.H. (1973) Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glycogen synthetase D by sulfhydryl-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* **248**:1550-1555.

- Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Pierantoni M.G., Napolitano M., Russo T., and Cimino F. (2006) p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J. Biol. Chem.* **281**:39776-39784.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo M.R. Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. (2005a) *Cell Death Differ* **12**:1555-1563.
- Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2005b) Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **39**:345-354.
- Filomeni G., Aquilano K., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2005c) 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**:11735-11742.
- Filomeni G., Aquilano K., Rotilio G., and Ciriolo MR. (2003a) 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., and Ciriolo M.R. (2003b) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.* **17**:64-6.
- Finkel T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:248-253.
- Foulds L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* **14**:327-339.
- Fratelli M., Demol H., Puype M., Casagrande S., Eberini I., Salmona M., Bonetto V., Mengozzi M., Duffieux F., Miclet E., Bachi A., Vandekerckhove J., Gianazza E., and Grezzi P. (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**:3505-3510.
- Fruehauf J.P., and Meyskens F.L. Jr. (2007) Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* **13**:789-794.
- Fukuzawa K., Inokami Y., Tokumura A., Terao J., and Suzuki A. (1998) Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipidperoxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes. *Lipids.* **33**:751-756.

- Gabby M., Tauber M., Porat S., and Simantov R. (1996) Selective role of glutathione in protecting human neuronal cells from dopamine-induced apoptosis. *Neuropharmacology* **35**:571-578.
- Gatenby R.A., and Gillies R.J. (2008) A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. **8**:56-61.
- Gloire G., Dejardin E., and Piette J. (2006) Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem. Pharmacol.* **72**:1081-1089.
- Gomez-Lazaro M., Galindo M.F., Concannon C.G., Segura M.F., Fernandez-Gomez F.J., Llecha N., Comella J.X., Prehn J.H., and Jordan J. (2008) 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem.* **104**:1599-1612.
- González C.A., Sala N., and Capellá G. (2002) Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int .J. Cancer.* **100**:249-260.
- Gotoh Y., and Cooper J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.* **273**:17477-17482.
- Grandal M.V., and Madshus I.H. (2008) Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis. *J Cell Mol Med.* **12**:1527-34.
- Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., and Alexander R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**:1141-1148.
- Grivennikov S., and Karin M. (2008) Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell.* **13**:7-9.
- Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B.C., Zeiher A.M., and Dimmeler S. (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.* **4**:743-9.
- Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., and Bartek J. (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* **319**:1352-1355.
- Hansen J.M., Watson W.H., and Jones D.P. (2004) Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol Sci.* **82**:308-317.
- Hamilos D.L., Zelarney P., and Mascali J.J. (1989) Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship

- between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacology* **18**:223-235.
- Hamilton R.F. Jr, Li L., Felder T.B., and Holian A. (1995) Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **269**:L318-325.
- Han Z., Malik N., Carter T., Reeves W.H., Wyche J.H., and Hendrickson E.A. (1996) DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *Journal of Biological Chemistry.* **271**: 25035-25040.
- Hanahan D., and Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**:57-70.
- Harris C.C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* **16**:1442-1455.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., and Oren M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* **387**:296-299.
- Hayflick L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry.* **62**:1180-1190.
- Hecker D., Page G., Lohrum M., Weiland S., and Scheidtmann K.H. (1996) Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs. *Oncogene* **7**: 953-961.
- Hewlett G., Opitz H.G., Schlumberger H.D., and Lemke H. (1977) Growth regulation of a murine lymphoma cell line by a 2-mercaptoethanol or macrophage-activated serum factor. *Eur. J. Immunol.* **7**:781-785.
- Hildesheim J., Bulavin D.V., Anver M.R., Alvord W.G., Hollander M.C., Vardanian L., and Fornace A.J. Jr. (2002) Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* **62**:7305-7315.
- Hileman E.O., Liu J., Albitar M., Keating M.J., and Huang P. (2004) Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**:209-219.
- Hosono T., Fukao T., Ogihara J., Ito Y., Shiba H., Seki T., and Ariga T. (2005) Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *J Biol Chem.* **280**:41487-41493.
- Hutter D.E., Till B.G., and Greene J.J. (1997) Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Exp. Cell Res.* **232**:435-438.

- Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., and Goldschmidt-Clermont P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. **275**:1649-1652.
- Iwata S., Hori T., Sato N., Hirota K., Sasada T., Mitsui A., Hirakawa T., and Yodoi J. (1997) Adult T cell leukemia (ATL)-derived factor/human thioredoxin prevents apoptosis of lymphoid cells induced by L-cystine and glutathione depletion: possible involvement of thiol-mediated redox regulation in apoptosis caused by pro-oxidant state. *J. Immunol.* **158**:3108-3117.
- Janssen A.M., Bosman C.B., van Duijn W., Oostendorp-van de Ruit M.M., Kubben F.J., Griffioen G., Lamers C.B., van Krieken J.H., van de Velde C.J., Verspaget H.W. (2000) Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**:3183-3192.
- Kang K.W., Lee S.J., Park J.W., and Kim S.G. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* **62**: 1001-1010.
- Kensler T.W., Wakabayashi N., and Biswal S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**:89-116.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., and Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**:239-257.
- Keum Y.S., Yu S., Chang P.P., Yuan X., Kim J.H., Xu C., Han J., Agarwal A., and Kong A.N. (2006) Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* **66**:8804-8813.
- Kim H.S., Lee J.H., and Kim I.K. (1996) Intracellular glutathione level modulates the induction of apoptosis by delta 12-prostaglandin J2. *Prostaglandins* **51**:413-425.
- Kim S.O., Merchant K., Nudelman R., Beyer W.F. Jr, Keng T., DeAngelo J., Hausladen A., and Stamler J.S. (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell.* **109**:383-396.

- Kim Y.C., Yamaguchi Y., Kondo N., Masutani H., and Yodoi J. (2003) Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene*. **22**:1860-1865.
- Kirkman H.N., Galiano S., and Gaetani G.F. (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* **15**:660-666.
- Kirlin W.G., Cai J., Thompson S.A., Diaz D., Kavanagh T.J., and Jones D.P. (1999) Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:1208-1218.
- Kobayashi M., and Yamamoto M. (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**:385-394.
- Kong Q., Beel J.A., and Lilliehei K.O. (2000) A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses*. **55**:29-35.
- Kontos H.A., Wei E.P., Ellis E.F., Jenkins L.W., Povlishock J.T., Rowe G.T., and Hess M.L. (1985) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* **57**:142-151.
- Korsmeyer S.J. (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. **15**:879-886.
- Kuppusamy P., and Zweier J.L. . (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* **264**:9880-9884.
- Lamar J.M., Pumiglia K.M., and DiPersio C.M. (2008) An immortalization-dependent switch in integrin function up-regulates MMP-9 to enhance tumor cell invasion. *Cancer Res.* **68**:7371-9.
- Lander H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11**:118-124.
- Le Moan N., Clement G., Le Maout S., Tacnet F., and Toledano M.B. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* **281**:10420-10430.
- Lee S.R., Kwon K.S., Kim S.R., and Rhee S.G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**:15366-15372.
- Li W., Yu S.W., and Kong A.N. (2006) Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **281**:27251-63.

- Lillig C.H., and Holmgren A. (2007) Thioredoxin and related molecules-- from biology to health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **9**:25-47.
- Lind C., Gerdes R., Hamnell Y., Schuppe-Koistinen I., von Löwenhielm H.B., Holmgren A., and Cotgreave I.A. . (2002) Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **406**:229-240.
- Liou W., Chang L.Y., Geuze H.J., Strous G.J., Crapo J.D., and Slot J.W. (1993) Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol. Med.* **14**:201-217.
- Liu B., Chen Y., and St Clair D.K. ROS and p53: a versatile partnership. (2008) *Free Radic. Biol. Med.* **44**:1529-1535.
- Liu G., and Chen X. (2006) Regulation of the p53 transcriptional activity. *J. Cell Biochem.* **97**:448-458.
- Liu Y., and Min W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ. Res.* **90**:1259-1266.
- Liu Y., and Min W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res.* **90**:1259-1266.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- Makale M. (2007) Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Res. C. Embryo Today.* **8**:329-343.
- Makino Y., Yoshikawa N., Okamoto K., Hirota K., Yodoi J., Makino I., and Tanaka H. (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J. Biol. Chem.* **274**:3182-3188.
- Marklund S.L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**:7634-7638.
- Martin D., Rojo A.I., Salinas M., Diaz R., Gallardo G., Alam J., De Galarreta C.M., and Cuadrado A. (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**:8919-29.
- Mayr M., Hu Y., Hainaut H., and Xu Q. (2002) Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-

- dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB Journal* **16**: 1423-1425
- Merino E.J., Boal A.K., and Barton J.K. (2008) Biological contexts for DNA charge transport chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**:229-237.
- Mitchell D.A., and Marletta M.A. (2005) Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat. Chem. Biol.* **1**:154-158.
- Na HK, Surh YJ. (2006) Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: a novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection. *Mol. Carcinog.* **45**:368-80.
- Nakamura H., Nakamura K., and Yodoi J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:351-369.
- Nathan C.F., and Cohn Z.A. (1981) Antitumor effects of hydrogen peroxide in vivo. *J. Exp. Med.* **154**:1539-1553.
- Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., and Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* **139**: 271-279.
- Nishida K., and Otsu K. (2006) The role of apoptosis signal regulating kinase 1 in cardiomyocyte apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**:1729-1736.
- Nobel C.I., Kimland M., Lind B., Orrenius S., and Slater A.F. (1995) Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J. Biol. Chem.* **270**:26202-26208.
- Nordberg J., and Arnér E.S. . (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1287-1312.
- Okado A., Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fujii J., and Taniguchi N. (1996) Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 219-224.
- Parone P.A., James D., and Martinou J.C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* **84**:105-111.

- Paszek M.J., Zahir N., Johnson K.R., Lakins J.N., Rozenberg G.I., Gefen A., Reinhart-King C.A., Margulies S.S., Dembo M., Boettiger D., Hammer D.A., and Weaver V.M. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. **8**:241-54.
- Pelicano H., Carney D., and Huang P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*. **7**: 97-110.
- Perfettini J.L., Castedo M., Nardacci R., Ciccocanti F., Boya P., Roumier T., Larochette N., Piacentini M., and Kroemer G. (2005) Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J. Exp. Med.* **17**:279-289.
- Perfettini J.L., Nardacci R., Bourouba M., Subra F., Gros L., Séror C., Manic G., Rosselli F., Amendola A., Masdehors P., Chessa L., Novelli G., Ojcius D.M., Siwicki J.K., Chechlinska M., Auclair C., Regueiro J.R., de Thé H., Gougeon M.L., Piacentini M., and Kroemer G. (2008) Critical involvement of the ATM-dependent DNA damage response in the apoptotic demise of HIV-1-elicited syncytia. *PLoS ONE*. **3**:e245.
- Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D., and Ashkenazi A. (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. **396**:699-703.
- Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., and Vogelstein B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. **389**:300-305.
- Powis G., Gasdaska J.R., and Baker A. (1997) Redox signaling and the control of cell growth and death. *Adv. Pharmacol.* **38**:329-359.
- Rahman I., and MacNee W. (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1405-1420.
- Rainwater R., Parks D., Anderson M.E., Tegtmeyer P., and Mann K. (1995) Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell Biol.* **15**:3892-3903.
- Reed D.J., Babson J.R., Beatty P.W., Brodie A.E., Ellis W.W., and Potter D.W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* **106**:55-62.
- Riley T., Sontag E., Chen P., and Levine A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:402-412.

- Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., and Chumakov P.M. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* **11**:1306-1313.
- Saito Y., and Takahashi K. (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.* **269**:5746-5751.
- Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., and Ichijo H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**:2596-2606.
- Sandstrom P.A., Mannie M.D., and Buttke T.M. (1994) Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **55**:221-226.
- Sastre J., Pallardó F.V., and Viña J. (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life.* **49**:427-435.
- Saurin A.T., Neubert H., Brennan J.P., and Eaton P. (2004) Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**:17982-17987.
- Seemann S., and Hainaut P. (2005) Roles of thioredoxin reductase 1 and APE/Ref-1 in the control of basal p53 stability and activity. *Oncogene.* **24**:3853-3863.
- Seres T., Ravichandran V., Moriguchi T., Rokutan K., Thomas J.A., and Johnston R.B. Jr. (1996) Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J Immunol.* **156**:1973-80.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., and Paules R.S. (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1387-1404.
- Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., and Ley T.J. (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* **10**:581-587.
- Simizu S., Takada M., Umezawa K., and Imoto M. (1998) Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* **273**:26900-26907.
- Simons S.S. Jr, and Pratt W.B. (1995) Glucocorticoid receptor thiols and steroid-binding activity. *Methods Enzymol.* **251**:406-422.

- Speir E., Modali R., Huang E.S., Leon M.B., Shawl F., Finkel T., and Epstein S.E. (1994) Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. **265**:391-394.
- Sporn M.B. (1996) The war on cancer. *Lancet*. **347**:1377-81.
- Stadtländer C.T., and Waterbor J.W. (1999) Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*. **20**:2195-2208.
- Storey K.B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**:1715-1733.
- Sun X.Z., Vinci C., Makmura L., Han S., Tran D., Nguyen J., Hamann M., Grazziani S., Sheppard S., Gutova M., Zhou F., Thomas J., and Momand J. (2003) Formation of disulfide bond in p53 correlates with inhibition of DNA binding and tetramerization. *Antioxid. Redox Signal.* **5**:655-665.
- Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Sulciner D.J., Gutkind J.S., Irani K., Goldschmidt-Clermont P.J., and Finkel T. (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* **318**:379-382.
- Suzuki Y.J., Forman H.J., and Sevanian A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**:269-285.
- Szatrowski T.P., and Nathan C.F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**:794-798.
- Taipale J., and Beachy P.A. (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. **411**:349-354.
- Tanaka T., Halicka H.D., Traganos F., and Darzynkiewicz Z. (2006) Phosphorylation of histone H2AX on Ser 139 and activation of ATM during oxidative burst in phorbol ester-treated human leukocytes. *Cell Cycle*. **5**:2671-2675.
- Tarin D. (2007) New insights into the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 2007 **26**:13-25.
- Taylor W.R., and Stark G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. **20**:1803-1815.
- Thomas J.A., Poland B., and Honzatko R. (1995) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**:1-9.
- Todaro M., Alea M.P., Di Stefano A.B., Cammareri P., Vermeulen L., Iovino F., Tripodo C., Russo A., Gulotta G., Medema J.P., and Stassi G. (2007) Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Stem Cell*. **1**:389-402.

- Urano S., Inomori Y., Sugawara T., Kato Y., Kitahara M., Hasegawa Y., Matsuo M., and Mukai K. (1992) Vitamin E: inhibition of retinol-induced hemolysis and membrane-stabilizing behavior. *J. Biol. Chem.* **267**:18365-70.
- Ushio-Fukai M., Zafari A.M., Fukui T., Ishizaka N., and Griendling K.K. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 23317-23321.
- Wang J.C., and Dick J.E. (2005) Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* **15**:494-501.
- Watanabe A., Tabeta K., and Kosaka K. (1972) Glutathione-dependent interconversion of microheterogeneous forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **72**:695-701.
- Watson W.H., Pohl J., Montfort W.R., Stuchlik O., Reed M.S., Powis G., and Jones D.P. (2003) Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J. Biol. Chem.* **278**:33408-33415.
- Weisiger R.A., and Fridovich I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**:3582-3592.
- Winterbourn C.C., and Hampton M.B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:549-561.
- Wolf B.B., Schuler M., Echeverri F., and Green D.R. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol. Chem.* **274**:30651-30656.
- Xiao D., Pinto J.T., Soh J.W., Deguchi A., Gundersen G.G., Palazzo A.F., Yoon J.T., Shirin H., and Weinstein I.B. (2003) Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation. *Cancer Res.* **63**:6825-6837.
- Xu W., Liu L., Smith G.C., and Charles G. (2000) Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. *Nature Cell Biology.* **2**: 339-345.
- Yoshikawa T., Kokura S., Tainaka K., Naito Y., and Kondo M. (1995) A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res.* **55**:1617-1620.
- Zheng L., Wang L., Ajani J., and Xie K. (2004) Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric. Cancer.* **7**:61-77.

Zheng M., Aslund F., and Storz G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*. **279**:1718-1721.