



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE
MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

XX CICLO

**Superossido Dismutasi a Cu,Zn nella funzionalità
mitocondriale e citoscheletrica:
importanza nel mantenimento dell'omeostasi in cellule di
origine neuronale**

Paola Vigilanza

Docente Guida: Prof. Maria Rosa Ciriolo

Coordinatore: Prof. Gianni Cesareni

“What we call the beginning is often the end
And to make an end is to make a beginning,
The end is where we start from.”

T.S.Eliot, “Little Gidding”, da *Four Quartets*

A Patrizio e Livia, i miei esperimenti non
ripetibili meglio riusciti di sempre.

INDICE

INTRODUCTION	Pag. 9
RESULTS	" 15
INTRODUZIONE	" 21
<i>Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)</i>	" 23
<i>I danni provocati dai ROS</i>	" 26
<i>Ruolo fisiologico dei ROS</i>	" 27
<i>I meccanismi della difesa antiossidante</i>	" 29
<i>Principali difese non enzimatiche</i>	" 31
<i>Principali difese enzimatiche</i>	" 33
<i>La Superossido Dismutasi a Cu,Zn</i>	" 35
<i>I ROS e la loro principale sede di sintesi: i mitocondri</i>	" 37
<i>Coinvolgimento dei ROS nell'equilibrio delle strutture citoscheletriche e implicazioni nella neurodegenerazione</i>	" 40
SCOPO DEL LAVORO	" 45
MATERIALI e METODI	" 51
<i>Materiali</i>	" 53
<i>Colture cellulari</i>	" 53
<i>Transfezioni</i>	" 54
<i>Trattamenti</i>	" 55
<i>Determinazione della Morte e Vitalità cellulare</i>	" 56
<i>Marcatura con Ioduro di Propidio</i>	" 56
<i>MTS-test</i>	" 56
<i>Conta diretta mediante esclusione da Trypan blue</i>	" 57
<i>Lisi delle cellule</i>	" 57
<i>Determinazione delle proteine totali</i>	" 58
<i>Determinazione del glutatione mediante HPLC</i>	" 58
<i>Determinazione dei ROS intracellulari</i>	" 59
<i>Determinazione della funzionalità mitocondriale</i>	60
<i>Misura delle proteine carbonilate</i>	" 60
<i>Immuno-elettroforesi (Western blotting)</i>	" 60
<i>Marcatura delle cellule per immunofluorescenza</i>	" 62
<i>Gel d'attività per la misurazione dell'attività della Cu,ZnSOD</i>	" 63

<i>Immunoprecipitazione</i>	Pag. 63
<i>RT-PCR</i>	" 64
<i>Analisi statistica dei dati</i>	" 65
RISULTATI	" 67
Effetti della down-regolazione della Cu,ZnSOD sull'omeostasi mitocondriale	" 69
<i>Identificazione e scelta della sequenza di dsRNA per indurre la down-regolazione dell'espressione della Cu,ZnSOD</i>	" 70
<i>La down-regolazione della Cu,ZnSOD non influenza la vitalità cellulare in condizioni basali</i>	" 71
<i>La down-regolazione della Cu,ZnSOD induce morte cellulare in presenza di stress-ossidativo</i>	" 73
<i>La down-regolazione della Cu,ZnSOD provoca solo un piccolo aumento intracellulare di superossido a 48h dalla transfezione</i>	" 74
<i>La down-regolazione della Cu,ZnSOD provoca un aumento intracellulare dell'antiossidante GSH</i>	" 75
<i>L'aumento di GSH è responsabile dei bassi livelli intracellulari di superossido e del mantenimento della vitalità cellulare</i>	" 76
<i>Il decremento di Cu,ZnSOD induce l'accumulo di proteine carbonilate</i>	" 77
<i>Il decremento di Cu,ZnSOD induce un danno a livello del mitocondrio</i>	" 78
<i>Determinazione della temporalità degli eventi conseguenti al decremento della Cu,ZnSOD</i>	" 82
<i>Il calo del potenziale transmembrana è direttamente correlato al calo di Bcl-2 e non della Cu,ZnSOD</i>	" 83
<i>La Cu,ZnSOD interagisce con la proteina Bcl-2 ma non con la sua isoforma fosforilata sulla Ser70</i>	" 84
<i>Il calo della Cu,ZnSOD induce la fosforilazione della proteina Bcl-2</i>	" 85
<i>Il calo della Cu,ZnSOD induce la carbonilazione della proteina Bcl-2</i>	" 86
Effetti della down-regolazione della Cu,ZnSOD sul mantenimento della struttura citoscheletrica	" 89
<i>La morfologia delle cellule SH-SY5Y è alterata in seguito alla down-regolazione della Cu,ZnSOD</i>	" 91
<i>L'alterazione della morfologia delle cellule siSod è accompagnata da quella del contenuto delle principali proteine citoscheletriche</i>	" 93
<i>L'alterazione del citoscheletro conseguente al decremento di Cu,ZnSOD sembra tipica delle cellule di origine neuronale</i>	" 95
<i>Il recupero dell'F-actina è associata all'up-regolazione di Tau e Hsp27</i>	" 97
<i>L'attivazione di p38/MAPK è responsabile della prevenzione della morte cellulare in seguito alla disgregazione del citoscheletro</i>	" 100

<i>Il transiente accumulo di superossido determinato dalla down-regolazione della Cu,ZnSOD induce l'attivazione di Cdk5/p35 nelle cellule di origine neuronale</i>	Pag.	102
DISCUSSIONE	"	108
BIBLIOGRAFIA	"	122

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are constantly generated under normal conditions as a consequence of aerobic metabolism. ROS include free radicals such as the superoxide anion (O_2^-), the hydroxyl radical and the non radical hydrogen peroxide (H_2O_2). They are particularly transient species due to their high chemical reactivity and can react with DNA, proteins, carbohydrates and lipids in a destructive manner. The cell is endowed with an extensive antioxidant defence system to counteract ROS, either directly by interception or indirectly through reversal of oxidative damage. When ROS overcome the defence systems of the cell and redox homeostasis is altered, the result is oxidative stress. Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of several diseases as, for example, cancer, AIDS, Huntington's, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease and retinal degenerative disorders. Clearly, the brain is particularly vulnerable. This is not surprising as the central nervous system is highly aerobic and thus extremely susceptible to oxidative stress. Additionally, the antioxidant defences of the brain are relatively low having almost no catalase and very low levels of glutathione (Slivka et al., 1987). Determinants of neuronal vulnerability might, also, include cell size and location, metabolism of disease-specific proteins and a repertoire of signal transduction pathways and stress resistance mechanisms (Mattson et al., 2006).

Mitochondria are considered the major site of generation of free radicals. Under physiological conditions, electrons carried by the electron transport chain can leak out of the pathway and pass directly to oxygen, generating O_2^- . In neuronal cells, H_2O_2 can be also generated by Monoaminoxidase activity, responsible for turnover of neurotransmitters. ROS can be produced in mitochondria by cyt b5 reductase, dihydroorotate-dehydrogenase, dehydrogenase of α -glycerophosphate and other enzymes active in this compartment (Andreyev et al., 2005). Mitochondria are not only the major site of generation of free radicals, but can be also considered their major target. In mitochondria, superoxide is produced mainly in the matrix (Andreyev et al., 2005) and, for this reason, they are provided with matrix manganese containing superoxide dismutase (MnSOD). Moreover, this radical is produced at a lesser extent also in the intermembrane space where can be oxidized to oxygen by cyt c. Recently, experimental data evidences that copper,zinc superoxide dismutase (Cu,ZnSOD) is also present in the intermembrane space, where it seems to be inactive unless oxidative stress conditions occur (Okado-Matsumoto et al., 2001; Sturtz et al., 2001; Iñarrea et al., 2005). Mitochondrial dysfunction and inflammatory insults have

emerged as major contributing factors in the aging process, while oxidative stress seems to be involved in the propagation of cellular injury leading to different damages observed in neurodegenerative diseases. A large body of recent work on oxidative stress-related pathologies points to mitochondrial impairment as a central causative factor. Decreased activity of specific complexes of the electron transport chain, increased oxidative damage, and altered activity of antioxidant defense enzymes have been shown in aging and neurodegenerative diseases (Beal, 2005).

Here we demonstrate that Cu,ZnSOD decrease is not only important for the maintenance of intracellular redox state, but also for the maintenance of mitochondrial homeostasis, through its interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-2. Time course experiments demonstrate that Cu,ZnSOD decrease lead to early ROS accumulation which is rapidly buffered by GSH raise. Proteins carbonylation occurs especially in the mitochondrial fraction. Bcl-2 protein is also carbonylated, leading to the loss of transmembrane potential and ATP synthesis, demonstrating a pivotal role for Cu,ZnSOD in the maintenance of the homeostasis of this compartment.

Due to its structure cytoskeleton may represent one of the preferential targets of ROS whatever oxidative stress is applied. Indeed, cytoskeletal proteins are particularly abundant within the cells and several protein constituents of cytoskeleton display highly reactive residues that can be easily oxidized. It has been demonstrated that oxidative stress causes both microfilament and microtubules disruption essentially due to oxidative modifications of specific methionine and cysteine sulfhydryls of actin and tubulin (Dalle-Donne et al., 2001; Aksenov et al, 2001; Hosono et al., 2005; Kang et al., 2005; Boutte et al., 2006; Niewiadomska et al., 2006). In particular, exposure of cells to ROS-generating agents (e.g., menadione, diamide, *tert*-butyl hydroperoxide) results in disruption of the normal organization of microfilaments that coincides with a preferential oxidation of the conserved Cys³⁷⁴ of actin (Dalle-Donne et al., 2001; Mirabelli et al., 1998; Rokutan et al., 1994). More recent evidence indicates that also oxidation in terms of carbonylation of protein residues may play a role in loss of cytoskeletal function (Dalle-Donne et al., 2002; Banan et al., 2001). Besides being direct damaging factors, when produced at high rate, ROS could also take part in the processes governing cell signaling. In this context, they can represent efficient modulators of signaling kinases also implicated in the regulation of cytoskeletal function. Indeed, under ROS challenge, activation of the redox-sensitive mitogen-activated protein kinase p38 leads

to Hsp27 phosphorylation, which in turn promotes actin reorganization and resistance to cell death (Huot et al., 1996; Huot et al., 1997). Moreover, in cells of neuronal origin, the cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), which is responsible for cell migration, actin dynamics and microtubule polymerization has been demonstrated to be hyper-activated by oxidative stress conditions (Dhavan et al., 2001; Sahlgren et al., 2006). Other proteins that are involved in regulation of cytoskeletal dynamic could be modulated by ROS: an example is represented by Rho GTPases that are inhibited by Rac-mediated ROS increase leading to microfilaments rearrangement (Nimmual et al., 2003). In particular, the enhanced interaction of mutated forms of Cu,ZnSOD with actin causes cytoskeletal changes, suggesting that this enzyme may have an important role in modulation of microfilaments structure (Takamiya et al., 2005).

We demonstrated that in neuroblastoma cells such as SH-SY5Y, CHP100 and NSC34, Cu,ZnSOD depletion induced a decrement in actin and β -tubulin content and accumulation of NF-L and Tau proteins. These alterations seem to be typical of neuronal cell lines, as were not detectable in other cell types. An alteration of cell morphology and microfilament network was also observed together with the up-regulation of the Cdk5/p35 pathway, which is involved in the regulation of actin polymerization. The decrease of F-actin was transient and it was recovered along with the activation of p38/Hsp27 MAPK pathway, as well as after treatment with the antioxidant compound N-acetyl-L-cysteine. The importance of p38 in the recovery of cytoskeleton was confirmed by experiments carried out in the presence of its inhibitor SB203580, which induced cell death. Our data demonstrate that Cu,ZnSOD is essential for the preservation of cytoskeleton integrity, by maintaining physiological concentration of ROS and thus inhibiting the activation of the neuronal specific Cdk5/p35 pathway.

RESULTS

In the first part of this work, we investigated the role of the Cu,ZnSOD in the maintenance of intracellular redox homeostasis by analyzing the early effects of its down-regulation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. The down-regulation was performed through the use of RNA interference (RNAi) which is able to induce the specific degradation of the targeted mRNA, thus leading to the inhibition of its translation to protein. Interestingly, we found that Cu,ZnSOD down-regulation (which raise the minimum level at 48h from transfection) is accompanied by GSH raise, which seems to be responsible for the maintenance of the low concentration of superoxide anion, intracellular redox state and thus cell viability. The phenomenon of early burst of ROS flux upon Cu,ZnSOD decrement has broad potential implications in relation to the role played by this enzyme in diseases associated with oxidative redox perturbations. The use of drugs which can deplete GSH antioxidant defence system - buthionine sulfoximine (BSO) or NAC - induce the accumulation of ROS species at this time point, leading to cell death. Moreover, we found that Cu,ZnSOD decrement is associated with the loss of mitochondrial transmembrane potential and ATP synthesis. Experiments of Western blot clearly demonstrate that, despite a lower decrease of Cu,ZnSOD in mitochondria (if compared with cytosolic fraction) a significant increase in carbonylated proteins was effective in this compartment. According to literature (Pasinelli et al., 2004) also in our experimental system Cu,ZnSOD protein directly interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2, which is known to be responsible for the stabilization of mitochondrial transmembrane potential. Bcl-2 trend parallels that of Cu,ZnSOD after RNAi, being carbonylated and, at least in part, phosphorylated on Ser70, a form in which it is not able to interact with Cu,ZnSOD. These findings can shade a new light in understanding the importance of Cu,ZnSOD in the cell, particularly for the maintenance of mitochondrial homeostasis.

Using the same RNAi tool, we found that, besides mitochondrial impairment, also cytoskeleton and its regulating redox-sensitive signalling pathways are altered as consequence of superoxide unbalance caused by Cu,ZnSOD decrease. In particular, we demonstrated that in neuroblastoma cells, at early stages of Cu,ZnSOD depletion, an alteration of cells morphology due to actin decrement occurs, together with the alteration in the content of other cytoskeletal proteins. Cytoskeletal disturbance was mainly due to actin and β -tubulin decrease and increase of intermediate filaments NF-L. Here we noticed that upon Cu,ZnSOD deficiency the α isoform of tubulin did not undergo any change in its protein content; this observation is

in agreement with data from literature in which a preferential susceptibility of β -tubulin to oxidative unbalance has been reported. Specifically it has been demonstrated that β -tubulin, but not the heterodimeric counterpart α -tubulin, can be oxidized on methionine (Boutte et al., 2006) and cysteine residues (Hosono et al., 2005). Oxidative modifications are also effective on actin, in which cysteine and methionine residues can be oxidatively modified and seem to represent sensors of oxidative stress at least in yeasts (Farah et al., 2007). By means of NAC treatment, we demonstrated that Cu,ZnSOD protects actin by preventing superoxide-mediated damage directly and indirectly, by inhibiting the activation of Cdk5/p35 pathway. Compatibly with transient activation of Cdk5 we found a significant accumulation of both NF-L and Tau proteins and a detectable increase of phosphorylated form of Tau. The phenomena of cytoskeleton impairment associated with Cu,ZnSOD deficiency seem to be effective at least only in the neuroblastoma cells screened (SH-SY5Y, NSC34, CHP100) in line with the notion that neuronal-derived cells are particularly susceptible to oxidative unbalance (Mattson et al., 2006). On the contrary, under the same experimental conditions, melanoma M14 and adenocarcinoma AGS cells do not undergo superoxide unbalance and actin decrement. This evidence is in line with data from our previous work where we demonstrated that AGS cells can efficiently counteract oxidative stress due to their efficient antioxidant defence system (Filomeni et al., 2005a). In addition, after Cu,ZnSOD decrease we firstly found a strong up-regulation of Hsp27 concomitantly with the loss of F-actin. Separation of cell lysates in TS and TI fractions showed that Hsp27 is initially localised in cytoskeleton and finally detached from F-actin, thus translocating into the cytosol. Furthermore, the MKK3/6-dependent activation of p38 pathway is also effective under Cu,ZnSOD deficiency and its activation is essential for preventing cell death. Experiment carried out in the presence of the inhibitor of p38 SB203580 nicely demonstrates that p38 activity is essential for Hsf1 translocation into the nucleus and for cell survival after Cu,ZnSOD-mediated cytoskeleton impairment. Therefore, we suggest that the assurance of a rapid recovery of cytoskeleton from its transient deregulation might be the key factor for the choice between cell death and survival. Present data reveal a novel point of view in understanding the importance of Cu,ZnSOD antioxidant activity in the maintenance of neuroblastoma cytoskeleton, being a switch for Cdk5/p35 activation. Our data may contribute to clarify the role of p38/Hsp27 pathway in the recovery of microfilament framework upon mild oxidative stress conditions, and suggest an implication of Cu,ZnSOD in the onset of diseases processes (e.g. aging and neurodegeneration) in which

both the loss of cytoskeletal integrity and oxidative stress have been largely reported.

Moreover, it has been reported that F-actin directly binds to mitochondrial voltage dependent anion channels (VDAC) regulating, together with Bcl-2, their gating (Tsujiimoto, 2002). For this reason, the data obtained in this work could explain at least in part the impairment of mitochondrial transmembrane potential evidenced as late effect of Cu,ZnSOD deficiency.

INTRODUZIONE

Le specie reattive dell'ossigeno

L'ossigeno è una molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi; tuttavia, a causa della sua struttura atomica che non gli permette di accettare doppietti elettronici, può generare intermedi altamente instabili noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Gutteridge et al., 2000). Queste specie sono il risultato delle successive riduzioni monoelettroniche fino alla completa riduzione dell'ossigeno ad H₂O e possono essere suddivise in due categorie:

- a) i radicali liberi dell'ossigeno (ad es. O₂⁻ e OH), che contengono un elettrone spaiato
- b) le specie non radicaliche (ad es. H₂O₂).

I ROS possono essere generati in diversi distretti cellulari sia in condizioni fisiologiche sia in risposta a vari stimoli. Le maggiori fonti di ROS sono i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare ed il citosol. La catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, associata alla fosforilazione ossidativa, rappresenta la maggiore fonte cellulare di ATP. Durante questo processo metabolico l'1-2% degli elettroni che fluiscono lungo la catena di trasporto, sfuggono dai complessi proteici ed interagendo con l'ossigeno, generano O₂⁻ soprattutto a livello dei Complessi I e III (Beyer, 1992). L'O₂⁻ può inoltre generarsi anche nella matrice mitocondriale a livello dell'ubichinone (Raha et al., 2000). L'H₂O₂ è prodotta principalmente nei mitocondri e sembra giocare un ruolo importante in molti eventi cellulari come ad esempio la biosintesi dell'ormone tiroideo e l'attività microbica dei macrofagi. Essenzialmente non è una molecola in grado di provocare grossi danni, ma la sua tossicità deriva dalla facile reazione con i metalli di transizione a formare il radicale idrossilico, che è al contrario molto reattivo e capace di danneggiare irreversibilmente le macromolecole cellulari.

Altra fonte di ROS è la NADPH ossidasi localizzata principalmente sul plasmalemma delle cellule fagocitiche. L'assemblaggio e l'attivazione di questo enzima avviene in risposta ad una serie di stimoli che si realizzano nel corso della risposta infiammatoria. Sono state identificate anche altre proteine simili alla NADPH ossidasi localizzate in diversi distretti tissutali la cui attivazione, con conseguente produzione di O₂⁻, assume un'importanza fondamentale soprattutto nei processi di morte cellulare (Finkel, 2000).

La produzione di ROS può avvenire anche a livello recettoriale. Il fattore di necrosi tumorale (TNF α) è una citochina pro-infiammatoria che può legarsi ai recettori del TNF (TNFR1 e TNFR2). Il legame di TNF α al TNFR1 è associato all'induzione dell'apoptosi attraverso l'incremento intracellulare dei ROS. Il legame di TNF α al suo recettore, che scatena la produzione di ROS, ha un ruolo critico anche nella risposta dei fagociti agli agenti patogeni (Woo et al., 2000). Il recettore di FAS è un altro membro della superfamiglia dei TNFR ed il suo ligando naturale è il ligando di FAS. L'interazione tra ligando e recettore provoca l'induzione dell'apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi. A questo fenomeno si associa una forte produzione di ROS che sembra però derivare principalmente dalla contemporanea attivazione della NADPH ossidasi (Suzuki et al., 1998).

Nel reticolo endoplasmatico i ROS sono prodotti a livello del citocromo P450, nel citosol a livello della lipossigenasi, della ciclossigenasi e della xantina ossidasi.

Fonti minori di ROS sono poi alcune molecole endogene o esogene che generano radicali in seguito a reazioni enzimatiche. Un esempio è rappresentato dall'aminoacido prolina: durante le prime fasi del processo apoptotico, mediato dall'accumulo della proteina p53, si evidenzia l'attivazione della prolina ossidasi il cui potenziale riducente è poi scaricato sulla catena di trasporto degli elettroni generando ROS (Donald et al., 2001). I ROS possono anche prodursi, in opportune condizioni, durante il metabolismo dell'acido arachidonico, precursore dei leucotrieni e delle prostaglandine (Cadenas et al., 1983).

Oltre ai processi coinvolti nella produzione dei radicali liberi fin'ora elencati va aggiunta anche la produzione dovuta a molecole organiche esogene come xenobiotici e farmaci (Rotilio et al., 1985). I sistemi ossido-riduttivi di questo tipo includono molecole a struttura chinonica, cationi biperidilici e composti aromatici, farmaci il cui meccanismo d'azione può essere mediato dalla loro attivazione a radicali quali ad esempio gli antibiotici antraciclinici (daunomicina ed adriamicina) e nitroimidazoli (nitrofurantoin). Anche il biperidile (paraquat) deve la sua azione ossidante alla sua riduzione a radicale libero. Queste molecole vengono metabolizzate da reductasi intracellulari ad intermedi con carattere radicalico, i quali successivamente riducono l'ossigeno ritornando alla forma ossidata e producendo O₂⁻. Tale ciclo ossido-riduttivo, innescato da molecole esogene può generare un flusso di ROS.

I danni provocati dai ROS

“La vita col rischio dello stress ossidativo è il prezzo che gli organismi aerobi devono pagare per usufruire di una maggiore efficienza bioenergetica (Skulachev, 1996)”. I ROS sono molecole caratterizzate dall’aver una notevole reattività chimica che le rende molto instabili ed in grado di ossidare le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi, i residui amminoacidici delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici. Il danno ossidativo da parte dei ROS porta, in casi estremi, all’alterazione e la compromissione della funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari con conseguente morte cellulare (Davies, 1987). La forma contenente manganese della superossido dismutasi (Mn SOD) nella matrice e la forma contenente rame e zinco (Cu,ZnSOD) nello spazio intermembrana mitocondriale dismutando il superossido in prossimità dei siti di produzione, rappresentano le difese antiossidanti più importanti nel contrastare gli effetti deleteri dei ROS sulla struttura e sulla funzione dei mitocondri.

Danni alle membrane. La reazione chimica dovuta ai radicali dell’O₂ che avviene sulle membrane cellulari è la perossidazione dei fosfolipidi. Il processo consiste in una serie di reazioni a catena in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici (L[•]), radicali perossidi (LOO[•]) e perossidi lipidici (LOOH). Questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici (LO[•]), aldeidi (malondialdeide), alcani, epossidi lipidici e alcool (Spiteller, 2006). Anche il colesterolo può subire modificazioni dello stesso tipo dando origine ad epossidi e alcool. In seguito a tali processi degenerativi, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la fluidità e la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller, 2006).

Danni alle proteine. Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative provocate dai radicali liberi hanno come conseguenza la proteolisi o la loro aggregazione berrante. Esperimenti su proteine purificate hanno, infatti, dimostrato che le proprietà chimico-fisiche caratteristiche di una proteina esposta all’azione dei radicali dell’O₂ sono completamente alterate. È stato osservato sia una diminuzione della fluorescenza nativa (dovuta a modificazione dei residui di Trp e Tyr), sia una variazione del punto isoelettrico (causata da ossidazioni dei gruppi -R degli amminoacidi

mediante carbonilazione) (Davies, 1987; Davies et al., 1987). Inoltre, è stata dimostrata un'alterazione del peso molecolare dovuta alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo et al., 1990; Wolff et al., 1986). Questi cambiamenti provocano l'attivazione di specifici enzimi proteolitici e conseguente degradazione della proteina (Dean et al., 1993). La carbonilazione, laddove avvenga in maniera lieve e progressiva, è associata alla perdita irreversibile della funzione della proteina che viene eliminata dal proteasoma e dunque permette la sopravvivenza cellulare. L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking rende, invece, le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determina l'insorgenza della morte cellulare (Dalle Donne et al., 2006).

Danni agli acidi nucleici. Per ciò che riguarda gli acidi nucleici, è stato dimostrato che le alterazioni ossidative inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando alla prematura senescenza e alla morte cellulare (Harman, 1981; Schraufstatter et al., 1988). Il danno ossidativo a carico del DNA può tradursi in rotture dei filamenti (doppi e singoli), formazione di legami crociati DNA-DNA (o DNA-proteine), scambio dei cromatidi fratelli, modificazione delle basi azotate. Tutti e quattro i nucleotidi, infatti, possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timidina) sembrano essere le più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Inoltre, la guanina può andare incontro alla formazione di un derivato ossidato, quale l'8-oxoguanina (8-oxoG), che si rinviene spesso come comune denominatore di patologie neurodegenerative come il Morbo di Parkinson (Nakabeppu et al., 2007), la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (Kikuchi et al., 2002) - in cui si ha la down-regolazione dell'enzima 8-oxoguanina-DNA-glicosilasi oggi responsabile della sua rimozione (Murakami et al., 2007) - e l'Alzheimer (Lovell et al., 2007; Mao et al., 2007). Questo tipo di alterazioni producono una diminuzione dell'aromaticità e una perdita della struttura planare che si traduce in distorsioni locali della doppia elica (Simic et al., 1989; Spector et al., 1989; Teebor et al., 1988). Data l'immediata vicinanza al sito di produzione dei ROS, il DNA mitocondriale rappresenta il primo bersaglio della tossicità dei ROS. Il DNA mitocondriale ha, infatti, una maggiore insorgenza di mutazioni spontanee rispetto a quello nucleare, data anche la relativamente scarsa complessità dei sistemi di riparo del DNA in questo compartimento (Kakkar et al., 2007). In ogni caso, le mutazioni insorte nel

DNA mitocondriale determinano, in ultimo, l'ulteriore produzione di superossido e l'attivazione della cascata apoptotica mitocondriale (Harrison et al., 2005; Ricci et al., 2007).

Ruolo fisiologico dei ROS

I ROS non devono essere unicamente considerati molecole in grado di scatenare processi di morte cellulare. Negli ultimi anni, infatti, è emerso che queste specie reattive, se prodotte a basse concentrazioni, possono rappresentare dei secondi messaggeri implicati nella trasduzione del segnale. Nella cellula la trasduzione del segnale mediata dai ROS può seguire sostanzialmente due vie: 1) la fosforilazione delle proteine; 2) il cambiamento dello stato tiolico proteico. Entrambe sono responsabili dell'alterazione di una serie di processi intracellulari comprendenti la sintesi del DNA e dell'RNA, la sintesi proteica, l'attivazione enzimatica e spesso la regolazione del ciclo cellulare (Arrigo, 1999; Suzuki et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Powis et al., 1997; Rahman & MacNee, 2000; Shackelford et al., 2000).

Il coinvolgimento dei ROS nella trasduzione del segnale non necessariamente implica una risposta tossica e non specifica. I primi esperimenti, che hanno dimostrato la partecipazione dei ROS nei processi della segnalazione cellulare, 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, glutatione perossidasi, catalasi). 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 alterata 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. Infatti, data la particolare natura delle vie di trasduzione, sembrerebbe probabile che, una volta generati, i ROS possano comunicare e far parte di percorsi di trasduzione del segnale 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. Un esempio è rappresentato da ASK1, 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). E' 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 e Cooper, 1998).

Un altro 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 possono essere ossidate ad acido sulfenico. Ad esempio, una tra le cisteine reattive ben caratterizzate è 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 attraverso la formazione di un gruppo sulfenato o irreversibilmente attraverso la formazione di acido sulfenico (Finkel, 2000).

Vari studi 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 un'inattivazione temporanea dell'attività fosfatase che corrisponde temporalmente con una 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-glutatioilazione della proteina (Barrett et al., 1999).

Anche la trascrizione è un evento regolato dalle variazioni dell'ambiente ossido-riduttivo intracellulare. Molte sono le evidenze riportate in letteratura riguardo a modulazioni dell'attività trascrizionale da parte delle variazioni ossido-riduttive, anche se la maggior parte riguardano esperimenti in vitro condotti su proteine purificate.

Tra i fattori di trascrizione eucariotici per i quali è stata ipotizzata una regolazione di tipo redox c'è il soppressore tumorale p53. È stato dimostrato che p53 è un fattore trascrizionale in grado di legarsi ai propri siti di DNA più facilmente in un ambiente riducente (Wu et al., 1998; Fojta et al., 1999), e che, mutazioni a carico di alcuni residui di cisteina presenti nel *core* del dominio di legame, prevengono l'induzione della trascrizione (Rainwater et al., 1995). Un altro esempio di regolazione della trascrizione da parte dei ROS è rappresentato da NF-κB. Infatti, diverse evidenze suggeriscono un coinvolgimento dei ROS come intermedi comuni nei vari segnali che attivano NF-κB. Queste conclusioni si basano essenzialmente sull'inibizione dell'attivazione di NF-κB compiuta sia attraverso trattamenti con molecole antiossidanti, sia mediante sovraespressione degli enzimi antiossidanti. Comunque, anche se il blocco dell'attività trascrizionale è inequivocabile, il grado di inibizione sembra dipendere dal tipo cellulare e dallo stimolo utilizzato.

I meccanismi della difesa antiossidante

I primi studi sulle metallo-proteine svolti all'inizio degli anni '70 portarono alla scoperta e alla caratterizzazione di molti enzimi necessari al metabolismo e alla vita cellulare: primo fra tutti, la superossido dismutasi (SOD). Il coinvolgimento dei metalli nella catalisi enzimatica, e la scoperta dell'esistenza di un enzima altamente efficiente ($K_{cat} = 10^9 \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-1}$) preposto allo smaltimento degli ioni radicalici dell'ossigeno, attrassero i ricercatori di tutto il mondo verso lo studio degli effetti di queste molecole sulle funzioni cellulari, in altre parole quel fenomeno che prese presto il nome di *stress ossidativo*. Fu così che, nell'arco di un decennio, la chimica dell'ossigeno all'interno dello scenario cellulare assunse dei caratteri molto più delineati: non solo anello ultimo dei processi di riduzione a valle della demolizione delle molecole carboniose; non solo fonte di energia che scaturiva dalla catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri, ma anche eventuale causa di danno cellulare.

L'identificazione della SOD e degli altri enzimi "antiossidanti", catalasi e glutatione perossidasi (GSH-Px) (Fig.3), assunse quindi un significato biologico ben preciso: costituire un filtro agli effetti nocivi ed indesiderati dell'ossigeno, evitando l'invecchiamento delle strutture e la rapida

degenerazione della cellula. A testimoniare l'importanza si aggiunsero altre evidenze:

1. La presenza di questi enzimi sia nel regno animale sia vegetale.
2. L'elevata ridondanza genica.
3. L'ipotesi sempre più fondata di convergenza evolutiva, tale per cui, enzimi con sequenza e struttura dissimili, presentavano la stessa funzione.

Questo è il caso delle superossido dismutasi di mammifero che contengono rame e zinco (Cu,ZnSOD, ECSOD) e di quelle a manganese (Mn SOD) (tabella I).

Tabella I. Superossido dismutasi di mammifero.

Enzima	Cu,ZnSOD	Mn SOD	EC SOD
Localizzazione	Citosol/Nuclei/Mitocondrio	Mitocondrio	Spazio extracellulare
Peso Molecolare	32 KDa	88 KDa	120 KDa
Struttura	Dimero	Tetrametro	Tetrametro
Metalli	Cu, Zn	Mn	Cu, Zn
Locus	21q22.11	6q25.3	4p15.3-p15.1

L'ipotesi che lo stress ossidativo potesse rappresentare un pericolo oggettivo per la sopravvivenza della cellula venne suffragata col tempo dalla scoperta di ulteriori molecole non enzimatiche capaci di attenuare e/o bloccare gli effetti nocivi delle specie reattive dell'ossigeno. Il nome di "scavengers" (*spazzini*) che questa classe di molecole assume, sta proprio ad indicare le caratteristiche chimiche alla base della loro azione antiossidante; caratteristiche che possono essere catalogate in due classi principali:

1. Molecole che possiedono dieni coniugati, capaci di delocalizzare la carica positiva che si viene a formare in seguito alla reazione con il radicale, come i tocoferoli, l'acido citrico, il β -carotene e i polifenoli.

2. Composti tiolici, come il glutatione (GSH) e la tioredossina (Trx), in grado di agire, direttamente o mediante la catalisi di specifici enzimi, donando equivalenti riducenti e formando disolfuri.

Solo all'inizio degli anni '90 lo stress ossidativo, inteso come stato patologico della cellula caratterizzato da un disequilibrio tra antiossidanti e proossidanti in favore di questi ultimi, iniziò ad essere compreso nella sua interezza. Oggi, l'importanza delle difese antiossidanti nella salvaguardia della vitalità cellulare è enfatizzata dalla scoperta che alterazioni degli enzimi antiossidanti sono spesso associate a patologie per la maggior parte di carattere neurodegenerativo.

Principali difese non enzimatiche

Il glutatione è considerato il principale sistema tampone ossido-riduttivo cellulare appartenente alla famiglia dei tioli (Gilbert, 1990). Mediamente, la concentrazione citosolica del GSH varia da 1 a 10 mM (Smith et al., 1996) ed è di gran lunga più elevata rispetto a molti altri composti redox attivi.

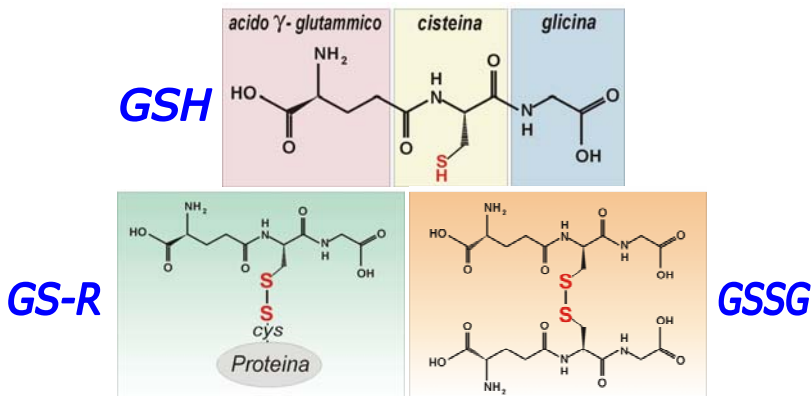


Figura 1. Il Glutatione. Forme redox in cui può presentarsi il tripeptide: ridotta o tiolica (GSH); ossidata a disolfuro (GSSG) e a disolfuro misto a proteine (GS-R).

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

All'interno delle cellule il glutatione si può presentare sotto forma ridotta, o tiolica, (GSH); sotto forma ossidata, in cui due molecole sono unite da un ponte disolfuro, (GSSG); come disolfuro misto con proteine, in cui il legame si instaura tra l'atomo di zolfo del tripeptide ed un residuo di cisteina della proteina, (GS-S-Prot o GS-SP o GS-R) (Fig.1). La reazione di ossidazione che porta alla formazione del GSSG è mediata dall'enzima GSH-Px e da alcune transidrogenasi. La riduzione del GSSG a GSH è invece catalizzata dall'enzima glutatione reduttasi (GSSG-Red), flavoproteina che utilizza NADPH come fonte di elettroni (Filomeni et al., 2002).

Quello rappresentato dalla tioredossina è un altro sistema redox tiolico fondamentale nella riduzione dei ponti disolfuro tra cisteine nel sito di legame al DNA di numerosi fattori di trascrizione, ed è inoltre importante nell'espressione genica (Matthews et al., 1992; Okamoto et al., 1992). Le concentrazioni intracellulari della tioredossina nei mammiferi variano approssimativamente da 1 a 10 μM (Holmgren et al., 1978) e sono quindi 100/1000 volte inferiori di quelli del GSH. I gruppi tiolici della tioredossina di mammifero servono da donatori di elettroni – essenzialmente si tratta di elettroni e protoni, ovvero atomi di idrogeno – per la ribonucleotide reduttasi e per la sulfossimetionina reduttasi. Altri ruoli fondamentali sono quello di aiutare il giusto ripiegamento delle proteine che contengono ponti disolfuro e quello di regolare l'attività di legame al DNA da parte di alcuni fattori di trascrizione (Sen, 1998). A differenza del GSH, la cui forma ossidata dipende dalla formazione di ponti disolfuro *inter*-molecolari, la tioredossina è una proteina che normalmente forma ponti disolfuro *intra*-molecolari (Fig.2). La riduzione della forma ossidata (disolfuro) a quella ridotta è catalizzata dall'enzima tioredossina reduttasi, mentre il donatore di elettroni è l'NADPH (Luthman et al., 1982; Lee et al., 2000).

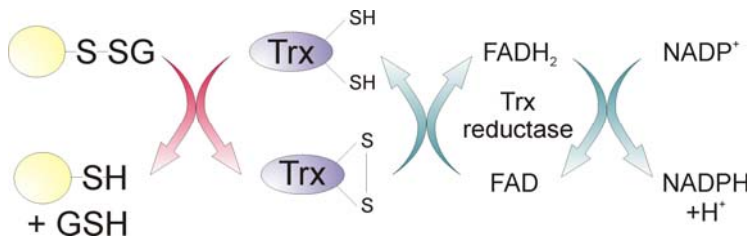
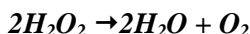


Figura 2. Ciclo di ossido-riduzione della Tioredossina.

Principali difese enzimatiche

L' H_2O_2 è una delle specie più abbondanti di ROS implicata sia nella morte per apoptosi caspasi-indipendente sia nella morte per necrosi. I meccanismi primari di difesa contro la tossicità dell' H_2O_2 sono quello della catalasi e della GSH-Px che utilizza il ciclo redox del GSH (Michiels et al., 1994; Reed, 1990) (Fig.3). In particolare, la catalasi (ossidoriduttasi del perossido d'idrogeno) è un enzima contenente eme che si trova virtualmente in tutti gli organismi aerobi. Il meccanismo di catalasi della catalasi è altamente efficiente ed utilizza un meccanismo di trasferimento di elettroni a due passaggi che porta alla trasformazione dell' H_2O_2 in acqua ed ossigeno molecolare:



L'efficienza di questo enzima è alta a tal punto che nessuna concentrazione di H_2O_2 è in grado di saturarlo (Lledias et al., 1998).

La GSH-Px, catalizza le reazioni di riduzione di H_2O_2 e degli idroperossidi organici secondo la seguente reazione.



In questa reazione l'enzima presenta una specificità per quanto riguarda il donatore di elettroni (GSH) mentre l'idroperossido può essere rappresentato sia dall' H_2O_2 che da qualunque idroperossido derivato dagli acidi grassi, nucleotidi e steroidi. La GSH-Px, enzima citosolico selenio-dipendente, è quindi un detossificante più versatile della catalasi ed è per questo che individui geneticamente privi di catalasi (acatalasemici) possono vivere normalmente grazie alla presenza della GSH-Px.

La superossido dismutasi è un enzima deputato all'eliminazione del radicale superossido (Fig.3) ed è presente fondamentalmente in tre forme: la Cu,ZnSOD (localizzata nel citosol e nello spazio intermembrana mitocondriale), la Mn SOD (localizzata nel mitocondrio) e la SOD extracellulare (ECSOD) (Tab.I).

Questi enzimi dismutano il superossido in H_2O_2 e ossigeno molecolare attraverso la reazione: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

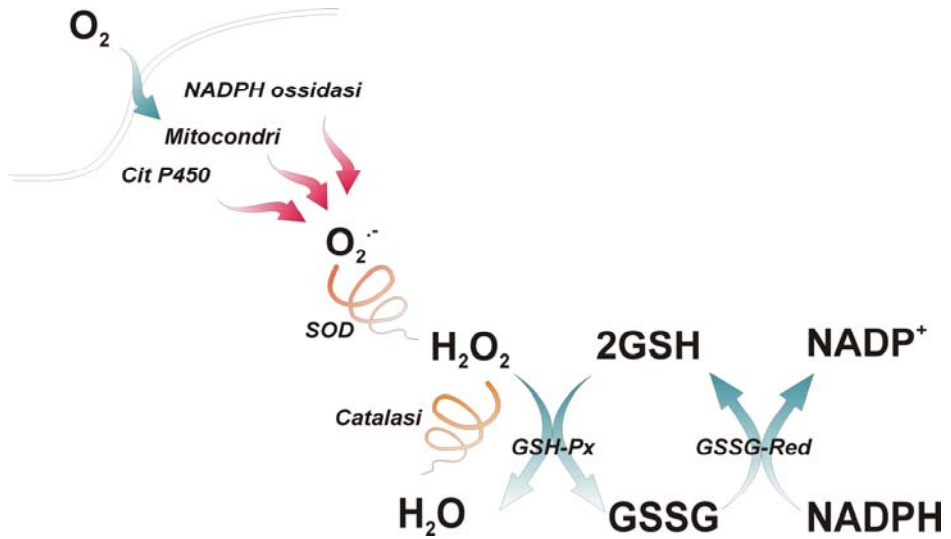
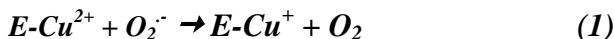


Figura 3. Principali difese antiossidanti enzimatiche. SOD (superossido dismutasi); GSH-Px (glutazione perossidasi); GSSG-Red (Glutazione Redattasi); Catalasi.

La Cu,ZnSOD

L'attività superossido dismutasica negli eucarioti è dovuta all'enzima principalmente citosolico contenente rame e zinco la cui concentrazione *in vivo* ammonta a circa 10 μM . Quest'enzima è costituito da due subunità identiche, ciascuna di 154 amminoacidi e contenente uno ione zinco ed uno ione rame, unite da interazioni deboli non covalenti. La struttura secondaria della Cu,ZnSOD è costituita da foglietti β antiparalleli e presenta due anse che costituiscono il sito di legame allo zinco e il canale elettrostatico attraverso il quale il superossido è guidato verso il sito attivo. Studi di omologia tra enzimi provenienti da specie diverse indicano che numerose regioni sono altamente conservate. Tra queste, oltre al già citato canale elettrostatico, vi è chiaramente la regione legante i metalli. Lo ione Cu^{2+} è legato a quattro imidazoli (His46, 48, 63, 120) in una struttura tetraedrica in cui il quinto legame è occupato da una molecola di solvente (Rotilio et al., 1972). L'His 63 fa da ponte tra gli ioni Cu^{2+} e Zn^{2+} , legando di fatto entrambi. Lo ione Zn^{2+} sembra avere unicamente un ruolo strutturale e i due siti attivi della proteina dimerica sembrano essere ad una distanza tale (30Å) da non interagire l'uno con l'altro.

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



Durante la catalisi si ha la formazione di H_2O_2 , pertanto la funzione antiossidante della Cu,ZnSOD è legata all'attività degli enzimi catalasi e GSH-Px. Dato il ruolo centrale della Cu,ZnSOD nella protezione contro O_2^- , molti studi sono stati effettuati per cercare di comprendere la regolazione dell'enzima. Da questi risulta che la Cu,ZnSOD è altamente influenzata dalla presenza del metallo che ne costituisce il sito attivo.

La disponibilità del rame per specifiche proteine intracellulari è mediata da trasportatori proteici denominati "chaperon" (Valentine et al., 1997). È stata identificata una proteina trasportatrice del rame (CCS) indispensabile per l'incorporazione di questo metallo nel sito catalitico della Cu,ZnSOD

(Culotta et al., 1997). In questo studio è stato dimostrato che esiste una stretta omologia tra la sequenza amminoacidica della Cu,ZnSOD e del CCS compresa la sequenza della Cu,ZnSOD responsabile dell'interazione tra le due subunità. Inoltre, da studi condotti sia *in vitro* sia *in vivo* è stato scoperto un meccanismo di incorporazione del rame che prevede un'interazione proteina-proteina tra la Cu,ZnSOD ed il CCS (Casareno et al., 1998).

Riguardo la sua localizzazione, per anni si è ritenuto questo enzima come localizzato essenzialmente nel citosol (McCord et al., 1969), ma recenti studi hanno dimostrato che la Cu,ZnSOD è localizzata anche nello spazio intermembrana del mitocondrio in lievito (Sturtz et al., 2001) e nel fegato di ratto (Okado-Matsumoto et al. 2001; Iñarrea, 2002). Inoltre, le forme mutate di Cu,ZnSOD sono anch'esse presenti all'interno dello spazio intermembrana mitocondriale (Mattiuzzi et al., 2002), e rimangono intrappolate al loro interno divenendo tossiche per questo compartimento (Ferri et al., 2006), nonché nella matrice mitocondriale nel cervello (Vijayvergiya et al., 2005). In apparenza, la presenza di questa proteina nel mitocondrio sembra in qualche modo ridondante, data la presenza in questo compartimento della MnSOD. Ad avallare questa apparente ridondanza, il dato ormai attestato che il knock-out della MnSOD induce la morte dei topi entro i primi giorni di vita (Huang et al., 1998; Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995). Tuttavia, l'analisi più attenta dei siti di produzione del superossido e l'osservazione che il Complesso III può rilasciare superossido non solo nella matrice mitocondriale, ma anche nello spazio intermembrana (Han et al., 2001; Muller et al., 2004; Adam-Vizi, 2005) ci offre una chiave di lettura per comprendere questo apparente non-senso. Gli studi più recenti riguardanti l'attività della Cu,ZnSOD nel mitocondrio stanno man mano confutando i precedenti riguardo l'esistenza o meno dell'attività della Cu,ZnSOD nello spazio intermembrana. Se i primi dimostravano che la Cu,ZnSOD era comunque attiva in questo compartimento (Okado-Matsumoto et al. 2001; Sturtz et al., 2001), studi più recenti sostengono che essa si attivi solo in seguito a stress ossidativo o comunque in seguito a trattamento con H₂O₂ a basse concentrazioni (Iñarrea et al., 2005; Iñarrea et al., 2007) e che essa venga nuovamente inattivata grazie alla tioredossina riduttasi. Ancora più di recente, è emersa l'ipotesi secondo cui la presenza di Cu,ZnSOD attiva nello spazio intermembrana sia addirittura dannosa, aumentando, paradossalmente, la produzione di ROS al suo interno (Goldsteins et al., 2008).

I ROS e la loro principale sede di sintesi: i mitocondri

I mitocondri rappresentano la maggior fonte di produzione di ROS della cellula. Nel 1973 gli esperimenti di Boveris e Chance dimostrarono che i mitocondri metabolicamente attivi sono in grado di generare ROS (Boveris, 1973) gettando le basi per i successivi 30 anni di studi sui meccanismi di questa produzione. I mitocondri contengono diversi *carrier* redox dai quali, singoli elettroni sfuggiti, reagendo con l'ossigeno, conducono alla produzione di superossido, da cui originano tutti gli altri ROS. Tuttavia, esistono diversi siti di produzione di ROS a livello mitocondriale, non necessariamente legati alla catena di trasporto degli elettroni e dunque alla membrana interna mitocondriale. Un esempio è rappresentato dalle Monoamminossidasi (MAO-A e MAO-B). Questi enzimi svolgono una funzione fondamentale a livello dei mitocondri nel sistema nervoso centrale dato che sono responsabili del turnover di neurotrasmettitori come la dopamina. Le MAO sono proteine localizzate nella membrana esterna mitocondriale le quali, a seguito della loro attività di ossidazione delle ammine biogene, producono H₂O₂. L'eccessiva produzione di H₂O₂ da parte delle MAO è stata messa in relazione con l'insorgenza del danno mitocondriale nella malattia di Parkinson (Kumar et al., 2003), nell'ischemia (Kunduzova et al., 2003), nell'invecchiamento (Maurel et al., 2003) e nei processi di ossidazione di ammine esogene (Carvalho et al., 2002). Alcuni lavori riportano la produzione di H₂O₂ anche da parte di altri enzimi mitocondriali quali la Cyt b5 reduttasi (Whatley et al., 1998), la diidroorotato-deidrogenasi (implicata in uno step della biosintesi dei nucleotidi pirimidinici) (Loffler et al., 1996) o ancora l'alfa-glicero-3-fosfato deidrogenasi (Kwong et al., 1998; Miwa et al., 2003). Recentemente è stata messa in luce un'importante produzione di ROS da parte dell' α -chetoglutarato-deidrogenasi, un enzima che fa parte del ciclo degli acidi tricarbossilici (Starkov et al., 2004; Tretter et al., 2004), la cui aumentata attività è stata correlata all'insorgenza del processo neurodegenerativo (Adam-Vizi et al., 2006). Un'altra proteina in grado di produrre ROS è p66^{Shc}, localizzata nello spazio intermembrana, che, accettando elettroni dal cyt c è in grado di catalizzare la riduzione di O₂ ad H₂O₂ e di indurre apoptosi (Giorgio et al., 2005).

Sede principale di sintesi restano comunque i Complessi I e III a livello della catena di trasporto degli elettroni. Nel Complesso I, gli elettroni

provenienti dal NADH prima riducono l'FMN, poi, attraverso una serie di subunità contenenti centri Fe-S, vengono trasportati all'ubichinone (Q) che viene ridotto a ubichinolo (QH₂) e/o semichinone (QH[•]). Il sito esatto di sintesi di ROS da parte del Complesso I non è stato ancora definito, ma l'FMN, i centri Fe-S e il QH[•] sono considerati le principali sedi da cui possono sfuggire gli elettroni necessari alla formazione di O₂^{•-}. Una molecola in grado di inibire il Complesso I portando alla produzione di ROS, è il rotenone. Questa molecola è in grado di indurre sindromi parkinsoniane nei topi e viene usata su colture per indurre un modello cellulare di Morbo di Parkinson. A questo proposito, questi dati dovrebbero far riflettere sul suo uso massiccio in agricoltura quale “*pesticida biologico*” e porre delle domande in relazione al contemporaneo e significativo aumento di casi di Parkinson giovanile avvenuto negli ultimi anni.

La produzione di ROS da parte del Complesso III sembra abbia maggior importanza fisiologica nel cuore e nei polmoni, molto meno nel cervello. La produzione di O₂^{•-} può avvenire sui siti Q₀ o Q₁ attraverso i quali avviene il trasporto degli elettroni tramite il cyt b.

Per la localizzazione del superossido prodotto, il Complesso I sembra produrlo solo nella matrice mitocondriale. Per il Complesso III, invece, il sito Q₀ sembra rilasciare O₂^{•-} nello spazio intermembrana, mentre il sito Q₁ nella matrice (Muller et al., 2004, Adam-Vizi, 2005). Questa distinzione ha una valenza importante in campo sia teorico che pratico in quanto da una parte può aiutare ad interpretare i dati provenienti dalla letteratura, dall'altra può aiutare a predire dove attendersi il maggior danno provocato dai ROS. Tuttavia, resta ancora questione aperta come l'O₂^{•-} prodotto possa diffondere attraverso le membrane. Indipendentemente dal suo sito di produzione, il superossido è considerato una molecola incapace di attraversare le membrane se non in forma protonata di O₂H[•]. Inoltre, il superossido prodotto nella matrice viene rapidamente dismutato dalla MnSOD ad H₂O₂, che è invece in grado di diffondere rapidamente attraverso le membrane. Il rilascio di superossido dallo spazio intermembrana al citosol può invece avvenire liberamente mediante pori ed in particolare tramite i VDAC (voltage-dependent anion channel) (Mannella, 1998, Han et al., 2003).

In quanto maggior sito di sintesi, i mitocondri possono risultare anche il principale bersaglio dei ROS. Per questo essi sono dotati di una massiccia difesa antiossidante rappresentata *in primis* dalla MnSOD localizzata essenzialmente nella matrice mitocondriale. Anche la Cu,ZnSOD appare localizzata nel mitocondrio, ma nello spazio intermembrana. Riguardo la sua effettiva attività in questa sede, ci sono, invece, pareri discordanti. Così,

l' H_2O_2 prodotta nel mitocondrio (direttamente dal suo metabolismo o indirettamente dalla MnSOD o dalla Cu,ZnSOD) può andare incontro a diversi destini: può essere convertita in OH^\cdot , con la partecipazione di metalli di transizione; può essere ridotta ad H_2O grazie all'azione del sistema GSH/GSHPx; può diffondere fuori dal mitocondrio dove è metabolizzata dall'azione della catalasi nei perossisomi. In ogni caso, il sistema antiossidante rappresentato dal GSH/GSHPx sembra essere il più importante per la protezione del mitocondrio dai ROS (Fernandez-Checa et al., 1997).

Il GSH è importato nel mitocondrio contro gradiente di concentrazione grazie alla presenza di almeno due sistemi di trasportatori, quello del dicarbossilato e quello del 2-ossoglutarato, che in totale sono responsabili per più dell'80% dell'importo (Lash, 2006). Da questo punto di vista, il mantenimento del pool di GSH intra-mitocondriale è fondamentale per l'omeostasi mitocondriale e la sopravvivenza cellulare. Proprio l'alterazione del suo trasporto sembra alla base delle patologie epatiche, soprattutto quando provocate dall'intossicazione da alcol (Lash, 2006; Coll et al, 2003).

I mitocondri possono essere autofagocitati dalle cellule in un meccanismo noto come *mitofagia*. È stato suggerito che i mitocondri che vanno incontro a questo processo sono proprio quelli più danneggiati ossidativamente, quelli la cui funzione alterata può portare all'ancora maggior rilascio di ROS nella cellula. Da questo punto di vista, la cellula innescherebbe la *mitofagia* quale meccanismo di autodifesa dalle proprie fonti ossidanti "impazzite" (Lemasters, 2005).

Coinvolgimento dei ROS nell'equilibrio delle strutture citoscheletriche e implicazioni nella neurodegenerazione

Il citoscheletro è una rete tridimensionale di filamenti proteici che fornisce il sostegno strutturale a una cellula eucariotica (fig. 4). Nelle cellule animali, mancanti di una parete rigida, il citoscheletro ha un'importanza particolare, in quanto contribuisce a mantenerne la forma e dunque la funzionalità cellulare. Esso, infatti, fornisce un'impalcatura per l'organizzazione interna e un punto di ancoraggio per organuli ed enzimi, ma permette anche di compiere alcuni movimenti, più o meno grandi a seconda del tipo cellulare.

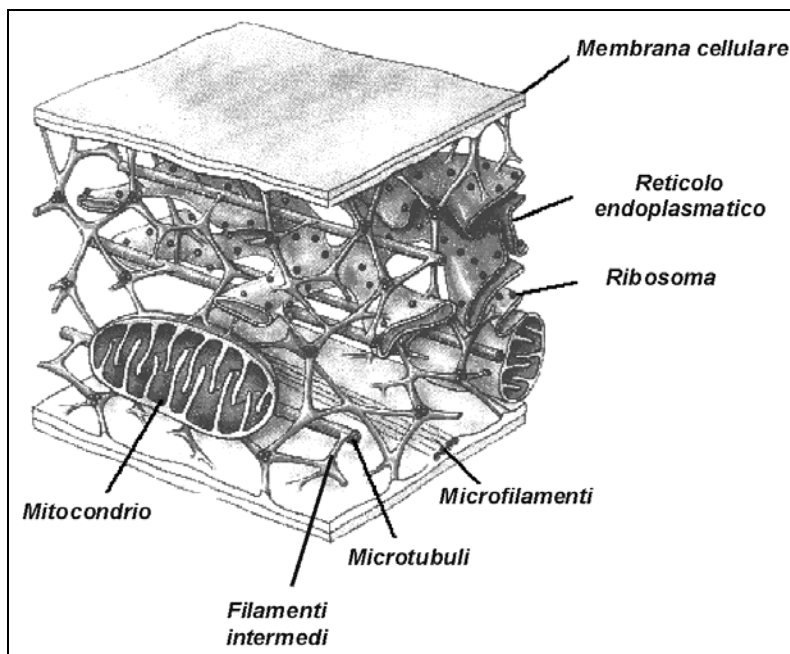


Figura 4. Funzioni del citoscheletro nella cellula. Il citoscheletro crea una rete tridimensionale che supporta la cellula (determinandone la forma) e gli organelli in essa contenuti. Da questa rete dipendono il traffico vescicolare/organelare e la motilità cellulare

Il sistema di filamenti del citoscheletro è divisibile in tre parti: 1) i *microfilamenti* di actina, 2) i *microtubuli* e 3) i *filamenti intermedi*. I primi formano un'elica di monomeri di actina di 8 nm di diametro essenziale per determinare la forma cellulare e il trasporto direzionale. Lo stesso ruolo è assunto dai microtubuli che costituiscono, però, una sorta di tubo cavo di 25 nm di diametro determinato dalla polimerizzazione di monomeri di α - e β -tubulina. In ultimo, i filamenti intermedi sono costituiti da subunità variabili (suddivise in sei classi) in base al tipo cellulare e costituiscono dei fasci di 10 nm di spessore. Oltre a questi principali costituenti, esistono numerose proteine che, associandosi o dissociandosi dalla rete citoscheletrica, sono in grado di indurre rapidi cambiamenti nel grado di stabilità e/o polimerizzazione di actina e tubulina. Le funzioni del citoscheletro possono essere diverse a seconda dei tipi cellulari in esame: può ad esempio garantire la corretta funzione di cellule specializzate quali gli spermatozoi, i neutrofilo e i linfociti, ma anche di cellule apparentemente immobilizzate in monostrati epiteliali. Il citoscheletro è un elemento dinamico che si rimodella fortemente nel corso di ogni divisione cellulare, e che svolge anche un ruolo fondamentale nel traffico intracellulare delle proteine e degli organelli, ad esempio, nel corso della secrezione.

Sempre maggiori evidenze mostrano che molti dei fattori che contribuiscono alle malattie neurodegenerative sono associati ad una disfunzione del citoscheletro (McMurray, 2000). Queste alterazioni possono influenzare direttamente la biogenesi e il traffico vescicolare nonché la segnalazione sinaptica (Lambrechts et al. 2007). La stessa fase di maturazione di moltissime proteine passa attraverso un traffico delle vescicole mediato dal citoscheletro. Tra le malattie neurodegenerative per le quali è stato ipotizzato un coinvolgimento del citoscheletro troviamo sicuramente il Morbo di Alzheimer, la Sclerosi Laterale Amiotrofica e il Morbo di Parkinson.

I Neurofilamenti. Nelle cellule nervose i filamenti intermedi sono noti come *neurofilamenti* e sono costituiti da subunità chiamate NF-L (*light*), NF-M (*medium*) e NF-H (*heavy*) che si assemblano in proporzione 6:2:1 (Nixon et al., 1986; Nixon et al., 1992). Essi sono disposti in fasci longitudinali (rispetto allo sviluppo assonico) e sono uniti da legami crociati che forniscono sostegno meccanico ed impediscono la rottura dell'assone. Si è visto che proprio i neurofilamenti si accumulano in modo anomalo in molte malattie neurologiche (Al-Chalabi et al., 2003; Lambrecht et al., 2007). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che in seguito a stress ossidativo la struttura secondaria di neurofilamenti va incontro alla trasformazione da α -

eliche a foglietti- β e random-coil (Gelinias et al., 2000) e in particolare gli NF-L aggregano in maniera anomala formando caratteristiche fibrille amiloide-simili (Kim et al., 2003). È stato visto, inoltre, che in pazienti affetti da Alzheimer la forma -H dei neurofilamenti va incontro a carbonilazione (Smith et al., 1995).

I Microfilamenti. Lo stress ossidativo può influenzare direttamente lo stato di aggregazione dell'actina in vari tipi cellulari (Dalle Donne et al., 2001a). Infatti, in seguito all'induzione di un forte stress ossidativo tramite la somministrazione di sostanze come i chinoni, si osserva un'alterazione dello stato di aggregazione del citoscheletro caratterizzato dalla frammentazione dell'actina filamentosa (F-actina) e dal conseguente accorciamento dei microfilamenti. I cambiamenti della struttura dell'actina possono essere attribuiti all'induzione di modificazioni di alcuni gruppi sulfidrilici ad essa appartenenti. In particolare il gruppo -SH del residuo Cys374 resta esposto in seguito alla polimerizzazione dell'actina. Esso può, dunque, andare incontro a glutatiolazione sia quando l'actina è ancora in forma monomericata sia quando è già polimerizzata. Il cambiamento dello stato tiolico può influenzare lo stato di aggregazione dei filamenti di actina, permettendo, ad esempio, la formazione di ponti disolfuro intermolecolari. La glutatiolazione della Cys374 sembra essere un evento essenziale al fine di proteggere l'actina dalla formazione di ponti disolfuro inter-molecolari. Ancora, è noto che l'actina può andare incontro a fenomeni di carbonilazione e che ciò inibisce la sua polimerizzazione in microfilamenti (Dalle Donne et al., 2001b). Le isoforme α - e β - dell'actina possono essere carbonilate *in vitro* (Dalle Donne et al., 2001b; Aldini et al., 2005) ed *in vivo*, ad esempio nei muscoli scheletrici di un modello murino di diabete (Oh-Ishi et al., 2003), nei macrofagi esposti ad ipossia (o'Reilly et al., 2003), nei cervelli di pazienti affetti da Morbo di Alzheimer (Aksenov et al., 2001) e nel miocardio di ratti sottoposti ad ischemia/riperfusion (Powell et al., 2001).

I Microtubuli. Anche le due isoforme α - e β - della tubulina possono essere soggette a modificazioni ossidative, peraltro differenti a seconda dell'isoforma e che sembrano riguardare soprattutto i residui più esposti di cisteina o metionina (Boutte et al., 2006; Hosono et al., 2005). Ad esempio il 4-idrossinonenale prodotto dalla perossidazione lipidica induce la disgregazione dei microtubuli in cellule Neuro2A (Neely et al., 1999) derivatizzando direttamente i residui Cys347 e Cys376 dell'isoforma α -, e Cys303 della β - (Stewart et al., 2007). Ancora, molecole pro-ossidanti come il DATS (diallil-trisulfide) possono indurre la formazione di S-

allylmercaptocysteine sulle Cys-12 e Cys-354 della β -tubulina (Hosono et al., 2005). In seguito all'azione del benzochinone, essa può inoltre andare incontro alla formazione di legami inter-catena con conseguente riduzione della lunghezza media dei filamenti dei microtubuli (Santa-Maria et al., 2005). Ancora, i residui di tirosina della α -tubulina possono andare incontro ad un'altra modificazione post-traduzionale quale la nitrificazione che porta alla disfunzione della normale polimerizzazione dei microtubuli (Eiserich et al., 1999; Landino et al., 2007).

Tau. Tra le proteine associate al citoscheletro, quella maggiormente implicata nelle malattie neurodegenerative è Tau. Essa è espressa nelle cellule nervose e fa parte delle cosiddette MAPs (*Microtubules Associated Proteins*). La sua principale funzione è quella di legare e stabilizzare i microtubuli, favorendo la nucleazione di nuovi microtubuli, contrastando gli effetti di agenti che inducono la depolimerizzazione (Delacourte et al., 1997). Essa è normalmente in equilibrio fra la forma defosforilata e quella fosforilata, e la sua associazione coi microtubuli sembra essere possibile solo per le sue forme ipo-fosforilate. La sua iper-fosforilazione conduce ad un cambiamento della sua conformazione che ne determina il distacco dai microtubuli (Li et al., 2004) e l'accumulo nel citosol a causa del conseguente rallentamento della sua degradazione via proteasoma (Poppek et al., 2006). Il suo stato di fosforilazione può essere determinato dall'attivazione di specifiche chinasi come Cdk5, GSK3 β e ERK2 (Mazanetz et al., 2007) o di fosfatasi come PP1, PP2A e PP2B (Tian and Wang, 2002). Le malattie neurodegenerative in cui si riscontra l'accumulo fibrillare di Tau vengono racchiuse sotto il nome di *taupatie*, e sono tutte caratterizzate dalla presenza di disturbi cognitivi e dei movimenti. Prima fra tutte il Morbo di Alzheimer, sono annoverate tra le taupatie anche malattie come l'FTPD-17 (Fronto-Temporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17), il morbo di Pick, la sindrome di Down o la Paralisi Sopranucleare Progressiva (Lee et al., 2001).

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni la funzione fisiologica della Cu,ZnSOD è stata notevolmente rivalutata. L'interesse verso questo enzima si è, infatti, rinnovato nei primi anni '90 quando la sua espressione/attività e l'anione superossido sono emersi come denominatori comuni in numerose malattie e sindromi a carattere neurodegenerativo tra cui l'invecchiamento, l'Alzheimer, il Parkinson e la SLA. In particolare, il 20% dei casi familiari di SLA (fSLA, familial SLA) è associato alla presenza di mutazioni nel gene *sod1*. Per questo motivo, i dati presenti in letteratura derivano soprattutto dallo studio dei mutanti della Cu,ZnSOD, e sono volti a comprenderne i meccanismi della loro patogenicità. Allo stato attuale, si può concludere che la particolare vulnerabilità dei motoneuroni, presente nella fSLA, deriva dalla combinazione di diversi meccanismi, quali un cattivo folding delle proteine mutate, il loro aberrante accumulo nel mitocondrio, il conseguente malfunzionamento mitocondriale ed il danno ossidativo da esso derivante (Boillée et al., 2006; Ferri et al., 2006). Tuttavia, nell'eziologia della fSLA dobbiamo anche includere eventi apparentemente extra-mitocondriali (come il danno al citoscheletro) o extra-cellulari (come i fenomeni infiammatori) (Boillée et al., 2006).

Quanto detto sopra è vero a proposito della fSLA, una patologia associata a mutazioni della Cu,ZnSOD, ma restano ancora da spiegare i fenomeni di danno neuronale derivanti dalla carenza di questa proteina come, ad esempio, nell'invecchiamento. L'incentramento degli studi sui mutanti della Cu,ZnSOD ha per anni lasciato insondata la via dello studio degli effetti della sua down-regolazione, poiché i primi studi condotti sui topi *sod1*^{-/-} avevano accertato che questi animali non sviluppavano la SLA. Va invece considerata la peculiare caratteristica di questo enzima di essere estremamente abbondante (con un'attività dismutasica pari al 90% della totale intracellulare) e stabile, presente nelle cellule ad una concentrazione dell'ordine del μM nonostante un'attività catalitica estremamente elevata ($K_{\text{cat}}=10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (Noor et al., 2002; Bartnikas et al., 2003). Queste caratteristiche aprono il dibattito sull'apparente eccesso di proteina in confronto alla relativamente scarsa disponibilità del suo substrato, il radicale superossido, in assenza di stress e alla sua elevata attività catalitica.

Nei fibroblasti la deplezione cronica di Cu,ZnSOD induce senescenza e nelle cellule HeLa (Blander et al., 2003) come anche nei neuroni spinali (Rothstein et al., 1994), morte cellulare per apoptosi. La sovra-espressione della Cu,ZnSOD protegge le cellule dallo stress ossidativo ed è in grado di allungare l'aspettativa di vita di taluni organismi (Landis et al., 2005; Parker

et al., 2004). Tuttavia, la sovra-espressione della proteina nei topi, è associata a fenomeni di stress ossidativo e riduzione della vita media (Huang et al., 2000). Lo studio dei topi *sod1^{-/-}* ha dimostrato che essi, a differenza dei *sod2^{-/-}*, sono vitali. Tuttavia, questi topi hanno un maggior rischio di epatocarcinogenesi assieme ad un danno ossidativo generalizzato (Elchuri et al., 2005) e motoneuroni più sensibili al danno assonale (Reaume et al., 1996). Due studi dello stesso gruppo (Flood et al. 1999; Shefner et al., 1999) hanno dimostrato una considerevole denervazione dei muscoli scheletrici con un ridotto numero di motoneuroni funzionali. In realtà, un lavoro successivo confuta queste osservazioni facendo notare che le differenze annotate nei topi *sod1^{-/-}* sono attribuibili ai differenti tipi di fibra muscolare osservata e al tipo di muscolo scheletrico preso in considerazione, pur essendo vero che questi sviluppano una minor massa muscolare e corporea (Kostrominova et al., 2007).

Poco è noto riguardo la sequenza degli eventi che seguono alla diminuzione dei livelli intracellulari di Cu,ZnSOD, che, specialmente nei suoi primissimi stadi, non può essere studiata attraverso i topi transgenici, poiché in questi saranno già stati messi in atto meccanismi di compensazione atti a controbilanciarla. Nel corso di questi studi, abbiamo perciò focalizzato la nostra attenzione sul ruolo svolto dalla Cu,ZnSOD nella funzionalità della cellula neuronale in condizioni fisiologiche. Per questo scopo abbiamo messo a punto un efficiente sistema di RNAi per poter adeguatamente abbassare la concentrazione intracellulare della Cu,ZnSOD e studiarne gli effetti in una ristretta finestra di tempo.

Inizialmente abbiamo incentrato la nostra attenzione sugli effetti della carenza di Cu,ZnSOD a livello del compartimento mitocondriale. Il primo scopo è dunque stato quello di chiarire la funzione della Cu,ZnSOD nel mitocondrio, soprattutto alla luce dei dati provenienti dalla letteratura secondo i quali la Cu,ZnSOD sarebbe localizzata nello spazio intermembrana (Kira et al., 2002; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Iñarra et al., 2005) o attorno alla membrana esterna mitocondriale in associazione con la proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004). Alcuni autori hanno anche suggerito che essa sia presente nella matrice mitocondriale (Vijayvergiya et al., 2005). Riguardo la sua funzionalità in questo compartimento, alcuni studi suggeriscono che essa si trovi normalmente inattiva e che venga attivata solo in condizioni di stress ossidativo (Iñarra et al., 2005; Iñarra et al., 2007). In più, come precedentemente accennato, i suoi mutanti si accumulano in maniera aberrante nel mitocondrio danneggiandone la funzione (Ferri et al., 2006). Successivamente, ci siamo interessati agli effetti che la carenza di questa

proteina induce sull'omeostasi del citoscheletro. La Cu,ZnSOD, infatti, è stata trovata associata all'actina nella sua forma WT, ma soprattutto come mutante G93A (Takamiya et al., 2005). In più, è noto che la perdita della funzionalità del citoscheletro si rinviene nella SLA (Fanara et al., 2007). In particolare, i microfilamenti rappresentano uno dei maggiori bersagli dello stress ossidativo, ed è stato proposto che, allo stesso tempo, essi possano regolare la funzionalità mitocondriale attraverso l'interazione con i VDAC (Kusano e al., 2005) e fungere da veicolo per il trasporto degli elettroni spaiati fuori dal mitocondrio (de Oliveira et al., 2007).

MATERIALI E METODI

Materiali

Inibitori delle proteasi, NAC, rotenone, xantina, Xantina Ossidasi, diammidi, agarosio, acrilammide/Bis-acrilammide, proteina A-agarosio, IgG secondarie coniugate alla perossidasi anti-anticorpi di coniglio e topo, anticorpo mouse-monoclonale e rabbit-policlonale anti-actin, anti-catalasi, anti-Cu,ZnSOD, anti- α and anti- β -tubulina, anti-NF-L (NF-68), anti-MnSOD, anti-Bcl-2, anti-p53, anti-Hsp60, tutti gli altri reagenti chimici necessari a costituire i tamponi (lisi, corsa e trasferimento), i terreni di coltura ed i reagenti necessari sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mouse-monoclonale anti-Hsp25 e anti-Hsp27 sono stati acquistati dalla StressGen Biotechnologies Corp. (Victoria, Canada). Rabbit polyclonal anti-P-p38 e anti-P-MKK3/6 sono stati acquistati dalla Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Trizol, Platinum Taq polymerase, M-MLV, i primer per l'RT-PCR, Opti-MEM, DHE, DCF-DA, Alexa Fluor® 488-Phalloidin, Hoechst 33342 e Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse dalla Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Gli siRNA sono stati acquistati dalla MWG-Biotech (Ebersberg, Germany) L'inibitore di p38 SB203580 è stato acquistato dalla Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Glutazione ridotto e ossidato provengono dalla Roche Molecular Biochemicals (Monza, Italia). Il Kit Oxyblot kit è stato acquistato dalla Intergen (Purchase, NY, USA). L'inibitore delle RNAsi (RNAsin) è stato acquistato dalla Promega (Madison, WI, USA).

Colture cellulari

Le linee cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y e di adenocarcinoma gastrico AGS (gastric adenocarcinoma cells) sono state ottenute dalla European Collection of Cell Cultures. Le cellule di melanoma M14 sono state gentilmente donate dalla Dr. Anna Maria Biroccio (Istituto di Ricerca "Regina Elena", Roma, Italia), gli ibridomi NSC34 sono stati donati dal Dr. Neil R. Cashman (University of Toronto, Canada). Le cellule di neuroblastoma CHP100 sono state gentilmente donate dal Prof. Spinedi (Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Italia). La linea SH-SY5Y è stata coltivata in terreno D-MEM-F12 supplementato con FCS al 10%, glutammina 2 mM e 100 U/ml di una soluzione antibiotica costituita da penicillina e streptomina. La linea CHP100 è stata coltivata in RPMI, la linea AGS in F12 e le NSC34 in DMEM, tutti supplementati con FCS al

10%, glutammina 2 mM, e 100 U/ml di una soluzione antibiotica costituita da penicillina e streptomina.

I monostrati cellulari venivano mantenuti a 37°C in atmosfera controllata, al 5% di CO₂ e arrivati a confluenza venivano staccati con una soluzione di tripsina allo 0.25% e la sospensione cellulare centrifugata e riseminata in terreno fresco. L'uso della tripsina è stato sostituito con il distacco meccanico, mediante l'impiego di scraper sterili, solo nel caso in cui le cellule venivano utilizzate per il dosaggio del GSH. E' dimostrato, infatti, che l'uso della tripsina altera il contenuto intracellulare del tripeptide innalzandone i valori e falsando le misure.

La conta cellulare era effettuata utilizzando un emocitometro di Thoma, mentre la vitalità determinata tramite la capacità delle cellule vitali di escludere il colorante Trypan blue (0.016 %). 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 le cellule morte.

Transfezioni

Prima della transfezione, le cellule venivano piastrate alla concentrazione di 4×10^5 cell/ml. 24h dopo il piastramento le cellule erano staccate mediante una soluzione di tripsina allo 0.25%, lavate in Opti-MEM, centrifugate e risospese in una soluzione di OptiMEM, D-glucosio 6mM e β -mercaptoetanolo 0.11mM cui venivano aggiunte le singole sequenze di dsRNA. Le cellule venivano subito elettroporate in apposite cuvette tramite l'elettroporatore Gene Pulser xcell system (Bio-Rad). Successivamente, le cellule venivano ripiastrate in terreno fresco, rispettando la proporzione di 1:1,33 rispetto al volume iniziale. Le sequenze utilizzate sono:

si143: 5'-AAU GGA CCA GUG AAG GUG UGG-3'

si185 (siSod): 5'-AAG GCC UGC AUG GAU UCC AUG-3'

siSod (murina): 5'-AAA UUA CAG GAU UAA CUG AAG-3'

siBcl2: 5'-ACA CCA GAA UCA AGU GUU CCG-3'

siLam: 5'-CUG GAC UUC CAG AAG AAC A-3'

siScr: 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G-3'

Le sequenze *siLam* e *siScr* sono state direttamente fornite dal produttore, mentre le altre sono state dedotte utilizzando il software messo a disposizione dalla MWG-Biotech sul sito: www.mwg-biotech.com. Le sequenze sono state lanciate in BLAST (database: *refseq_rna*) per controllare che esse fossero specifiche per gli mRNA delle proteine in

esame. La sequenza *siScr* non presenta omologia con alcun mRNA umano né murino. L'efficienza di transfezione è stata determinata contrasfettando l'siRNA con oligonucleotidi marcati con rodamina e successiva analisi in citofluorimetria. L'analisi ha mostrato un'efficienza di transfezione >80%.

Trattamenti

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

La *diammide* è un agente in grado di ossidare i tioli e tra questi anche quello del GSH, inibendone direttamente l'azione antiossidante. La diammide è stata aggiunta alle colture cellulari alla concentrazione di 100 μ M subito dopo la transfezione e mantenuta per i tempi sperimentali.

Il *rotenone* è una molecola normalmente utilizzata in agricoltura come insetticida e acaricida estratta dalle radici delle leguminose. Esso induce la produzione di superossido direttamente nel mitocondrio inibendo la catena di trasporto degli elettroni a livello del Complesso I. 24h dopo la transfezione il rotenone è stato aggiunto al terreno di coltura alla concentrazione di 0,5 μ M e mantenuto per i tempi sperimentali.

Il sistema della *xantina/Xantina Ossidasi* è utilizzato per indurre una produzione massiccia di superossido. La xantina, infatti, in presenza di O₂ e Xantina Ossidasi, viene ossidata ad acido urico, con la conseguente riduzione dell'O₂ a O₂⁻. 36h dopo la transfezione è stata aggiunta al terreno di coltura Xantina Ossidasi alla concentrazione di 0,1 U/ml. Dopodiché sono state effettuate otto aggiunte successive di xantina alla concentrazione di 250 μ M. Nel controllo, sono state aggiunte le medesime quantità di Xantina Ossidasi ma non la xantina.

L'inibitore specifico di p38 SB203580 è stato utilizzato alla concentrazione di 20 μ M subito dopo la transfezione e mantenuto per i tempi sperimentali.

Il *NAC* (N-acetyl-L-cysteine) è una forma facilmente permeabile dell'amminoacido cisteina, ed è normalmente utilizzato come antiossidante. Il suo gruppo sulfidrilico, infatti, le conferisce effetti antiossidanti rendendola capace di abbassare i livelli intracellulari di ROS. Esso è stato aggiunto

subito dopo la transfezione al terreno di coltura alla concentrazione di 5mM e mantenuto per i tempi sperimentali.

Determinazione della morte e vitalità cellulare

Marcatura dei nuclei con ioduro di propidio

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

MTS-test

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

Conta diretta mediante esclusione da Trypan blue

Il numero di cellule vitali e di quelle morte è stata anche determinata attraverso conta diretta mediante esclusione da Trypan blue. Le cellule venivano risospese in una soluzione di Trypan blue (0.016%) e contate utilizzando un emocitometro di Thoma. La vitalità era determinata tramite la capacità delle cellule vitali di escludere il Trypan blue. Questo composto, infatti, è in grado di attraversare la membrana plasmatica solo nel caso in cui vi siano delle alterazioni a suo carico, evidenziando in questo modo le cellule morte.

Lisi delle cellule

Per ottenere i lisati totali, i pellet cellulari venivano risospesi in Tampone di Lisi contenente 50mM Tris/HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, cocktail di inibitori delle proteasi, inibitori delle fosfatasi (40 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄).

Per separare le frazioni Triton Solubile (TS) e Triton Insolubile (TI), contenenti rispettivamente le proteine citoplasmatiche e quelle citoscheletriche, abbiamo utilizzato il protocollo pubblicato in Xie et al., 1998. Brevemente, i pellet cellulari venivano risospesi in Tampone di Estrazione (80mM MES, pH 6.8, 1mM MgCl₂, 2mM EGTA, 30% Glicerolo, 0.1% Triton X-100, cocktail di inibitori delle proteasi, 40 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄), incubati a 37°C per 15min e centrifugati a 16.000g per 1min. Il super rappresenta la frazione TS e il pellet la frazione TI. Quest'ultima veniva risospesa in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 12mM acido deossicolico, cocktail di inibitori delle proteasi, 40 mM NaF, 1mM Na₃VO₄) per solubilizzarne le componenti.

La frazione nucleare è stata ottenuta lisando i pellet in Tampone NP-40 (0,5% Nonidet P-40, 0.5M Saccarosio, 15mM Tris, pH 7.5, 60mM KCl, 0.25mM EDTA, 0.125mM EGTA, 0.5mM Spermina, 0,125mM Spermidina, 40mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, cocktail di inibitori delle proteasi). Le cellule venivano risospese in Tampone NP-40, incubate in ghiaccio per 5min e poi centrifugate a 600g per 5min a 4°C. I pellet venivano lavati tre volte nello stesso tampone e poi lisati in Tampone di Lisi.

La frazione mitocondriale è stata ottenuta risospendendo prima i pellet cellulari in 0.2ml di tampone ipotonico (10mM Tris/HCl pH 7.5, 15mM MgCl₂, 10 mM KCl e cocktail di inibitori delle proteasi). Dopo 10min di

incubazione in ghiaccio, venivano aggiunti eguali volumi di tampone mitocondriale (400mM Saccarosio, 10mM TES, 0.1mM EGTA, and 2 μ M DTT, pH 7.2) e le cellule rotte con 20 passaggi in pestello Dounce. I supernatanti ottenuti venivano centrifugati a 900g per 10min e i super così ottenuti ricentrifugati a 10.000g per 10min per separare i mitocondri (pellet) dal citosol (super). I mitocondri sono poi stati lisati in RIPA buffer.

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

Determinazione delle proteine totali

La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951). Il metodo consiste nella riduzione, in una soluzione alcalina con ioni Cu^{2+} , di alcuni residui, per mezzo del reattivo di Folin-Ciocalteu. Gli amminoacidi principalmente ridotti sono il triptofano, la tirosina, la cisteina e l'istidina. Il triptofano e la tirosina reagiscono per mezzo dei loro gruppi fenilici particolarmente reattivi, la cisteina attraverso il gruppo $-\text{SH}$ e l'istidina con l'anello imidazolico. Il prodotto della reazione di riduzione è evidenziato dalla formazione di composti colorati in azzurro che hanno 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 BSA come standard.

Determinazione del glutatone mediante HPLC

Il dosaggio del glutatone 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).

Le cellule sono state accuratamente lavate con PBS centrifugate a 700g per 7min e conservate a -80°C . Al momento della determinazione del glutatone, le cellule sono state risospese in tampone riducente costituito da PBS/HCl 0.01M 1/1. Il lisato cellulare era ottenuto mediante cicli ripetuti di congelamento in azoto liquido. Le proteine sono state precipitate in acido metafosforico al 5%. Dopo centrifugazione a 22300g per 30min., i tioli a

basso peso molecolare presenti nel supernatante, venivano derivatizzati con acido iodoacetico al 10% v/v (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 all'1.5% v/v (1.5ml/98.5ml di etanolo assoluto). Dopo aver aggiunto il reattivo di Sanger, i campioni venivano incubati per 12h al buio e la separazione dei tioli era eseguita su una colonna da HPLC $\mu\text{Bondpack NH}_2$, 3.9×300 mm (Waters). GSH e GSSG purificati sono stati usati come standard. I risultati sono espressi come nmoli di GSH/mg di proteine presenti nel campione lisato.

Determinazione dei ROS intracellulari

Per saggiare il contenuto intracellulare di ROS, sono state utilizzate metodiche citofluorimetriche che prevedono la marcatura delle cellule con 2,7 diclorofluoresceina (DCF), un fluorocromo in grado emettere fluorescenza solo in seguito a reazione chimica con i radicali dell'ossigeno (H_2O_2 , O_2^- , OH^\cdot). L'intensità di fluorescenza misurata dal citofluorimetro è stata rapportata a controlli negativi e positivi costituiti rispettivamente da cellule non marcate e da cellule trattate con tert-butil idroperossido (*t*-but-OOH) $100\mu\text{M}$, molecola ossidante in grado di produrre radicali. In seguito ad incubazione con 2,7 DCF-DA (la forma in grado di attraversare la membrana plasmatica, sciolta in dimetil solfossido) per 30 min a 37°C , le cellule venivano centrifugate lavate con cura e risospese in PBS. La produzione di ROS, di 10000 cellule per ogni campione, veniva quindi quantificata in base allo spostamento dell'intensità della fluorescenza della popolazione cellulare marcata con 2,7 DCF.

La determinazione del contenuto di superossido è stata eseguita tramite l'uso del *diidroetidio* (DHE), un marcatore specifico per questo radicale. Il diidroetidio, una volta ossidato, si trasforma in etidio, esibendo fluorescenza nel rosso. Lo spostamento è direttamente proporzionale al quantitativo di O_2^- contenuto nelle cellule. L'incubazione avveniva con $5\mu\text{M}$ DHE per 30 min a 37°C . Dopodiché, le cellule venivano centrifugate, lavate con cura e risospese in PBS. La quantità di radicale superossido valutata su 10.000 cellule per ogni campione veniva quantificata in base allo spostamento dell'intensità di fluorescenza della popolazione cellulare marcata con diidroetidio.

Determinazione della funzionalità mitocondriale

Per determinare la funzionalità mitocondriale ci siamo avvalsi di due tecniche: la prima permette di valutare il potenziale transmembrana mitocondriale tramite l'uso della sonda fluorescente TMRE (tetra-methyl-rhodamine-ethyl ester), la seconda di quantificare i livelli intracellulari di ATP.

Per la determinazione del potenziale transmembrana, le cellule sono state incubate con TMRE 200 nM per 30 min a 37°C. Successivamente, sono state staccate, lavate e risospese in PBS per la determinazione citofluorimetrica. L'intensità di fluorescenza di 10.000 cellule è stata analizzata tramite il citofluorimetro FACScalibur e i dati analizzati utilizzando il software WinMDI 2.8.

Per la determinazione del contenuto di ATP ci siamo avvalsi dell'ATP Bioluminescence Kit (Sigma). Gli estratti cellulari sono stati analizzati sfruttando la reazione di adenilazione della luciferina catalizzata in maniera ATP-dipendente dall'enzima luciferasi. L'adenil-luciferina così formata, in presenza di ossigeno molecolare, viene ossidata ad ossiluciferina emettendo luce. La concentrazione di ATP dei campioni è stata determinata sulla base di una retta standard.

Misura delle proteine carbonilate

Le proteine carbonilate sono state identificate derivatizzando i carbonili, eventualmente formati sui gruppi laterali delle proteine, con dinitrofenilidrazina (DNP) per 15 min a 37°C. In seguito i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12% e le proteine carbonilate sono state identificate mediante immunoblot attraverso l'uso di un anticorpo policlonale anti-DNP. Come controlli negativi sono stati utilizzati campioni non derivatizzati. La derivatizzazione è stata possibile grazie al kit *OxyBlot*[®].

Immuno-elettroforesi (Western blotting)

Per tutte le proteine prese in esame in questo studio, la quantità di proteine immunoreattive è stata determinata mediante elettroforesi su gel di

poliacrilammide in fase denaturante (SDS-PAGE), seguita da trasferimento su membrana di nitrocellulosa.

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

Le concentrazioni di anticorpo primario usate sono state le seguenti: anti-Cu,ZnSOD (1:2000), anti-MnSOD (1:5000), anti-Actina (1:5000), anti- α -Tubulina (1:5000), anti- β -Tubulina (1:5000), anti-p38 (1:2000), anti-P-p38

(1:1000), anti-P-MKK3/6 (1:1000), anti-Catalasi (1:2000), anti-Hsp25 (1:2000), anti-Hsp27 (1:2000), anti-Hsf1 (1:5000), anti-P-Cdk5 (1:500), anti-p35 (1:500), anti-Tau (1:2000), anti-Bcl2 (1:1000), anti-p53 (1:1000), anti-Hsp60 (1:5000). Gli anticorpi secondari HRP-coniugati sono stati usati in un range di concentrazione da 1:3000 a 1:10000.

Marcatura delle cellule per immunofluorescenza

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

Il protocollo usato prevede il fissaggio delle cellule su vetrino. Per fare questo, le cellule sono state fatte crescere in piastre per colture cellulari a 6 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% per 10 minuti, in modo da fissare le cellule. Ad ogni passaggio successivo e tra un passaggio e l'altro i vetrini verranno risciacquati con soluzione di PBS. Nel passaggio successivo, i vetrini sono stati ricoperti con una soluzione di PBS/Triton X-100 0,4% per 10min, in modo da permeabilizzare le membrane cellulari. In seguito sono stati sottoposti ad un'operazione di bloccaggio delle interazioni aspecifiche per 30min con una soluzione di PBS/FBS 10%. A questo punto si lasciano asciugare i vetrini e poi si trattano con una soluzione di anticorpo primario (1:50 in PBS/FBS 10%) per 30min. Poi, i vetrini vengono trattati ancora per 30min con una soluzione di anticorpo secondario marcato con un fluorocromo (1:1000 in PBS/FBS 10%). L'ultimo passaggio prevede l'aggiunta un marcatore del DNA, l'Hoechst, 1:1000 in PBS/FBS 10% per 10min. Il vetrino coprioggetti verrà poggiato su un portaoggetti interponendo una goccia di una soluzione PBS/Glicerolo 1:1 ed è così pronto per essere osservato al microscopio a fluorescenza (Nikon). Essendo quest'ultimo, collegato ad una videocamera digitale (CoolSnap) abbiamo la possibilità di ottenere delle immagini digitalizzate da analizzare.

Nel caso della marcatura del citoscheletro al posto degli anticorpi è stata usata una tossina di origine fungina (Falloidina) marcata con un fluorocromo, che lega specificatamente l'actina filamentosa.

Gel di attività per la misurazione dell'attività della Cu,ZnSOD

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

Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è una tecnica che permette di evidenziare l'esistenza di interazioni dirette o indirette tra proteine. Dato che le interazioni fra proteine non sono sempre forti, come quelle mediate da legami covalenti, ma anzi spesso sono deboli e temporalmente limitate, le cellule devono essere lisate in un tampone idoneo a preservarle. Per questo, spesso si utilizza il RIPA buffer. I lisati cellulari vengono incubati con un anticorpo primario che riconosce una sola delle proteine in esame. Dopo alcune ore di incubazione in rotazione (da 2 a 24h) a 4°C, in presenza dell'anticorpo primario, i lisati vengono incubati per 2h con proteina A legata a delle beads di agarosio o sefarosio. Questa è in grado di interagire con l'anticorpo, che a sua volta avrà legato la proteina riconosciuta. Dopo breve centrifugazione, le beads vengono recuperate, lavate con RIPA buffer e risospese in un volume noto di Sample

Buffer. Dopo bollitura, gli immunoprecipitati vengono caricati su SDS-PAGE e sottoposti a Western blot. A questo punto, per vedere se esiste l'interazione tra la proteina immunoprecipitata ed un'altra in esame, si marcano le lastrine con anticorpi idonei a riconoscere quest'ultima. Per evitare cross-reattività tra l'anticorpo usato per l'immunoprecipitazione e quello utilizzato per l'immunoblot, si usa immunoprecipitare con un anticorpo prodotto in topo e rilevare con uno prodotto in coniglio.

Nel nostro caso, i lisati sono stati centrifugati a 3500g per 20min e 400 µg di proteine sono state incubate con 1µg di anticorpo primario anti-Cu,ZnSOD o anti-Bcl-2 a 4°C per tutta la notte. Gli anticorpi sono stati precipitati con 10µl di proteina A agarosio, e le beads lavate tre volte in RIPA buffer, risospese in Laemmli buffer (Sample Buffer) e bollite per 5min. Gli immunoprecipitati sono stati caricati su gel di acrilammide al 12% e dopo Western blot, le lastrine sono state incubate con anticorpi anti-Bcl-2 e anti-P-Bcl-2.

La stessa tecnica e le stesse modalità sono state utilizzate per rilevare il contenuto di Bcl-2 carbonilata. Dopo l'immunoprecipitazione con anti-Bcl-2, gli immunoprecipitati sono stati derivatizzati con DNP e poi caricati su gel d'acrilammide al 12%. L'immunoblot è stato condotto marcando le lastrine con anti-DNP.

RT-PCR

Per determinare la concentrazione degli RNA di Cu,ZnSOD, actina e GAPDH ci siamo avvalsi della tecnica dell'RT-PCR. La tecnica si basa sulla retrotrascrizione degli RNA estratti dalle cellule (RT) e successiva amplificazione di alcuni di essi mediante l'uso di appropriati oligonucleotidi-primer (PCR, *polymerase chain reaction*). La tecnica si valuta come semi-quantitativa, dato che, come per i western blotting, si utilizza un marker di caricamento che è anche un riferimento della parità di condizioni di amplificazione in PCR.

Gli RNA totali sono stati preparati tramite l'uso del reagente Trizol (Invitrogen), seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. Al termine dell'estrazione, l'RNA estratto veniva quantizzato mediante risospensione in H₂O sterile e lettura allo spettrofotometro alle $\lambda=260$ e $\lambda=280$. La seconda lettura veniva effettuata per determinare la purezza

dell'RNA estratto. In particolare, si consideravano delle estrazioni di buona qualità quelle il cui rapporto delle assorbanze (A_{260}/A_{280}) era maggiore di 1,6. 3 μ g dell'RNA così preparato venivano sottoposto a RT in presenza della trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen) condotta in presenza di inibitori delle RNasi (RNasin, Promega) a 37°C per 1h. Il retrotrascritto così ottenuto veniva sottoposto a 35 cicli di PCR (composti da: 15sec melting a 95°C, 30sec annealing a 55°C, 1min 20sec estensione a 72°C) in presenza di Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e dei seguenti primer:

β -actina-fwd: 5' ATGGATGATGATATCGCCGCGC 3';
 β -actina-rev: 5' CTAGAAGCATTGCGGTGGACG 3';
Cu,ZnSOD-fwd: 5' ATGGCGACGAAGGCCGTGTG 3';
Cu,ZnSOD -rev: 5' GATCCCAATTACACCACAAGCC 3';
GAPDH-fwd: 5' CTCCTCCACCTTTGACGCTG 3';
GAPDH-rev: 5' CCACCCTGTTGCTGTAGCCA 3'.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati caricati su gel di agarosio all'1% in presenza del marcatore di DNA Bromuro di Etidio e usando marker di pesi molecolari adeguati a riconoscere le lunghezze dei DNA amplificati. L'amplificazione dava, come atteso, dei prodotti di lunghezza di 1128bp per la β -actina, 495bp per la Cu,ZnSOD e 100bp per la GAPDH.

Analisi statistica dei dati

Tutti i dati presentati sono espressi come media \pm deviazione standard (S.D.). Per determinare la significatività dei dati è stato utilizzato il test 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 % ($p < 0.05$).

RISULTATI

***EFFETTI DELLA DOWN-REGOLAZIONE DELLA
CU,ZNSOD SULL'OMEOSTASI MITOCONDRIALE***

Scelta della miglior sequenza di dsRNA per indurre la down-regolazione dell'espressione della Cu,ZnSOD

Allo scopo di abbassare l'espressione e dunque il contenuto intracellulare della Cu,ZnSOD ci siamo avvalsi della tecnica dell'RNA interference (RNAi). A questo fine, cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state transfettate transientemente con due diversi RNA a doppio filamento (*dsRNA* = *double stranded RNA* o *siRNA* = *small interference RNA*) le cui sequenze corrispondevano con l'RNA messaggero della Cu,ZnSOD (*si143*, *si185*). Il controllo dell'espressione della Cu,Zn SOD è avvenuto tramite Western blot a 48h dalla transfezione. Non sono stati presi in esame tempi più lunghi poiché è noto che l'effetto dell'RNAi si perde con le successive divisioni cellulari.

La sequenza *si185* è risultata la più idonea ad indurre l'RNAi per la Cu,ZnSOD (Fig.1A); per questo è stata utilizzata per tutti gli esperimenti successivi e rinominata per semplicità *siSod*. Come controllo negativo è stata usata una sequenza casuale - che non corrisponde con alcun mRNA intracellulare - (*siScr*) e cellule non transfettate, che hanno dimostrato di comportarsi come le *siScr*. Come controllo positivo è stata utilizzata una sequenza contro la Lamina A (*siLam*), una proteina strutturale localizzata sulla parete interna dell'involucro nucleare (Fig. 1B).

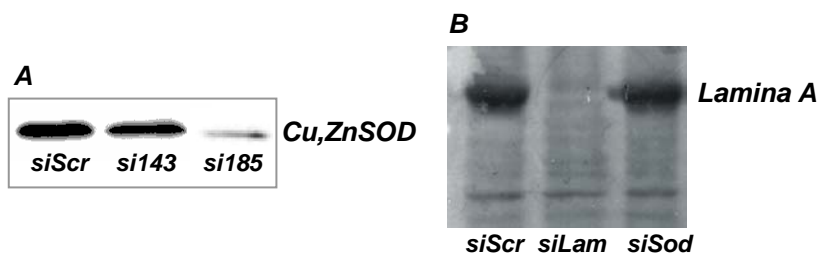


Figura 1. Controllo dell'efficienza delle sequenze *si143* e *si185* nella down-regolazione della Cu,ZnSOD.

A) 10 μ g di estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per rivelarne il contenuto di Cu,Zn SOD. B) 20 μ g di estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per rivelarne il contenuto di Lamina A. I Western blot sono rappresentativi di 5 che hanno dato i medesimi risultati.

La down-regolazione della Cu,ZnSOD non influenza la vitalità cellulare in condizioni basali

Dati presenti in letteratura hanno dimostrato che il decremento della Cu,ZnSOD indotta tramite RNAi induce senescenza in cellule di fibroblasto umano (Balnder et al., 2003). Per verificare se anche nel nostro modello sperimentale si verificassero queste condizioni abbiamo condotto esperimenti di transfezione e successiva conta delle cellule vitali. Le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con le sequenze *siSod* e *siScr*. I livelli di Cu,ZnSOD sono stati osservati a 24 e 48h tramite Western blot (Fig.2, sinistra). L'analisi densitometrica delle bande immunoreattive, calcolate normalizzando per i livelli di α -Tubulina, mostra che il decremento dei livelli proteici di Cu,ZnSOD è del $40 \pm 2\%$ a 24h e $80 \pm 5\%$ a 48h (Fig.2, destra).

Per verificare se il decremento della Cu,ZnSOD potesse determinare dei cambiamenti di espressione di altre proteine coinvolte nei processi di detossificazione dai ROS abbiamo analizzato gli stessi estratti proteici per il contenuto di MnSOD e Catalasi, le quali non sembrano essere influenzate dal decremento di Cu,ZnSOD (Fig.2).

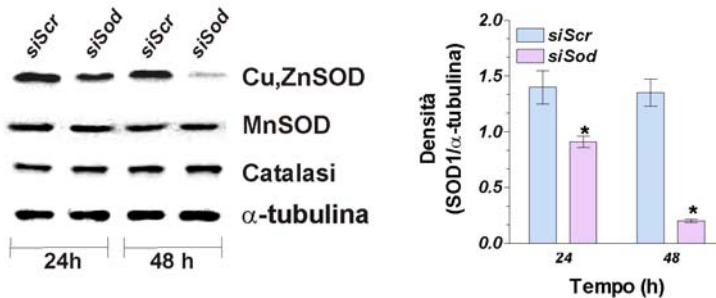


Figura 2. Controllo dell'espressione di altri enzimi antiossidanti dopo RNAi.

Le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con *siScr* e *siSod*. 24 e 48h dopo la transfezione sono state lisate, e 10 μ g di estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per rilevarne il contenuto di Cu,ZnSOD, Mn SOD, Catalasi e α -tubulina (*a sinistra*). Le densità delle singole bande di Cu,ZnSOD è stata normalizzata per i valori ricavati per l' α -tubulina (*a destra*) (Barre, media \pm D.S. n=10, *P<0.001).

Al fine di verificare se la carenza di Cu,ZnSOD fosse una condizione in grado di influenzare la vitalità e la crescita cellulare, sono stati utilizzati due differenti metodi di analisi: “MTS-test” (basato sulla riduzione di un composto tetrazolico a sale di formazano mediata dall’azione delle deidrogenasi) e conta diretta cellulare mediante esclusione da Trypan blue (che permette di identificare le cellule vitali in quanto non colorate di blu). A questo scopo, a 24 e 48h dalla transfezione le cellule SH-SY5Y transfettate con *siSod* e *siScr* sono state trattate con MTS e l’assorbanza misurata a 490nm di lunghezza d’onda. Dall’analisi condotta è emerso che le cellule *siSod* mostrano livelli di vitalità comparabili a quelli delle cellule transfettate con *siScr* (Fig.3A). A 48h, le stesse cellule sono state tripsinizzate e contate in microscopia ottica mediante esclusione da Trypan blue. Anche in questo caso, le cellule transfettate con la sequenza *siSod* mostrano vitalità cellulare comparabile a quelle transfettate con *siScr* (Fig.3B).

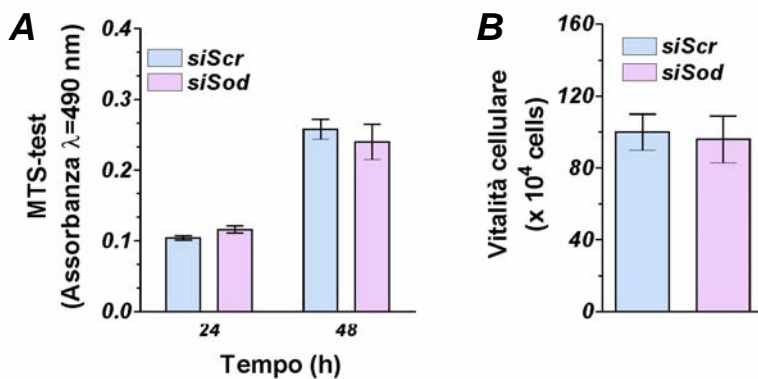


Figura 3. Analisi della vitalità cellulare dopo decremento della Cu,ZnSOD.

A) 24 e 48h dopo la transfezione, le cellule SH-SY5Y sono state incubate con MTS, l’assorbanza è stata determinata a $\lambda=490$ nm e riportata in grafico (Barre, media \pm D.S.; n=6). **B)** 48h dopo la transfezione le cellule sono state tripsinizzate e contate per esclusione da Trypan blue. Le cellule non colorate, e dunque vitali, sono state riportate nel grafico (Barre, media \pm D.S.; n=6).

Il lavoro di Blander del 2003 aveva dimostrato che in carenza di Cu,ZnSOD si aveva l’attivazione della proteina p53. Essa rappresenta un marker molecolare implicato nella regolazione del ciclo cellulare e sensibile al danno al DNA. Il mantenimento della vitalità cellulare delle cellule *siSod*

rispetto alle *siScr* ha trovato corrispondenza nell'assenza di accumulo della proteina p53 a 48h dalla transfezione (Fig.4), che conferma ulteriormente la mancata alterazione del ciclo cellulare.



Figura 4. Controllo dell'espressione di p53 in seguito al decremento della proteina Cu,ZnSOD.

Le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con le sequenze *siSod* e *siScr*. 48h dopo la transfezione, sono state lisate, e 20µg di estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per rilevarne il contenuto di p53 e di α-tubulina. Il Western blot è rappresentativo di 3 che hanno dato i medesimi risultati.

La down-regolazione della Cu,ZnSOD induce morte cellulare in presenza di stress-ossidativo

Per verificare se il decremento di Cu,ZnSOD portasse ad una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo, le cellule SH-SY5Y, transfettate con le sequenze *siScr* e *siSod*, sono state sottoposte a un flusso extracellulare di superossido. A questo scopo, 36h dopo la transfezione è stata aggiunta al terreno di coltura *Xantina Ossidasi* alla concentrazione di 0,1 U/ml. Dopodichè sono state effettuate otto aggiunte successive di *xantina* alla concentrazione di 250µM. 12h dopo l'ultima aggiunta di *xantina*, le cellule sono state tripsinizzate e contate per esclusione da Trypan blue. Come mostrato in Fig.5, le cellule *siSod* risultano molto più sensibili allo stress ossidativo rispetto alle *siScr*. Infatti, a 12h dall'ultimo flusso di superossido, la morte cellulare nelle *siSod* risulta del $74 \pm 6\%$, mentre nelle *siScr* solo del $25 \pm 5\%$.

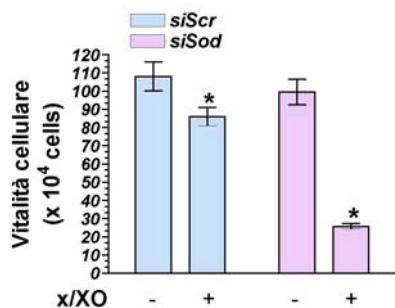


Figura 5. Analisi della vitalità cellulare dopo stress ossidativo.

36h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a flusso di superossido extracellulare tramite trattamento con xantina/Xantina Ossidasi. L'analisi della vitalità è stata condotta tramite conta diretta cellulare per esclusione da Trypan blue. (Barre, media \pm D.S.; n=5; *p<0.001).

La down-regolazione della Cu,ZnSOD provoca solo un piccolo aumento intracellulare di superossido a 48h dalla transfezione

Il decremento di Cu,ZnSOD potrebbe condurre ad un accumulo intracellulare di radicale superossido e al conseguente incremento del danno cellulare mediato da ROS. Per verificare se questa condizione si verifichi anche nel nostro modello cellulare, abbiamo misurato la concentrazione di ROS 48h dopo la transfezione delle cellule SH-SY5Y con *siScr* e *siSod*. La concentrazione dei ROS, e in particolare di radicale superossido, è stata determinata tramite analisi citofluorimetrica dopo incubazione con la sonda fluorescente DHE (*diidroetidio*). L'analisi citofluorimetrica ha mostrato solo un piccolo ma significativo aumento di superossido nelle cellule *siSod* ($5.0 \pm 0.2\%$) rispetto alle *siScr* (Fig.6).

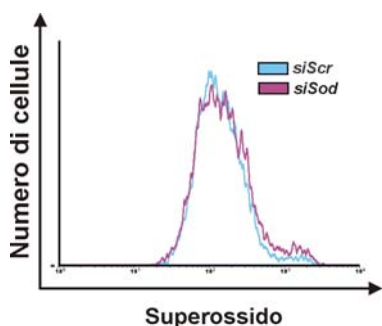


Figura 6. Analisi della concentrazione di superossido in seguito a decremento della Cu,ZnSOD.

48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state incubate con DHE e tripsinizzate. L'analisi della fluorescenza è stata condotta in citofluorimetria. L'istogramma è rappresentativo di 10 esperimenti che hanno dato risultati analoghi. L'incremento di superossido è pari al $+5 \pm 0,2\%$ (n=10; p<0.05)

La down-regolazione della Cu,ZnSOD provoca un aumento intracellulare dell'antiossidante tripeptidico GSH

Esperimenti precedentemente condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le cellule SH-SY5Y overesprimenti un particolare mutante della Cu,ZnSOD, H46R, dotato di una diminuita attività catalitica di dismutazione, mostrava un aumento significativo dell'antiossidante tripeptidico GSH (Ciriolo et al., 2001).

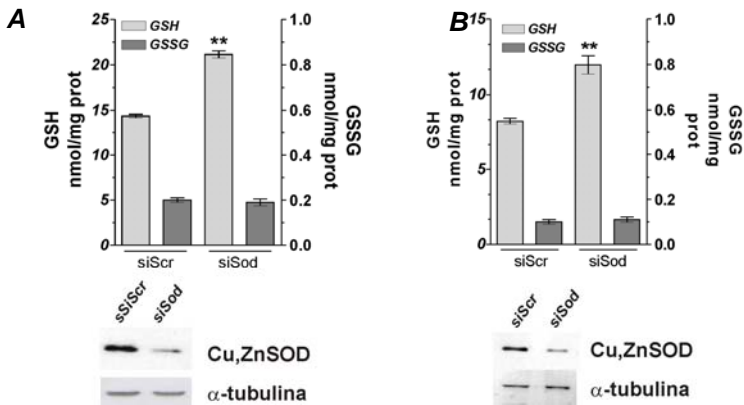


Figura 7. Analisi della concentrazione GSH dopo RNAi su due differenti linee di neuroblastoma umano.

48h dopo la transfezione i lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi mediante HPLC per verificare il contenuto di GSH e GSSG. 10 μ g di proteine degli stessi lisati sono stati sottoposti a Western blot per verificare l'avvenuto calo della Cu,ZnSOD in seguito a RNAi. **A)** Analisi condotta sulle cellule SH-SY5Y. **B)** Analisi condotta sulle cellule CHP100. (Barre, media \pm D.S.; n=4; **p<0.001).

Per verificare se anche nel nostro modello sperimentale di carenza di attività della Cu,ZnSOD determinata dalla sua diminuzione, le stesse cellule di neuroblastoma mostrassero un aumento di questo antiossidante, abbiamo determinato la concentrazione intracellulare di GSH tramite analisi cromatografica mediante HPLC. 48h dopo la transfezione le cellule *siSod* mostravano un aumento di GSH pari al $47 \pm 2\%$ rispetto alle cellule *siScr* (Fig.7A). Per verificare se l'aumento fosse tipico di questa linea di

neuroblastoma, la stessa analisi è stata condotta su un'altra linea cellulare umana di origine neuronale a nostra disposizione (CHP100). Anche in questo caso abbiamo potuto verificare un aumento di GSH pari al $45 \pm 5\%$ nelle cellule *siSod* rispetto alle *siScr* (Fig.7B). In entrambe le linee cellulari l'aumento di GSH non è stato accompagnato da un aumento di GSSG, la forma ossidata del tripeptide.

L'aumento di GSH è responsabile dei bassi livelli intracellulari di superossido e del mantenimento della vitalità cellulare

Al fine di verificare se l'aumento di GSH (Fig.7) avesse un ruolo diretto nel mantenimento dei bassi livelli intracellulari di superossido (Fig.6), e dunque protettivo per la vitalità cellulare (Fig.3), abbiamo trattato le cellule SH-SY5Y precedentemente transfettate con *siScr* e *siSod* con due diversi agenti in grado di alterare la concentrazione di GSH intracellulare. In particolare, abbiamo usato la BSO (*butionilsulfossimmina*), un inibitore della γ -glutamilmcisteina sintetasi al fine di inibire direttamente la sintesi di GSH, e la *diammide*, un composto permeabile in grado di ossidare il GSH intracellulare e dunque annullarne la funzione antiossidante.

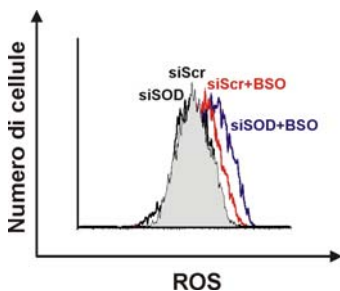


Figura 8. Analisi della concentrazione di ROS dopo trattamento con BSO.

Subito dopo la transfezione le cellule SH-SY5Y sono state trattate con BSO 1mM. 48h sono state incubate con DCF-DA e tripsinizzate. L'analisi della fluorescenza è stata condotta in citofluorimetria. L'istogramma è rappresentativo di 3 che hanno dato risultati comparabili.

Dopo il trattamento con BSO 1mM, aggiunta subito dopo la transfezione, le cellule *siSod* e *siScr* sono state marcate con DCF-DA e analizzate in citofluorimetria. Come mostrato in Fig.8, in presenza di BSO, le cellule *siSod* evidenziano una maggior quantità di ROS intracellulari rispetto alle

cellule *siScr*. Allo stesso modo, a 24h dalla transfezione, e per le 24h successive, le cellule sono state trattate con diammidite 100 μ M. Le cellule sono poi state tripsinizzate e la loro vitalità è stata valutata tramite conta per esclusione da Trypan blue.

Come è possibile vedere dalla Fig.9, in seguito a trattamento con diammidite le cellule *siSod* risultano molto più sensibili delle *siScr* alla deplezione di GSH ridotto. Infatti, il 63 \pm 4% delle cellule *siSod* vanno incontro a morte cellulare contro solo il 15 \pm 4% delle cellule *siScr*.

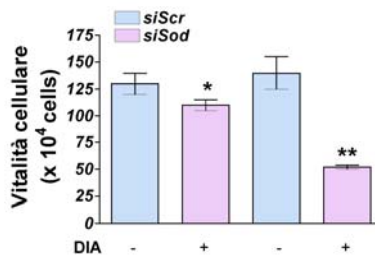


Figura 9. Analisi della vitalità cellulare dopo decremento di Cu,ZnSOD e trattamento con diammidite.

A 24h dalla transfezione le cellule SH-SY5Y sono state trattate con diammidite (DIA) 100 μ M. 24h dopo, le cellule sono state tripsinizzate e contate per esclusione da Trypan blue (Barre, media \pm D.S.; * p <0.05; ** p <0.001).

Il decremento di Cu,ZnSOD induce l'accumulo di proteine carbonilate

Una conseguenza dell'aumento intracellulare di ROS è l'ossidazione delle proteine. Generalmente ciò avviene in quanto i ROS possono ossidare specifici residui amminoacidici portando alla formazione di modificazioni ossidative come la carbonilazione. Al fine di verificare se il decremento di Cu,ZnSOD dopo RNAi fosse sufficiente a indurre un danno di tipo carbonilativo, 48h dopo la transfezione le cellule sono state tripsinizzate e lisate, e 5 μ g di proteine sono stati derivatizzati con DNP (*dinitrofenilidrazina*), che è in grado di reagire con i gruppi carbonilici. Successivamente, 5 μ g di proteine derivatizzate sono state separate per SDS-

PAGE e, dopo Western blot, le bande immunoreattive sono state rivelate grazie ad un anticorpo α -DNP.

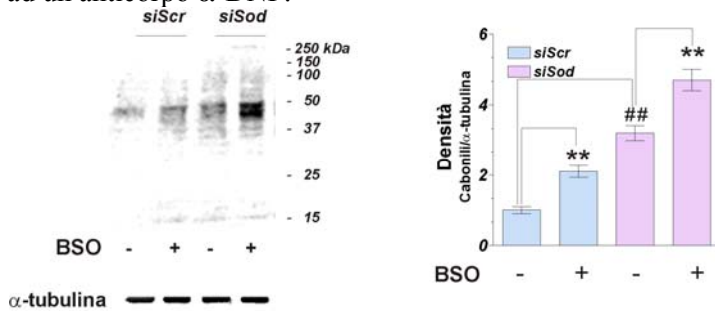


Figura 10. Analisi del contenuto di proteine carbonilate dopo decremento della Cu,ZnSOD e trattamento con BSO.

A 48h dalla transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state lisate, 5 μ g di proteine sono stati derivatizzati con DNP, sottoposti a SDS-PAGE e conseguente Western blot per rilevare le proteine carbonilate. L'analisi delle bande immunoreattive è stata condotta normalizzando i valori per quelli dell' α -tubulina. (barre, media \pm D.S; $n=5$; ** $P<0.001$; ## $P<0.001$).

Come mostrato in Fig.10, il contenuto basale di proteine carbonilate nelle cellule *siSod* è maggiore rispetto a quello delle *siScr*. In più, in seguito al trattamento con BSO, l'inibitore della sintesi di GSH, è possibile vedere come le cellule *siSod* siano più soggette delle *siScr* al danno proteico da carbonilazione (Fig.10).

Il decremento di Cu,ZnSOD induce un danno a livello del mitocondrio

È noto dalla letteratura che la Cu,ZnSOD è localizzata non solo nel citoplasma ma anche nel mitocondrio. Al fine di verificare l'entità del decremento di Cu,ZnSOD dopo RNAi in queste due frazioni, 48h dopo la transfezione le cellule SH-SY5Y sono state tripsinizzate e sottoposte a frazionamento subcellulare per estrarre i mitocondri e il citoplasma. Gli estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot. Come mostrato in Fig.11A, il contenuto di Cu,ZnSOD nel mitocondrio è

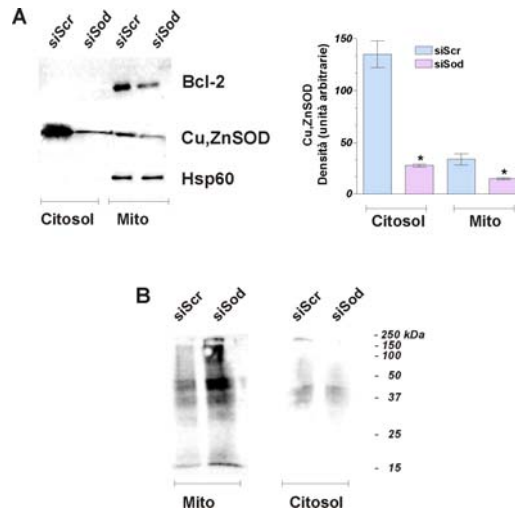


Figura 11. Analisi del contenuto di Cu,ZnSOD e di proteine carbonilate sulle frazioni citoplasmatiche e mitocondriale.

A 48h dalla transfezione le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a frazionamento subcellulare per estrarre i mitocondri e il citoplasma. **A)** I lisati sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per analizzare il contenuto di Cu,ZnSOD, Bcl-2 e Hsp60. (barre, media \pm D.S; $n=5$; $*P<0.001$). **B)** 5 μ g di proteine delle diverse frazioni sono stati derivatizzati con DNP e sottoposti a SDS-PAGE Western blot per rivelare il contenuto di proteine carbonilate.

di gran lunga inferiore rispetto a quello del citoplasma. Il calo di Cu,ZnSOD dopo RNAi nel mitocondrio è del $55 \pm 6\%$ mentre nel citoplasma è del $79 \pm 5\%$.

Dati presenti in letteratura hanno dimostrato che la Cu,ZnSOD è in grado di associarsi alla proteina mitocondriale anti-apoptotica Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004). Per verificare se i livelli di Bcl-2 variassero in seguito al decremento di Cu,ZnSOD nel mitocondrio, gli estratti proteici mitocondriale sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot. Come mostrato in Fig.11, la proteina Bcl-2 accompagna in parallelo il decremento di Cu,ZnSOD ($-60 \pm 4\%$) dopo RNAi. Il controllo del caricamento è stato effettuato marcando la stessa lastrina con un anticorpo anti-Hsp60, una proteina localizzata essenzialmente nel mitocondrio, la cui funzione di chaperone è importante per il folding delle proteine dopo l'importo nel mitocondrio (Gupta et al., 2005).

Poiché i mitocondri sono la maggior sede di sintesi dei ROS, e possono quindi rappresentarne anche il maggior bersaglio del danno ossidativo, abbiamo derivatizzato 5 μ g degli estratti proteici derivanti dalle medesime frazioni cellulari con DNP e rivelato le proteine carbonilate in Western blot. Come è possibile vedere dalla Fig.11B, nelle cellule carenti di Cu,ZnSOD il contenuto di proteine carbonilate nella frazione mitocondriale risulta di gran lunga superiore rispetto a quello della frazione citosolica, nonostante il minor calo della Cu,ZnSOD.

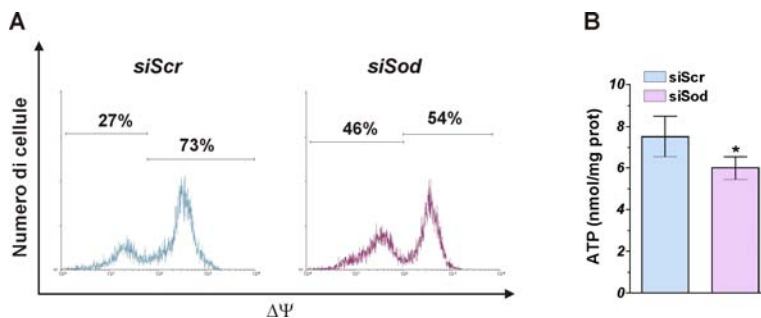


Figura 12. Analisi del potenziale transmembrana e della produzione di ATP nelle cellule carenti di Cu,ZnSOD.

A) 48h dopo la transfezione le cellule SH-SY5Y sono state marcate con TMRE e analizzate al FACS per visualizzare il potenziale transmembrana mitocondriale. L'istogramma è rappresentativo di 6 che hanno dato risultati comparabili. B) 48h dopo la transfezione, i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati analizzati per valutare il contenuto di ATP. (barre, media \pm D.S; $n=10$; * $P<0.002$).

La funzione anti-apoptotica di Bcl-2 si realizza anche tramite il mantenimento della chiusura dei VDAC (*Voltage Dependent Anion Channels*) e la conseguente salvaguardia del potenziale transmembrana ($\Delta\Psi$), necessario alla funzionalità mitocondriale (Shimizu et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Per questo, abbiamo voluto verificare se in seguito al calo di Bcl-2 proprio i mitocondri andassero incontro alla perdita del $\Delta\Psi$ e la conseguente perdita della sua naturale funzione di produzione di ATP. 48h dopo la transfezione le cellule *siScr* e *siSod* sono state incubate con la sonda fluorescente TMRE (*Tetra-metil-rodamina-etilestere*), che permette di discriminare i mitocondri con diverso livello di $\Delta\Psi$, e analizzate al FACS. La Fig.12A mostra come le cellule carenti di Cu,ZnSOD, e quindi di Bcl-2, hanno dei livelli di potenziale transmembrana inferiori a quelle di controllo.

Infatti, se nelle cellule *siScr* la percentuale di mitocondri a basso potenziale è del 27% e di quelli ad alto potenziale del 73%, nelle cellule *siSod* la prima sale al 46%, la seconda scende al 54%. Per verificare se la perdita di $\Delta\Psi$ potesse indurre anche una diminuzione della sintesi di ATP, 48h dopo la transfezione le cellule sono state lisate e gli estratti sottoposti ad analisi luminometrica per valutarne il contenuto di ATP. Come è possibile vedere in Fig.12B, le cellule *siSod* hanno un contenuto di ATP inferiore del $20 \pm 1\%$ rispetto alle cellule di controllo *siScr*, in accordo con il dato derivante dal potenziale transmembrana.

Per confermare il ruolo svolto dalla Cu,ZnSOD nella protezione del mitocondrio dal danno ossidativo, e dunque nel preservare la vitalità cellulare, abbiamo trattato le cellule con il *rotenone*, uno specifico inibitore del Complesso I della catena di trasporto degli elettroni il quale induce la produzione di superossido all'interno del compartimento mitocondriale. 24h dopo la transfezione il rotenone è stato aggiunto al terreno di coltura alla concentrazione di $0.5\mu\text{M}$ e mantenuto per le successive 24h. Le cellule staccate, sono state analizzate per conta diretta per esclusione da Trypan blue. Come mostrato in Fig.13, le basse dosi di rotenone usate nell'esperimento non hanno provocato alcun effetto sulla vitalità delle cellule *siScr*, mentre hanno prodotto un sostanziale incremento della morte nelle cellule *siSod* ($+52 \pm 5\%$).

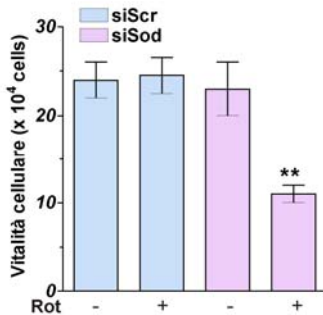


Figura 13. Analisi della vitalità cellulare dopo trattamento con rotenone.

24h dopo la transfezione le cellule SH-SY5Y sono state incubate per altre 24h con rotenone $0.5\mu\text{M}$ e successivamente le cellule vitali sono state contate per esclusione da Trypan blue. (barre, media \pm D.S; $n=5$; ** $P<0.001$).

Determinazione della temporalità degli eventi conseguenti al decremento della Cu,ZnSOD

Per stabilire la sequenza degli eventi che si verificano dopo il decremento della Cu,ZnSOD, gli effetti sopra riportati sono stati analizzati a diversi tempi. Dopo la transfezione. Innanzitutto, abbiamo seguito il decremento della Cu,ZnSOD dopo RNAi. Come mostrato in Fig.14A, il decremento della concentrazione proteica analizzato tramite Western blot inizia ad essere visibile a 12h dalla transfezione.

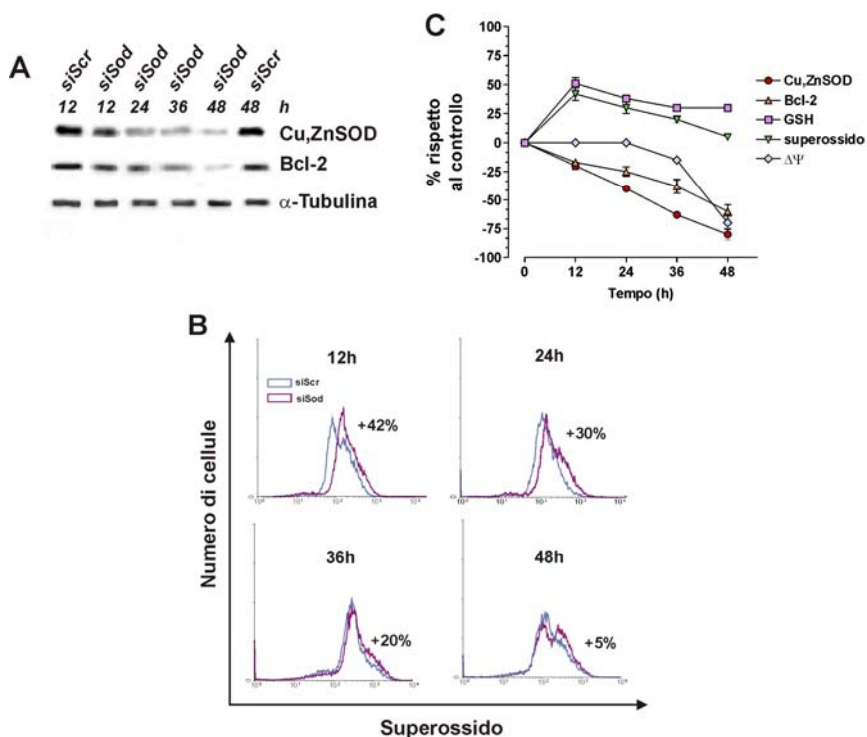


Figura 14. Analisi della sequenzialità degli eventi che si verificano dopo RNAi.

A) 12, 24, 36 e 48h dopo la transfezione le cellule SH-SY5Y sono state tripsinizzate e i lisati separati tramite SDS-PAGE e successivo Western blot per rilevarne il contenuto di Cu,ZnSOD, Bcl-2 e α -tubulina. Il Western blot è rappresentativo di 6 che hanno dato risultati comparabili. **B)** 12, 24, 36 e 48h dopo la transfezione le cellule *siScr* e *siSod* sono state marcate con DHE e il contenuto di superossido analizzato tramite FACS. Gli istogrammi sono rappresentativi di 6 che hanno dato risultati simili. **C)** Schema riassuntivo.

Ancora, abbiamo voluto valutare la temporalità del decremento della proteina Bcl-2 analizzando i lisati cellulari in Western blot. La Fig.14A mostra come Bcl-2 segua lo stesso andamento della proteina Cu,ZnSOD, andando incontro a decremento dalle 12h in poi, e raggiungendo il minimo livello a 48h dalla transfezione ($-60 \pm 4\%$). Contemporaneamente, abbiamo analizzato il contenuto di superossido in fluorescenza tramite marcatura con DHE. Gli istogrammi riportati in Fig.14B mostrano come si verifichi un aumento di produzione di radicale superossido nelle cellule *siSod* a 12h dalla transfezione e come questo vada a diminuire gradualmente a 24, 36 e 48h

La Fig.14C riporta uno schema riassuntivo in cui sono mostrati i livelli di calo di Cu,ZnSOD indotti tramite RNAi. L'analisi dei livelli di GSH tramite HPLC, evidenziano come la concentrazione del tripeptide segua di pari passo quella del superossido, aumentando a 12h e mantenendosi elevato fino alle 48h, nelle cellule *siSod*. Il potenziale transmembrana è stato misurato marcando le cellule *siScr* e *siSod* con TMRE e successivamente analizzandole al FACS. Come mostrato nel grafico, esso comincia a decrescere a 24h dopo la transfezione e raggiunge il minimo livello a 48h.

Il calo del potenziale transmembrana è direttamente correlato al calo di Bcl-2 e non della Cu,ZnSOD

Per discriminare quali degli eventi evidenziati dai precedenti esperimenti siano direttamente dovuti al calo di Cu,ZnSOD e quali all'associato calo di Bcl-2, le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con una sequenza di dsRNA contro la proteina Bcl-2 (*siBcl2*). 48h dopo la transfezione è stato osservato un calo della proteina Bcl-2 del $46 \pm 3\%$ nelle cellule *siBcl2* rispetto alle *siScr*, senza che questo fosse accompagnato da un calo della Cu,ZnSOD (Fig.15A). Le cellule *siScr* e *siBcl2* sono state marcate con TMRE e successivamente analizzate al FACS per analizzarne il potenziale transmembrana. Come è possibile vedere dalla Fig.15B le cellule *siBcl2* mostrano un significativo calo del $\Delta\Psi$ rispetto alle cellule *siScr*, confermando l'importanza di questa proteina nel mantenimento del potenziale transmembrana.

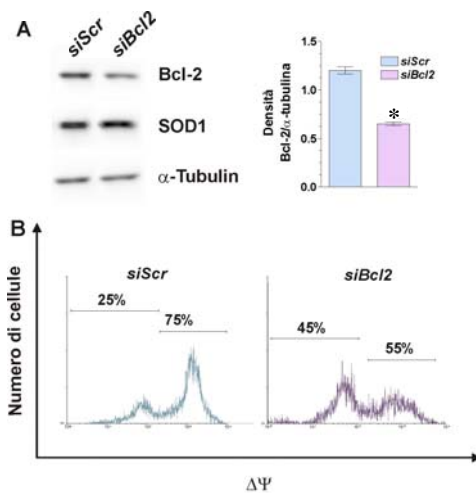


Figura 15. Analisi del contenuto della proteina Bcl-2 e del potenziale transmembrana dopo RNAi contro Bcl-2

A) 48h dopo la transfezione con siBcl2 e siScr i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per analizzarne il contenuto di Bcl-2. (barre, media \pm D.S; $n=10$; * $P<0.002$). **B)** 48h dopo la transfezione con siBcl2 le cellule sono state marcate con TMRE e analizzate al FACS per visualizzare il potenziale transmembrana mitocondriale. L'istogramma è rappresentativo di 6 che hanno dato risultati comparabili.

La Cu,ZnSOD interagisce con la proteina Bcl-2 ma non con la sua isoforma fosforilata sulla Ser70

L'esistenza di una stretta correlazione tra Cu,ZnSOD e Bcl-2 è stata dimostrata nel 2004 dal gruppo di Pasinelli e sembra essere caratteristica delle cellule neuronali nelle quali le due proteine interagiscono a livello mitocondriale. Al fine di verificare l'esistenza di un *cross-talk* tra queste due proteine anche nel nostro sistema sperimentale, abbiamo condotto degli esperimenti di immunoprecipitazione. In particolare, gli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y sono stati immunoprecipitati in presenza dell'anticorpo anti-Cu,ZnSOD e sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot usando l'anticorpo α -Bcl-2. L'analisi ha dimostrato che anche nel nostro sistema sperimentale le due proteine sono in grado di interagire (Fig.16A).

È noto dalla letteratura che Bcl-2 regola il $\Delta\Psi$ in funzione del suo grado di fosforilazione e che la singola fosforilazione sul sito Ser70 è in grado di potenziare la funzione anti-apoptotica di questa proteina (Ruvolo et al., 2001). Al fine di verificare se la fosforilazione di Bcl-2 sia in grado di influenzare anche la sua possibilità di interagire con la Cu,ZnSOD, abbiamo condotto gli stessi esperimenti di immunoprecipitazione sopra riportati e poi rivelato i Western blot con l'anticorpo anti-P^{Ser70}-Bcl-2.

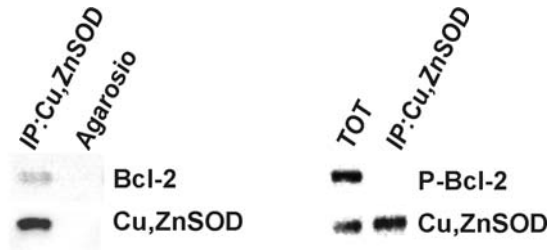


Figura 16. Analisi dell'interazione tra Cu,ZnSOD e Bcl-2 tramite immunoprecipitazione

Gli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpo anti-Cu,ZnSOD e successivi SDS-PAGE e Western blot per analizzarne il contenuto di **A)** Bcl-2 e **B)** P-Bcl-2. I Western blot sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti che hanno dato risultati comparabili.

Come mostrato in Fig.16B, l'isoforma fosforilata di Bcl-2 non co-immunoprecipita con la Cu,ZnSOD, dimostrando che questa modificazione post-traduzionale è funzionale al mantenimento dell'interazione.

Il calo della Cu,ZnSOD induce la fosforilazione della proteina Bcl-2

Al fine di dimostrare se la perdita del potenziale transmembrana sia dovuto esclusivamente al calo della proteina Bcl-2 o anche ed almeno in parte al cambiamento del suo stato di fosforilazione, le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con le sequenze *siScr* e *siSod* e i lisati cellulari sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per analizzarne il contenuto di P-Bcl-2. La Fig.17A mostra come i livelli di P-Bcl-2 siano lievemente innalzati nelle cellule *siSod*, in particolar modo a 48h.

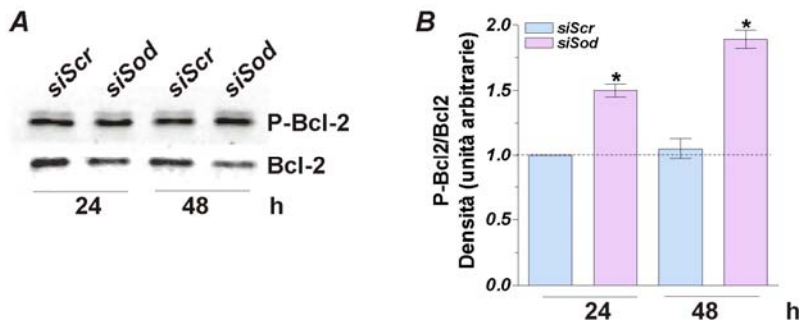


Figura 17. Analisi dello stato di fosforilazione di Bcl-2

A) 24 e 48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* gli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per analizzarne il contenuto di Bcl-2 e P-Bcl-2. I Western blot sono rappresentativi di 3 che hanno dato risultati comparabili. B) L'analisi delle densitometrie è stata condotta dividendo i valori delle bande immunoreattive di p-Bcl-2 per quelli di Bcl-2. (barre, media \pm D.S; $n=3$; $*P<0.002$).

Tuttavia, poiché ai fini della valutazione della funzionalità della proteina Bcl-2 è importante il rapporto tra la forma fosforilata e quella basale, abbiamo eseguito il rapporto tra le densitometrie delle bande immunoreattive di P-Bcl-2 e quelle di Bcl-2. Come mostrato in Fig.17B, il rapporto tra le due forme di Bcl-2 è aumentato nelle cellule *siSod* a 24h ($+50 \pm 5\%$) e a 48h ($+89 \pm 7\%$) rispetto alle *siScr*.

Il calo della Cu,ZnSOD induce la carbonilazione della proteina Bcl-2

La diminuzione dei livelli basali della proteina Bcl-2 rilevati in Western blot potrebbe essere dovuta alla sua fosforilazione che maschererebbe l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo anti-Bcl-2. Un'altra ipotesi è che questo calo sia dovuto al danno ossidativo. Questa ipotesi sarebbe in accordo con l'aumento di proteine carbonilate nel compartimento mitocondriale e con il dato derivante dalla letteratura in base al quale Bcl-2, in condizioni di stress ossidativo, andrebbe incontro a carbonilazione e che quest'ultima precede la

sua down-regolazione. Per valutare la seconda ipotesi, abbiamo voluto determinare il contenuto di Bcl-2 carbonilata dopo down-regolazione della Cu,ZnSOD. 48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle le cellule SH-SY5Y sono stati immunoprecipitati con anticorpo α -Bcl-2.

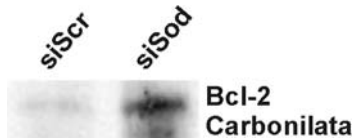


Figura 18. Analisi dei livelli di carbonilazione di Bcl-2

48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* gli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpo anti-Bcl-2; gli immunoprecipitati ottenuti sono stati derivatizzati con DNP e sottoposti a SDS-

PAGE e Western blot per rivelare il contenuto di proteine carbonilate. Il Western blot è rappresentativo di 3 che hanno dato risultati comparabili.

Gli immunoprecipitati così ottenuti sono stati sottoposti a derivatizzazione con DNP e sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per rivelare i livelli di Bcl-2 carbonilata. Come mostrato in Fig.18, nelle cellule *siSod* vi è un incremento significativo dei livelli di carbonilazione della proteina Bcl-2 ($+150 \pm 8\%$) rispetto ai controlli *siScr*.

***EFFETTI DELLA DOWN-REGOLAZIONE DELLA
Cu,Zn SOD SUL MANTENIMENTO DELLA
STRUTTURA CITOSCHELETRICA***

La morfologia delle cellule SH-SY5Y è alterata in seguito alla down-regolazione della Cu,ZnSOD

Lo stress ossidativo è stato messo in relazione con l'insorgenza di anomalie alle strutture citoscheletriche. Abbiamo perciò analizzato se il precoce e transiente incremento di superossido conseguente al decremento di Cu,ZnSOD potesse influenzare l'omeostasi citoscheletrica. A questo scopo le cellule SH-SY5Y sono state transfettate con le sequenze *siScr* e *siSod*, fatte crescere su vetrini coprioggetto e, 16h dopo la transfezione, fissate. Dopodiché, le cellule sono state osservate in microscopia ottica. La Fig.19, mostra che le cellule *siSod* evidenziano un cambiamento significativo nella morfologia rispetto alle *siScr*.

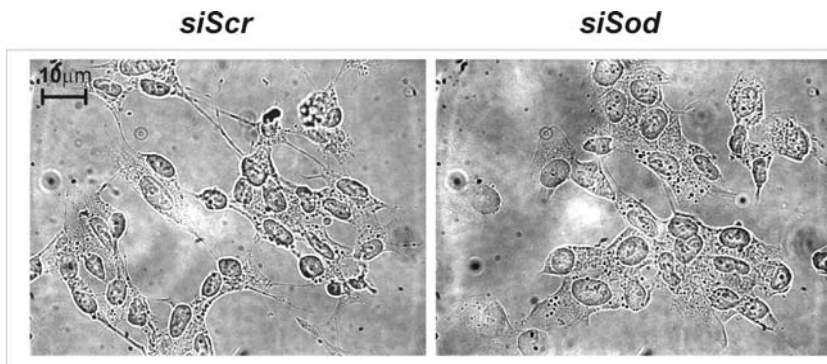


Figura 19. Analisi della morfologia delle cellule SH-SY5Y in seguito a RNAi

16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state fissate e osservate in microscopia luce. Le immagini sono rappresentative di cinque esperimenti che hanno dato risultati compaabili.

In particolare, le cellule *siSod* presentano una forma arrotondata, accompagnata dalla riduzione del numero dei neuriti e della loro estensione. La percentuale delle cellule che presentavano forma arrotondata era dell'80 ± 6%, compatibilmente con l'efficienza di transfezione (vedi Materiali e Metodi).

Per verificare se l'alterazione nella morfologia nelle cellule carenti di Cu,ZnSOD fosse correlata alla distribuzione di actina polimerizzata (F-actina), le cellule, transfettate e fatte crescere sui vetrini coprioggetto, sono state fissate e marcate con anticorpo anti-Cu,ZnSOD, Hoechst (per marcare i

nuclei) e Fallodina (marcata con un probe fluorescente = Alexa Fluor Phalloidin-488[®]), una droga estratta dal fungo *Amanita phalloides*, che si lega in maniera selettiva all'F-actina. Come atteso, le cellule *siSod* mostravano livelli di F-actina inferiori a quelli delle cellule *siScr* (Fig.20). Contemporaneamente, risultava visibile un danno generalizzato alla rete di F-actina, nonostante le cellule avessero dei livelli di Cu,ZnSOD solo lievemente diminuiti.

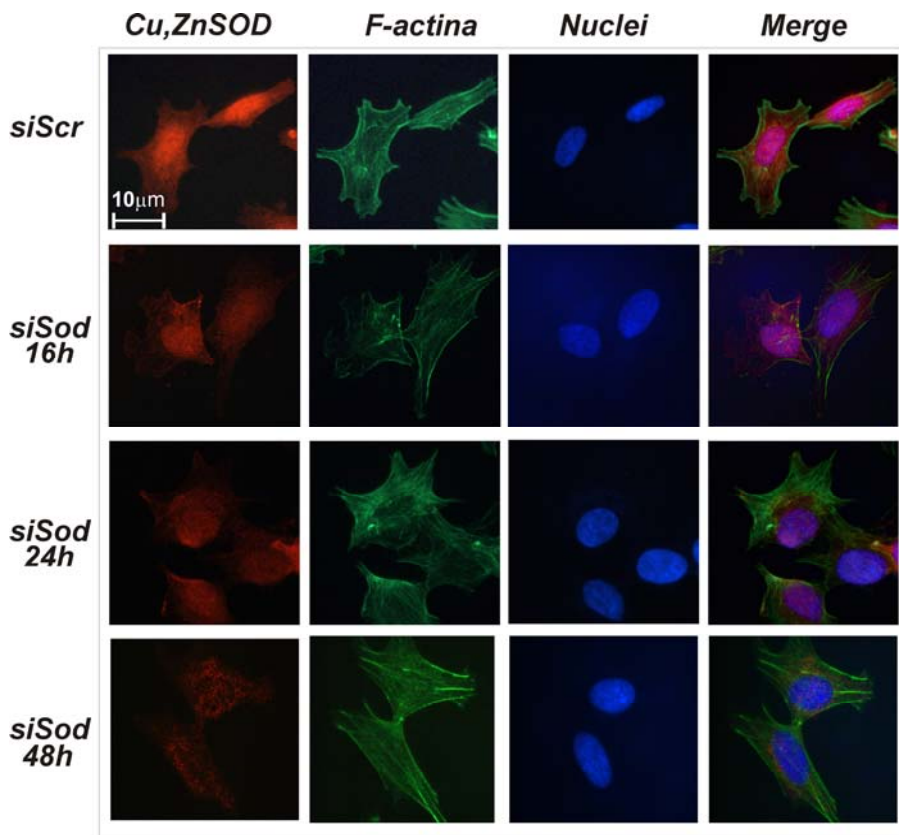


Figura 20. Analisi dei livelli di F-actina nelle cellule SH-SY5Y in seguito a decremento della Cu,ZnSOD.

16, 24 e 48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state fissate e marcate con l'anticorpo anti-Cu,ZnSOD, Hoechst 33342 per marcare i nuclei, e Alexa Fluor Phalloidin-488[®] per marcare l'F-actina. L'immagine è rappresentativa di cinque esperimenti che hanno dato risultati comparabili.

La diminuzione generalizzata di F-actina appare evidente anche dalla Fig.21 in cui è rappresentato un campo con un maggior numero di cellule.

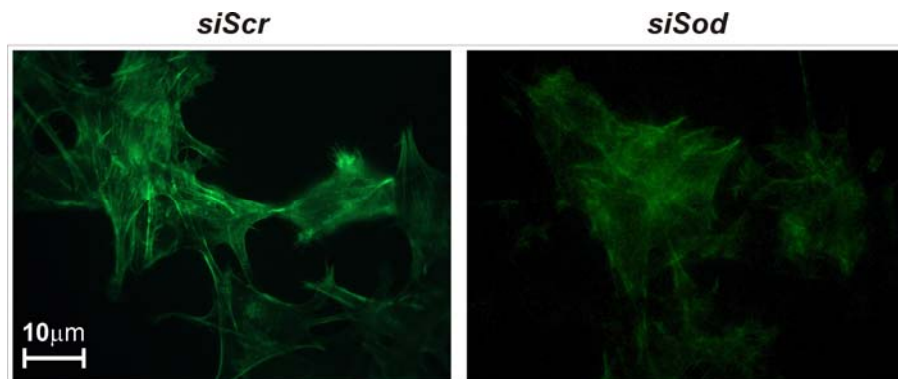


Figura 21. Analisi dei livelli di F-actina nelle cellule SH-SY5Y in seguito a RNAi

16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state fissate e marcate con Alexa Fluor Phalloidin-488[®] per marcare l'F-actina. L'immagine è rappresentativa di cinque esperimenti che hanno dato risultati comparabili.

Tuttavia, mentre i fenomeni di danno all'F-actina sono evidenti a 16h dopo la transfezione, questi vengono apparentemente recuperati a 24h, nonostante la Cu,ZnSOD continui a diminuire, e ancor più a 48h, tempo in cui la Cu,ZnSOD raggiunge il livello minimo (Fig.20).

L'alterazione della morfologia delle cellule siSod è accompagnata da quella del contenuto delle principali proteine citoscheletriche

Al fine di determinare se i cambiamenti transienti nella morfologia cellulare delle cellule SH-SY5Y fossero dovuti ad un effettivo decremento dei livelli di actina, abbiamo analizzato il contenuto di questa proteina nei lisati totali tramite Western blot. Come mostrato in Fig.22A, i livelli di actina diminuiscono notevolmente a 16h dopo la transfezione ($-61 \pm 8\%$) nelle cellule *siSod*. Per verificare se il decremento di actina fosse dovuto alla down-regolazione della sua espressione, abbiamo analizzato i livelli del suo

mRNA tramite RT-PCR semi-quantitativa. La Fig.22B mostra che i livelli di mRNA della β -actina nelle cellule *siSod* è comparabile a quello delle cellule *siScr*, mentre l'mRNA della Cu,ZnSOD è apparentemente scomparso già a 16h dalla transfezione. Quest'ultimo dato, confrontato coi livelli proteici di Cu,ZnSOD che a 16h subiscono solo un piccolo decremento, è in accordo con i dati dalla letteratura secondo cui questa proteina ha una lunga emivita (Bartnikas and Gitlin, 2003).

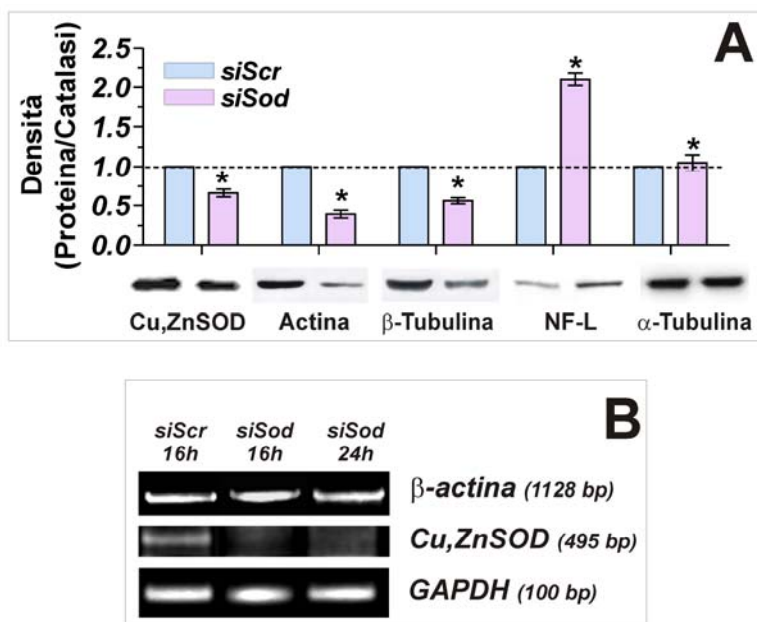


Figura 22. Analisi dei livelli delle principali proteine citoscheletriche nelle cellule SH-SY5Y in seguito a RNAi

A) 16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot per rilevare le concentrazioni della Cu,ZnSOD, actina, α - e β -tubulina e NF-L. Barre, Media \pm D.S.; * $p < 0.001$, $n = 3$. **B)** 16h e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* gli mRNA delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a RT-PCR semi-quantitativa per rilevare i livelli dei messaggeri della Cu,ZnSOD, β -actina e GAPDH. Il gel è rappresentativo di tre che hanno dato risultati comparabili.

Allo scopo di analizzare se il danno al citoscheletro è specifico per l'actina, abbiamo verificato il contenuto di altre proteine citoscheletriche dopo RNAi. La Fig.22A mostra come il calo della Cu,ZnSOD nelle cellule

siSod è accompagnato da quello della β -tubulina ($-44 \pm 7\%$), ma non della sua isoforma α - (vedi anche Fig.14A).

Per verificare se anche i livelli di NF-L (i filamenti intermedi maggiormente espressi nelle cellule di origine neuronale) fossero influenzati dal decremento di Cu,ZnSOD, abbiamo analizzato il loro contenuto tramite Western blot 16h dopo la transfezione. Come mostrato in Fig.22A, l'espressione dei NF-L è significativamente aumentata ($+110 \pm 4\%$) nelle cellule *siSod* rispetto alle *siScr*. È da notare che nelle nostre condizioni sperimentali non è possibile rilevare il contenuto degli altri due NFs (-M ed -H) poiché già poco espressi nelle cellule differenziate ed ancor meno nei neuroblastomi.

L'alterazione del citoscheletro conseguente al decremento di Cu,ZnSOD sembra tipica delle cellule di origine neuronale

Per verificare se i fenomeni sopra riportati fossero tipici delle cellule SH-SY5Y o si verificassero anche in altre linee cellulari, abbiamo eseguito i precedenti esperimenti su altre cellule di neuroblastoma, umano (CHP100) e murino (NSC34), e di origine non neuronale, come quelle derivanti da adenocarcinoma gastrico (AGS) e da melanoma (M14). In particolare, le cellule NSC34 sono ibridomi creati dalla fusione del neuroblastoma murino N18TG2 con motoneuroni (Cashman et al., 1992). Essi mostrano un fenotipo neuronale multipolare e sono ampiamente utilizzati come modello di cellula neuronale. Per indurre l'RNAi nelle cellule NSC34, abbiamo utilizzato un'apposita sequenza, dato che le sequenze di mRNA per la Cu,ZnSOD umana e murina sono differenti.

Inizialmente abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul contenuto di actina. I Western blot rappresentati in Fig.23 mostrano i livelli di Cu,ZnSOD e actina a 16h dalla transfezione con *siScr* e *siSod*. Le cellule di origine non neuronale, AGS e M14, non mostrano alcun cambiamento nei livelli di actina a seguito del decremento di Cu,ZnSOD. Viceversa, le cellule CHP100

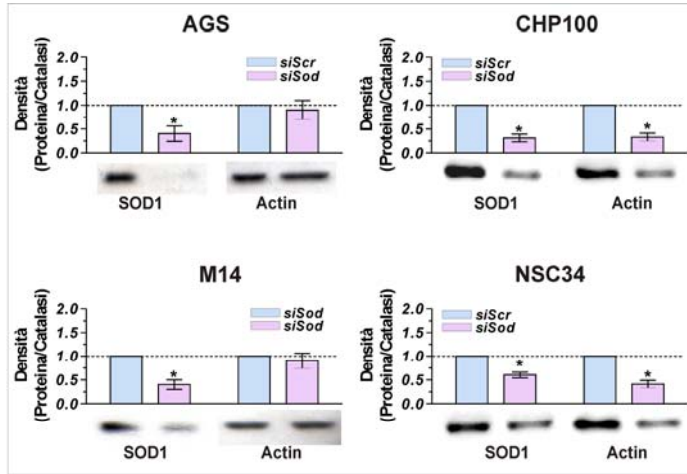


Figura 23. Analisi dei livelli di actina in differenti linee cellulari dopo RNAi

16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule AGS, M14, CHP100 e NSC34 sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per rilevare le concentrazioni di Cu,ZnSOD e actina. Barre, Media \pm D.S.; * $p < 0.001$, $n = 3$.

ed NSC34, entrambe di origine neuronale e di specie differenti, mostrano una diminuzione significativa di actina a 16h dalla transfezione con le sequenze *siSod*.

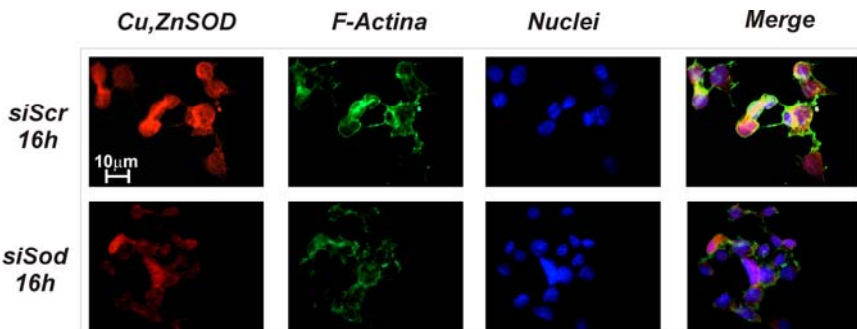


Figura 24. Analisi dei livelli di F-actina nelle cellule NSC34 dopo RNAi

16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule NSC34 sono state fissate e marcate con l'anticorpo anti-Cu,ZnSOD, Hoechst 33342 per marcare i nuclei, e Alexa Fluor Phalloidin-488® per marcare l'F-actina. L'immagine è rappresentativa di cinque esperimenti che hanno dato risultati comparabili.

L'immagine mostrata in Fig.24 evidenzia anche cambiamenti a livello di F-actina nelle cellule NSC34, in termini di diminuzione generale della fluorescenza.

Il recupero dell'F-actina è associata all'up-regolazione di Tau e Hsp27

Al fine di chiarire i meccanismi responsabili del recupero della rete di F-actina a 24 e 48h dalla transfezione, abbiamo separato i lisati delle cellule SH-SY5Y nelle frazioni Triton insolubile (TI) e Triton solubile (TS), le quali contengono rispettivamente le proteine citoscheletriche polimerizzate e quelle non polimerizzate. Il contenuto di actina è poi stato analizzato in queste frazioni tramite Western blot a 16 e 24h dopo la transfezione. La Fig.25 mostra che a 16h dalla transfezione si ha un decremento dei livelli di actina nella frazione TI e un successivo recupero a 24h. Viceversa nella frazione TS si ha un incremento dei livelli di actina a 24h dalla transfezione. Sono stati proposti diversi meccanismi in grado di regolare la polimerizzazione dell'actina. Tra questi vi sono quelli governati dall'intervento delle proteine Tau e Hsp27. Nonostante il ruolo di Tau nel citoscheletro sembri legato prevalentemente al mantenimento dei microtubuli, di recente è emerso che esso è anche in grado di interagire con i microfilamenti stabilizzandoli (Fulga et al., 2007). Abbiamo quindi voluto valutare i livelli di Tau nei lisati totali e nelle frazioni TS e TI delle cellule SH-SY5Y dopo down-regolazione della Cu,ZnSOD.

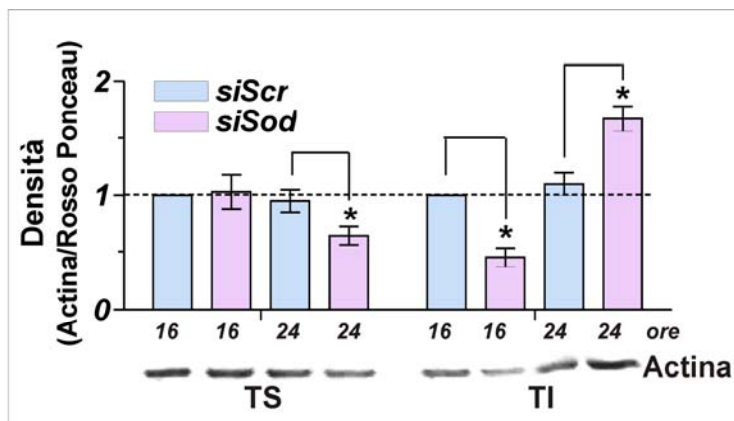


Figura 25. Analisi dei livelli di actina nelle frazioni TS e TI di cellule SH-SY5Y dopo RNAi

16 e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a frazionamento per isolare le frazioni TS e TI. Gli estratti proteici così ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di actina. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$)

Gli estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot, e la proteina Tau è stata rilevata con un anticorpo che è in grado di riconoscere sia la forma basale che quella fosforilata. La Fig.26 mostra come i livelli di Tau delle cellule *siSod* siano innalzati nei lisati totali ($+52 \pm 15\%$), nella frazione TS ($+35 \pm 6\%$) e in quella TI ($+66 \pm 10\%$). In particolare, è da notare come nella frazione TS compaia una banda a più alto peso molecolare, riportata in letteratura come una isoforma fosforilata di Tau. La comparsa di quest'ultima banda nella frazione TS è in accordo con i dati provenienti dalla letteratura per cui le isoforme fosforilate di Tau sono staccate dai microtubuli e si rinvergono nelle frazioni citoplasmatiche (Xie et al., 1998; Li et al., 2004; Poppek et al., 2006).

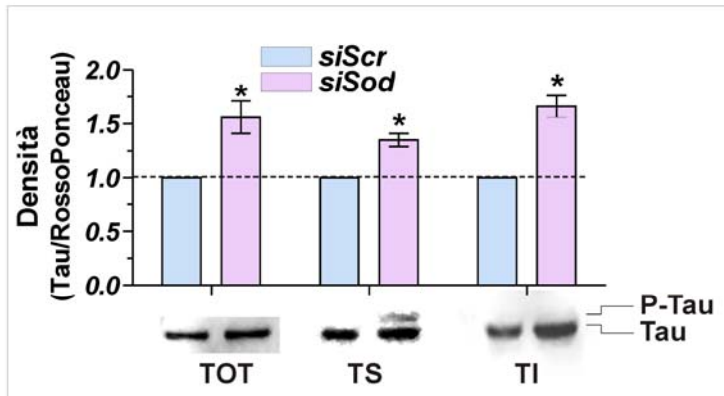


Figura 26. Analisi dei livelli di Tau nei lisati totali e nelle frazioni TS e TI di cellule SH-SY5Y dopo RNAi

16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a frazionamento per isolare le frazioni TS e TI e i lisati totali. Gli estratti proteici così ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di Tau. P-Tau= fosfo-Tau. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$)

Diversi danni e stimoli rigenerativi sono seguiti dall'aumento dell'espressione della *Heat shock protein 27* (Hsp27). Essa può rappresentare un modulatore della polimerizzazione dell'actina, legandosi alle estremità, in accrescimento, e inibendo la polimerizzazione dell'F-actina fino al rientro nel ciclo cellulare (Lee et al., 2007). Il distacco dell'Hsp27 dal citoscheletro è poi in grado di riattivare gli eventi di polimerizzazione dei microfilamenti (Murashov et al., 2001). Abbiamo per questo analizzato i livelli di Hsp27 e della sua isoforma murina Hsp25 nelle cellule SH-SY5Y ed NSC34 in seguito al decremento della Cu,ZnSOD. Come mostrato in Fig.27A è visibile un significativo aumento della proteina Hsp27 ($+120 \pm 10\%$) nelle cellule SH-SY5Y, così anche nelle cellule NSC34, che mostrano un aumento dell'omologo murino Hsp25 del $+80 \pm 15\%$.

Per valutare se l'accumulo di Hsp27 potesse influenzare lo stato di aggregazione dell'actina, abbiamo separato i lisati cellulari nelle frazioni TS e TI. Gli estratti proteici così ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot. Come è possibile vedere dalla Fig.27B, a 16h Hsp27 è localizzata principalmente nella frazione TI, per poi traslocare nella frazione TS a 24h dalla transfezione.

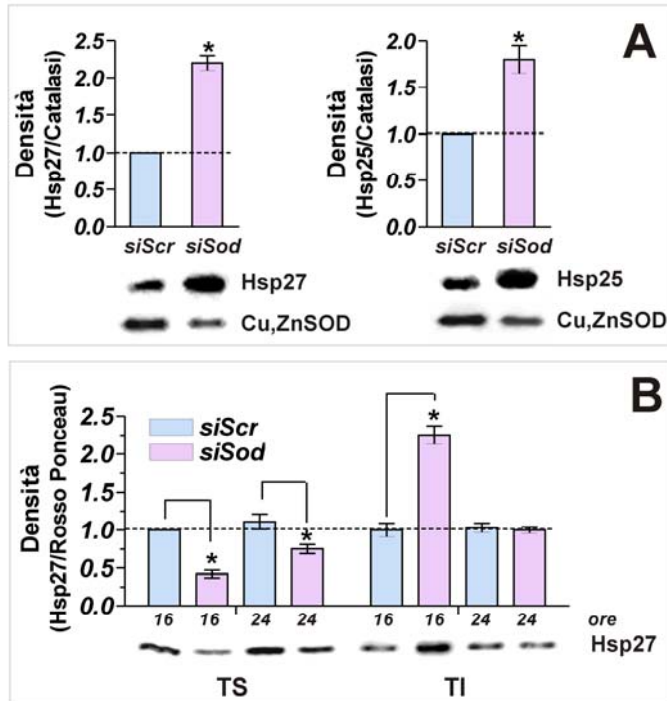


Figura 27. Analisi dei livelli di Hsp27 e Hsp25 nei lisati totali delle cellule SH-SY5Y e NSC34 dopo RNAi

A) 16h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule SH-SY5Y ed NSC34 sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare rispettivamente il contenuto di Hsp27 e Hsp25. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$) B) 16h e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a frazionamento per isolare le frazioni TS e TI. Gli estratti proteici così ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di Hsp27. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$)

L'attivazione di p38/MAPK è responsabile della prevenzione della morte cellulare in seguito alla disgregazione del citoscheletro

Dati presenti in letteratura dimostrano che l'attivazione del *pathway* di p38/Hsp27 è importante per la modulazione della riorganizzazione dell'actina in seguito a stress ossidativo (Huot et al., 1997). Dati analoghi derivano dallo studio dell'omologo murino Hsp25, la cui associazione con i

microfilamenti è inibita in seguito all'attivazione di p38/MAPK, permettendo, così, la ripolimerizzazione dell'F-actina (Murashov et al., 2001). Per determinare se contemporaneamente ai cambiamenti di localizzazione di Hsp27 avvenisse l'attivazione di p38, abbiamo analizzato i livelli di questa proteina e della sua forma attiva fosforilata P-p38. Per questo, 16 e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod*, gli estratti proteici delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivo Western blot. Come mostra la Fig.28, a 16h dalla transfezione si ha un aumento dei livelli di P-p38 ($+70 \pm 6\%$), seguito da un picco di attivazione a 24h ($+570 \pm 15\%$). Quest'attivazione è confermata da quella della sua chinasi a monte P-MKK3/6, che si nota a 16h ($+280 \pm 13\%$) per poi spegnersi a 24h. È noto dalla letteratura che l'aumento dei livelli intracellulari di Hsp27 può avvenire, a scopo protettivo, in seguito a stress ossidativo, grazie all'attivazione del fattore di trascrizione Hsf1 (Filomeni et al., 2005b). Poiché, una volta attivato, Hsf1 trasloca nel nucleo, abbiamo voluto verificare il suo stato di attivazione in seguito al decremento di Cu,ZnSOD nelle cellule SH-SY5Y.

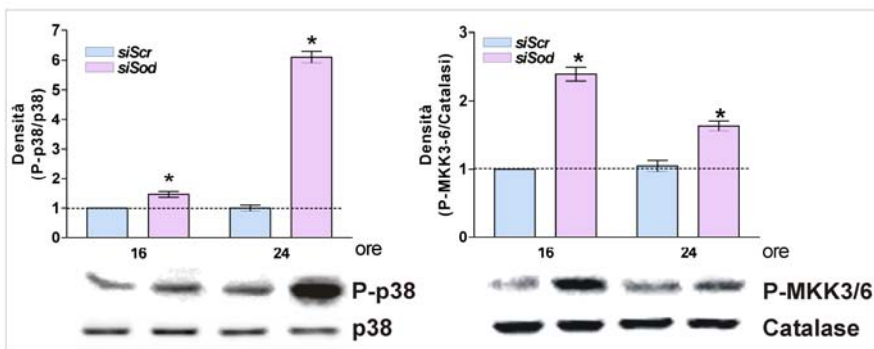


Figura 28. Analisi dei livelli di p38, P-p38 e P-MKK3/6 nei lisati totali delle cellule SH-SY5Y dopo RNAi

16 e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di p38, P-p38 e P-MKK3/6. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n = 3$)

Come mostrato in Fig.29, a 16 e 24h dalla transfezione, le cellule *siSod* mostrano un significativo aumento di Hsf1 a livello nucleare, accompagnato da un parallelo decremento nel citoplasma.

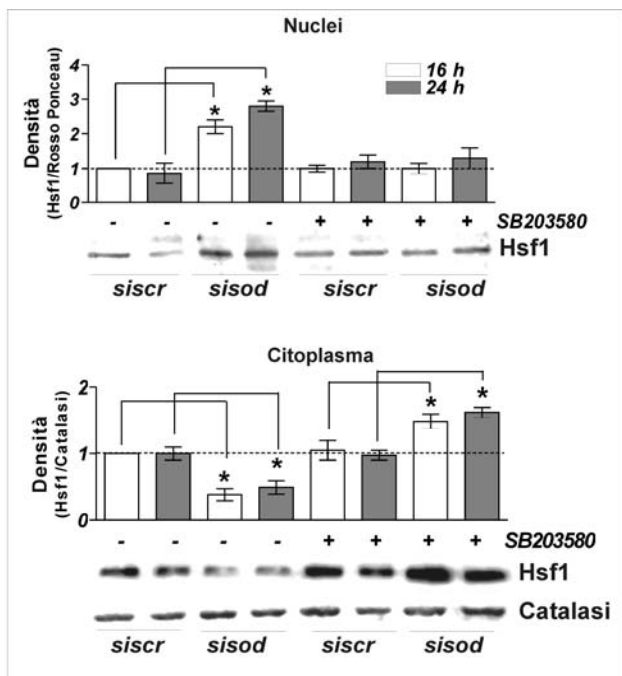


Figura 29. Analisi dei livelli di Hsf1 negli estratti nucleari e citoplasmatici delle cellule SH-SY5Y dopo RNAi

16 e 24h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state separate nelle frazioni nucleare e citoplasmatica. Gli estratti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di Hsf1. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n = 3$)

È noto da dati in letteratura che l'attivazione di p38 è responsabile della traslocazione nel nucleo di Hsf1 (Hung et al., 1998; Rafiee et al., 2006). Quindi, per verificare che l'attivazione di p38 precedentemente dimostrata fosse responsabile della traslocazione nucleare di Hsf1, abbiamo trattato le cellule SH-SY5Y dopo transfezione con SB203580 20 μ M, un inibitore specifico di p38. La Fig.29 mostra che il trattamento con l'inibitore di p38 inibisce la traslocazione di Hsf1 nel nucleo nelle cellule *siSod* portando al suo accumulo nel citoplasma.

Per verificare se l'attivazione di p38, con la conseguente traslocazione di Hsf1, fosse un evento necessario alla sopravvivenza cellulare, abbiamo analizzato la vitalità cellulare dopo trattamento con l'inibitore di p38. Dopo la transfezione, le cellule SH-SY5Y sono state trattate con SB203580 20 μ M e a 12, 24 e 48h sono state staccate e marcate con Ioduro di Propidio (Nicoletti et al., 1991). I risultati dell'analisi effettuata al FACS è presentata in Fig.30 e mostrano che l'inibizione della fosforilazione di p38 conduce alla morte cellulare già a 24h e in misura maggiore a 48h dalla transfezione.

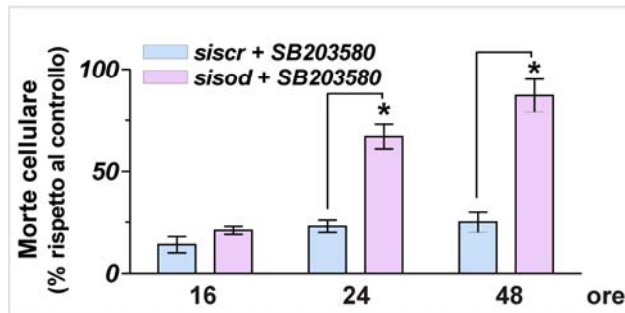


Figura 30. Analisi della morte cellulare dopo trattamento con SB203580

Subito dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state incubate con l'inibitore di p38 SB203580 alla concentrazione di 20 μ M. 16 e 24 e 48h dopo, le cellule sono state staccate e marcate con Ioduro di Propidio. L'analisi della morte cellulare è stata condotta in citofluorimetria, e la percentuale delle cellule morte calcolata tramite il software WinMDI 2.8. I dati sono rappresentati come percentuale rispetto alle cellule non trattate con SB203580. Barre, media \pm D.S.; * $p < 0.001$, $n = 5$.

Il transiente accumulo di superossido determinato dalla down-regolazione della Cu,ZnSOD induce l'attivazione di Cdk5/p35 nelle cellule di origine neuronale

Come precedentemente dimostrato, i disordini del citoscheletro sembrano tipici delle cellule neuronali. Questo fenomeno può suggerire almeno due ipotesi, non necessariamente mutuamente esclusive: 1) che la carenza della Cu,ZnSOD attivi direttamente o indirettamente, tramite l'incremento di superossido, *pathway* molecolari tipici delle cellule di origine neuronale; 2) che le cellule di origine non-neuronale siano meno sensibili allo stress ossidativo determinato dalla carenza di Cu,ZnSOD. Per dimostrare se siano vere una o entrambe le ipotesi, siamo partiti dall'analisi del *pathway* di Cdk5/p35, tipico delle cellule neuronali che è noto essere coinvolto nella regolazione della dinamica dei microfilamenti (Patrick et al., 1998; Patrick et al., 1999). In particolare, Cdk5 è una chinasi regolata da stress-ossidativo, la cui attivazione è possibile grazie all'interazione con la sua subunità regolatrice p35 (Strocchi et al., 2003). Abbiamo per questo analizzato l'attivazione di questo *pathway* tramite Western blot in seguito a RNAi. La Fig.31 mostra come, nelle cellule *siSod*, si ha l'accumulo di p35 a 16 e 24h

dalla transfezione che va poi spegnendosi a 48h. Contemporaneamente si ha l'accumulo di P-Cdk5, la forma enzimaticamente attiva di Cdk5, che ritorna a valori comparabili a quelli del controllo a 48h.

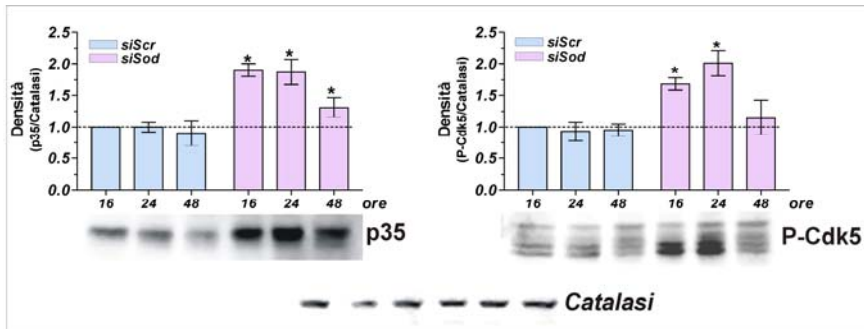


Figura 31. Analisi dell'attivazione di Cdk5/p35 in seguito a RNAi

16, 24 e 48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di p35 e P-Cdk5. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n = 3$).

Questo andamento va di pari passo con quello del superossido (Fig.32A) e con la contemporanea diminuzione di attività della Cu,ZnSOD (Fig.32B) determinata dal suo lento decremento (Fig.32).

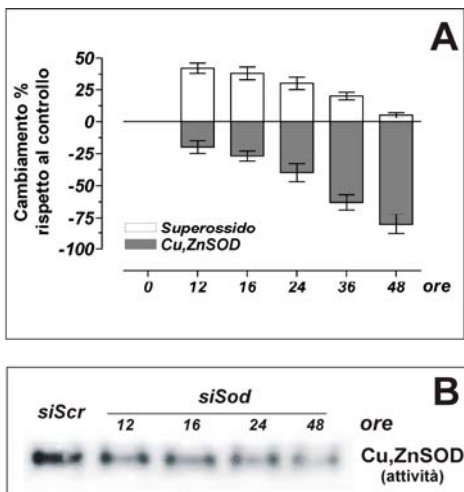


Figura 32. Andamento della concentrazione di superossido, dell'espressione e dell'attività della Cu,ZnSOD nel tempo

A) 12, 16, 24, 36 e 48h dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* i lisati delle cellule SH-SY5Y sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per controllare i livelli intracellulari di Cu,ZnSOD. Il contenuto di superossido è stato determinato tramite marcatura con DHE e analisi citofluorimetrica. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n = 3$). B) 12, 16, 24 e 48h dopo la transfezione 30 μ g di proteine totali sono stati sottoposti a Gel-elettroforesi nativa e l'attività della Cu,ZnSOD è stata visualizzata come descritto nei "Materiali e Metodi". La figura mostra il negativo dell'immagine ottenuta.

A questo punto, per verificare se responsabile dell'attivazione di Cdk5/p35 sia direttamente la carenza di Cu,ZnSOD o il conseguente incremento del superossido, abbiamo condotto gli esperimenti sopra-riportati in presenza dell'antiossidante NAC (*N-Acetil-L-Cisteina*). Le cellule SH-SY5Y sono così state transfettate con *siScr* e *siSod*, e incubate con NAC 5mM per 16 e 24h. Come mostrato in Fig.33, il trattamento con questo antiossidante è in grado di inibire l'attivazione di Cdk5 ed il conseguente accumulo della proteina p35 nelle cellule *siSod*.

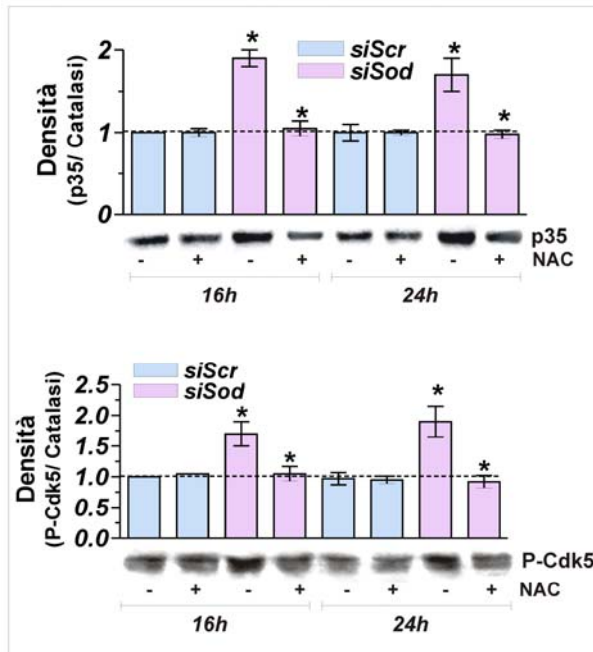


Figura 33. Analisi dell'attivazione di Cdk5/p35 dopo trattamento con NAC.

Dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state trattate con NAC 5mM per 16 e 24 h. Gli estratti proteici sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di p35 e P-Cdk5. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$).

Per verificare se anche il danno all'equilibrio dell'F-actina sia anch'esso determinato dall'incremento del superossido piuttosto che direttamente dalla carenza della proteina Cu,ZnSOD, abbiamo analizzato il contenuto di actina nella frazione TI dopo trattamento con NAC 5mM. Come mostrato in

Fig.34, il fenomeno di depolimerizzazione dell'actina nelle cellule *siSod* è prevenuto dall'uso dell'antiossidante a 16 e 24h, poiché ad entrambi i tempi i livelli di actina nella frazione polimerizzata si mantengono equiparabili a quelli delle cellule *siScr*.

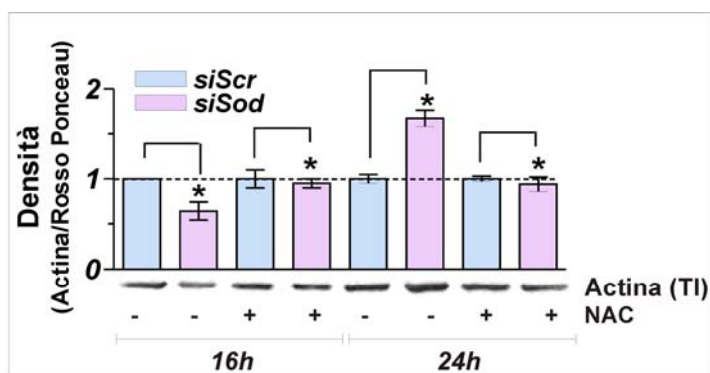


Figura 34. Analisi della polimerizzazione dell'actina dopo RNAi e trattamento con NAC.

Dopo la transfezione con *siScr* e *siSod* le cellule SH-SY5Y sono state trattate con NAC 5mM per 16 e 24 h. Le cellule sono state poi sottoposte a frazionamento per isolare la frazione TI. Gli estratti proteici così ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e Western blot per visualizzare il contenuto di actina. Barre, media \pm D.S. (* $p < 0,001$; $n=3$).

DISCUSSIONE

Tra le varie isoforme di SOD quella contenente Cu e Zn è la proteina maggiormente studiata e meglio caratterizzata dal punto di vista strutturale e funzionale. Nonostante ciò, in questi ultimi anni stanno emergendo nuovi aspetti riguardanti il ruolo fisiologico di questo enzima e riguardo gli effetti della sua carenza. In particolare, si è sviluppato un grosso interesse della comunità scientifica internazionale nello studio del ruolo della Cu,ZnSOD nell'insorgenza di disordini del mitocondrio e del citoscheletro correlati alle malattie neurodegenerative e l'invecchiamento. Tuttavia, la maggior parte degli studi finora condotti, sono stati focalizzati sugli effetti che l'overespressione di mutanti di questa proteina provoca a livello intracellulare, dando per scontato che non la perdita dell'attività, ma l'acquisizione di attività accessorie da parte delle forme mutate di questo enzima sia responsabile dell'eziologia delle malattie neurodegenerative correlate.

Tramite l'uso dell'RNA interference, è stato possibile studiare adeguatamente una finestra temporale nella quale si evidenziano i principali effetti intracellulari della carenza della Cu,ZnSOD in cellule di neuroblastoma umano.

La prima osservazione importante riguarda il dato che in condizioni basali la vitalità cellulare non viene influenzata dalla carenza di Cu,ZnSOD, anche quando, a 48h, il suo calo diventa di circa l'80%. Le cellule, invece mostrano una marcata mortalità solo se sottoposte a stress ossidativo.

Quello cui ci aspettavamo di assistere era un graduale aumento del superossido intracellulare man mano che il calo della Cu,ZnSOD sotto effetto dell'RNA interference diveniva più importante. Ma a 48h dalla transfezione è stato possibile visualizzare solo un piccolo incremento (~5%) della concentrazione di ROS. A quel punto erano possibili due ipotesi: 1) che la concentrazione rimanente di Cu,ZnSOD era ancora sufficiente a tamponare la produzione basale di superossido o 2) che potevano essersi via, via instaurati dei meccanismi di compensazione in grado di tamponare il flusso di superossido, controbilanciando efficacemente la carenza di Cu,ZnSOD. La seconda ipotesi si è verificata la più attendibile. La cellula è, infatti, dotata di un'importante difesa antiossidante non enzimatica costituita dalla molecola a piccolo peso molecolare GSH, la cui concentrazione può essere rapidamente aumentata in risposta allo stress ossidativo, tenendo conto che né la MnSOD né la catalasi subivano alcun incremento. La carenza di Cu,ZnSOD induce un significativo incremento intracellulare di GSH, che, se inibito con BSO o diammidici, porta al danno ossidativo delle proteine sotto forma di carbonilazione e alla conseguente morte cellulare. In più, l'insorgenza di questo meccanismo di compensazione può essere

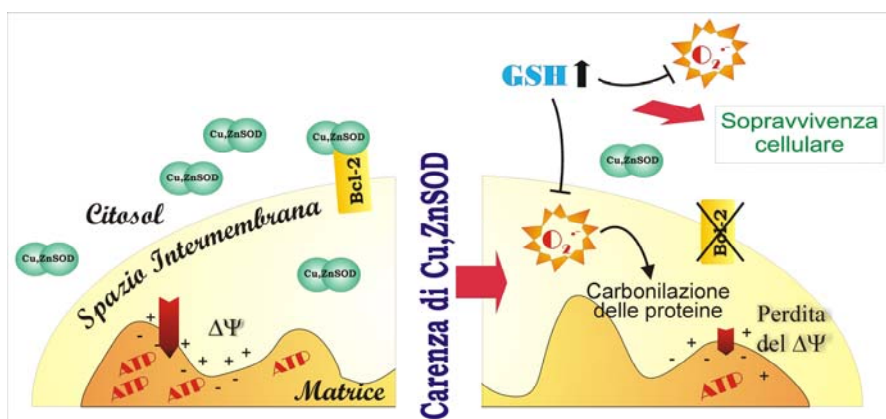
considerato di significato generale per le cellule di origine neuronale, dato che si verificava non solo nelle cellule SH-SY5Y, ma anche nelle CHP-100. Questo ci permette di ipotizzare che l'assenza di fenotipi neuropatologici nei giovani topi *sod1^{-/-}* sia essenzialmente dovuto al probabile incremento di antiossidanti capaci di rimuovere il superossido prodotto fisiologicamente. Questi dati sono in accordo con quelli precedentemente pubblicati nel nostro laboratorio secondo i quali l'overespressione di un mutante inattivo della Cu,ZnSOD in cellule di neuroblastoma umano induce un accumulo di GSH indispensabile alla sopravvivenza cellulare (Ciriolo et al., 2001). In ogni caso, l'incremento di GSH, è sufficiente solo a controbilanciare il flusso fisiologico di superossido, dato che lo stress ossidativo indotto con il sistema della Xantina/Xantina Ossidasi (che mima gli effetti fisiologici dell'infiammazione o dell'ischemia/riperfusion) induce morte cellulare. Quest'ultimo dato ben si accorda con quello derivante dalla letteratura per cui il danno neurologico nei topi *sod1^{-/-}* si evidenzia solo dopo stress ossidativo da ischemia/riperfusion (Reaume et al., 1996).

Il mitocondrio è il compartimento intracellulare a più elevato metabolismo ossidativo, e come tale rappresenta da una parte la principale fonte intracellulare di ROS, dall'altra il principale bersaglio delle specie reattive dell'ossigeno che vi si originano. In entrambi i casi, la mancata regolazione della sua attività, porta ad un duplice danno ossidativo: mitocondriale prima, e della cellula intera poi. La corretta attività mitocondriale risulta fondamentale per la sopravvivenza cellulare, al punto che è stato visto che mitocondri danneggiati, in quanto possibile fonte intracellulare di molecole pro-ossidanti, vengono rimossi dalla cellula con un meccanismo attivo di autofagia (Lemasters, 2005). Per questa ragione, il mitocondrio è fornito di una difesa antiossidante appropriata, rappresentata primariamente dalla MnSOD. Tuttavia, con questo lavoro abbiamo dimostrato che anche la presenza della Cu,ZnSOD all'interno del mitocondrio è fondamentale per la protezione di questo compartimento dallo stress ossidativo. Infatti, la fine regolazione della sua concentrazione è necessario a proteggere il mitocondrio dai danni derivanti dal superossido, non già quello prodotto in condizioni di stress, ma quello presente in condizioni basali. I dati qui riportati, hanno dimostrato che, nonostante il calo percentuale della concentrazione di Cu,ZnSOD sia notevolmente minore rispetto a quello del citoplasma dopo RNA interference, il mitocondrio possiede livelli maggiori di proteine carbonilate, in accordo con la particolare suscettibilità di questo compartimento allo stress ossidativo (Finkel et al., 2000; Filomeni et al., 2005). Ciò conferma l'importanza della localizzazione di questa proteina nel mitocondrio e suggerisce, al tempo

stesso, l'esistenza di un più lento turnover della Cu,ZnSOD in questo compartimento.

I mitocondri, oltre ad essere l'organulo deputato alla sintesi di ATP e dunque alla costituzione del patrimonio energetico della cellula, svolgono un ruolo cruciale nell'apoptosi, grazie alla presenza al loro interno di diversi fattori in grado di modularla. La funzione anti-apoptotica della proteina Bcl-2, ancorata sulla membrana esterna mitocondriale, è nota oramai dai primi anni '90. Recentemente è emerso un suo ruolo importante anche nei processi di autofagia (Patingre et al., 2005). Tuttavia, i dettagli del suo funzionamento intracellulare rimangono ancora da chiarire. Si tratta di una proteina multidominio in grado di interagire con numerose proteine con funzioni anche molto differenti tra di loro. La sua attività anti-apoptotica sembra regolata dal suo stato di fosforilazione specialmente su un *loop* altamente flessibile (FLD, flexible loop domain). In particolare, la singola fosforilazione su un residuo (Ser70) presente sul FLD di Bcl-2 sembra aumentarne la funzione anti-apoptotica. È giusto dire, però, che i dati presenti in letteratura sono talvolta discordanti sul significato di questa fosforilazione sulla Ser70, anche perchè spesso carenti di accurati controlli sullo stato di fosforilazione di altri residui sullo stesso *loop* (infatti, sembra che ciascuna fosforilazione aggiuntiva attribuisca una peculiare funzione a Bcl-2) (Ruvolo et al., 2001). Bcl-2 è presente, dunque, sulla membrana mitocondriale esterna cui aderisce tramite un dominio trans-membrana presente all'estremità C-terminale. In questa sede, essa è in grado di interagire direttamente con i VDAC, permettendo il mantenimento del potenziale trans-membrana (Tsujimoto et al., 2000), inibendo la fuoriuscita del cyt c e di conseguenza l'innescò del processo apoptotico. Una sua correlazione con la Cu,ZnSOD è emersa da studi sia in modelli animali (Azzuz et al., 2000) che in modelli cellulari di fSLA (Lee et al., 2001), per i quali la sovra-espressione di Bcl-2 proteggeva da quella dei mutanti della Cu,ZnSOD. Ancora, la contemporanea down-regolazione di Bcl-2 e della Cu,ZnSOD è stata dimostrata nei linfociti dei pazienti con SLA sporadica (Cova et al., 2006). Una diretta interazione tra le due proteine emerge solo in un lavoro (Pasinelli et al., 2004) ed è stata confermata nel corso dei presenti studi. Infatti, anche nel nostro sistema sperimentale, Bcl-2 ha mostrato di interagire con la Cu,ZnSOD nelle cellule SH-SY5Y, ma non nella sua forma fosforilata. In associazione a questo fenomeno, abbiamo dimostrato che la down-regolazione della Cu,ZnSOD induce l'aumento di Bcl-2 nella forma fosforilata sulla Ser70 e dei suoi livelli di carbonilazione. L'ultimo fenomeno è tipico di condizioni di stress ossidativo e precede la down-regolazione di Bcl-2 (Cahuana et al., 2004) che pure si presenta dopo la

down-regolazione della Cu,ZnSOD. Lo scenario dell'interrelazione tra queste due proteine sembra particolarmente interessante e merita di essere ulteriormente approfondito. È possibile, ad esempio, speculare che l'associazione con la Cu,ZnSOD protegga Bcl-2 dall'ossidazione indotta dai radicali normalmente prodotti nel mitocondrio. Infatti, bisogna osservare che la frazione mitocondriale è già di per sé particolarmente "ricca" di proteine carbonilate, dimostrando ancora una volta di essere maggior sede di sintesi dei radicali ma anche il loro maggior bersaglio.



Schema 1: Effetti della down-regolazione della Cu,ZnSOD sull'omeostasi mitocondriale.

La normale concentrazione di Cu,ZnSOD assicura il mantenimento del potenziale transmembrana mitocondriale e la normale sintesi di ATP intracellulare grazie all'associazione con la proteina Bcl-2. La sua carenza induce danno mitocondriale in termini di aumento dei livelli di carbonilazione delle proteine mitocondriali inclusa Bcl-2, perdita di Bcl-2, conseguente perdita del $\Delta\Psi$ e della sintesi di ATP. In ogni caso, la sopravvivenza cellulare è assicurata dall'aumento dell'antiossidante tripeptidico GSH che, in condizioni di assenza di stress, è sufficiente a controbilanciare gli effetti dannosi del superossido.

Questo spiegherebbe in primo luogo perché la diminuzione della Cu,ZnSOD indotta tramite RNA interference porta al decremento della forma non fosforilata di Bcl-2, in quanto l'unica in grado di interagire con essa. In secondo luogo, darebbe un significato funzionale all'interazione stessa, poiché sarebbe necessaria ad evitare l'apertura dei VDAC e la conseguente perdita del potenziale transmembrana mitocondriale. Quest'ultimo fenomeno, in effetti, si verifica in seguito a diminuzione della Cu,ZnSOD, ed è ascrivibile solo alla perdita di Bcl-2 (come dimostrato dagli esperimenti di

transfezione con *siBcl2*) e porta, infine, alla diminuzione della sintesi di ATP. I dati fin qui discussi evidenziano l'esistenza di un ruolo fondamentale della Cu,ZnSOD nel mantenimento del potenziale transmembrana e dunque dell'omeostasi mitocondriale mediato da Bcl-2. Lo schema sopra riportato (Schema 1) riassume gli eventi successivi al decremento di Cu,ZnSOD.

I ROS, quando presenti a concentrazioni intracellulari elevate, sono in grado di danneggiare in maniera più o meno irreversibile macromolecole come le proteine. A causa della sua struttura, il citoscheletro rappresenta uno dei bersagli preferenziali dei ROS, poiché le proteine che lo compongono sono estremamente abbondanti e dotate di residui altamente reattivi in grado di essere direttamente ossidati. Osservando le cellule di origine neuronale SH-SY5Y dopo RNA interference, è possibile notare dei fenomeni di cambiamento della loro morfologia in termini di arrotondamento della maggior parte delle cellule e riduzione del numero dei prolungamenti tipici di questa linea. La prima e più ovvia ipotesi formulata è che queste modificazioni potessero essere ascrivibili ad un parallelo cambiamento dell'equilibrio delle principali strutture citoscheletriche, quali ad esempio i microfilamenti, indotta dall'accumulo di ROS. Dati dalla letteratura, infatti, dimostrano che l'actina che li compone rappresenta un bersaglio ossidativo preferenziale nel citoscheletro, e inducendo una significativa riorganizzazione di questa struttura (Dalle Donne et al., 2001; Dalle Donne et al., 2002). Inoltre, esperimenti di immunoprecipitazione hanno dimostrato che proprio l'actina è in grado di interagire con la Cu,ZnSOD, e che questa interazione è accresciuta nei suoi mutanti (Takamija et al., 2005). Perciò, la seconda ipotesi formulabile era quella per cui la diminuzione dei livelli di Cu,ZnSOD potesse in qualche modo influenzare l'omeostasi del citoscheletro, come influenzava quello del mitocondrio tramite l'interazione con Bcl-2. Tuttavia, i cambiamenti morfologici osservati avvenivano a tempi brevi dalla transfezione (16h), quelli in cui i livelli di Cu,ZnSOD erano ancora di poco diminuiti, ma anche quelli in cui l'accumulo dei ROS era più evidente, dando adito a pensare che la prima ipotesi fosse la più corretta. L'osservazione delle cellule in microscopia a fluorescenza dopo marcatura con falloidina, ha mostrato una significativa riduzione della fluorescenza dell'F-actina dopo transfezione con la sequenza *siSod*, dimostrando che i cambiamenti morfologici avvenivano, almeno in parte, per una diminuzione della sua polimerizzazione. Tuttavia, l'actina, in assenza di Cu,ZnSOD, non solo subisce un processo di depolimerizzazione, ma anche un calo di suoi livelli totali, come evidenziato dai Western blot. Il dato che a tempi più lunghi dalla transfezione (24 e 48h) si assisteva ad un recupero dell'F-actina in termini di fluorescenza, avvalorava ancora di più l'ipotesi del danno ROS-

dipendente, dato che proprio a questi tempi si verifica il recupero dello stato redox determinato dall'aumento dei livelli di GSH oltre che il più significativo decremento di Cu,ZnSOD. L'iniziale perdita dell'F-actina, confermata mediante Western blot, veniva recuperata ai tempi lunghi mediante una ripolimerizzazione, ma non è da escludere anche una probabile risintesi. Tuttavia, sono da scartare fenomeni di cambiamento dei livelli di mRNA di questa proteina, come confermato dall'RT-PCR. Non è da escludere, però, che a carico dell'actina si verificano inizialmente cambiamenti redox dipendenti come la carbonilazione, e che questo ne aumenti la sua degradazione mediante i classici sistemi intracellulari di smaltimento delle proteine danneggiate, come quello del proteasoma. Se, infatti, fossero attivi altri sistemi di taglio e degradazione, come quello delle calpaine, in Western blot sarebbero visibili delle bande di degradazione a più basso peso molecolare, che invece non sono evidenti neanche tramite l'uso di anticorpi policlonali.

I cambiamenti morfologici delle cellule, dopo RNA interference, non sono solo ascrivibili al cambiamento dei livelli di actina (totale e polimerizzata), poiché essi sembrano accompagnati anche dal calo della β -tubulina (ma non della sua isoforma α -) e dall'aumento dei livelli di NF-L. In particolare il danno ai microtubuli è confermato dall'aumento dei livelli di Tau associata al citoscheletro. Infatti, Tau è una proteina che ha la funzione di stabilizzare i microtubuli, laddove danneggiati, associandosi ad essi nella sua forma meno fosforilata (Xie et al., 1998). Lo stress ossidativo, inoltre, sembra correlato all'aumento di Tau fosforilata, che pure si verifica nel nostro sistema cellulare e che, in accordo con la letteratura, si rinviene nella frazione citosolica (Xie et al., 1998). Inoltre, di recente è emerso che Tau, associandosi all'F-actina, sia in grado di stabilizzarla (Fulga et al. 2007).

Tutti i dati fin qui raccolti sembrano concordare con l'ipotesi che l'accumulo di ROS conseguente al calo di Cu,ZnSOD sia responsabile dei danni transienti al citoscheletro, del suo riarrangiamento e dunque del cambiamento della morfologia delle cellule SH-SY5Y. I caratteristici cambiamenti del contenuto di actina, si sono dimostrati tipici delle cellule neuronali, anche di specie diversa. Infatti, anche le cellule umane CHP100 e le murine NSC34 sottostanno ad una diminuzione dei livelli totali di actina e della sua forma polimerizzata. Il dato che il citoscheletro delle cellule AGS e le M14 risultava apparentemente insensibile al calo di Cu,ZnSOD si può spiegare almeno in parte con la diversa suscettibilità di queste cellule allo stress ossidativo. È noto, infatti, che le cellule neuronali sono particolarmente sensibili allo stress ossidativo (Mattson et al., 2006) e che, ad esempio, le cellule AGS abbiano una difesa antiossidante particolarmente

potenziata (Filomeni et al., 2005a). Nelle cellule di origine neuronale poi, i ROS sono responsabili dell'attivazione della chinasi ciclina-dipendente 5 (Cdk5), la quale è nota per influenzare la migrazione cellulare, la dinamica dei microfilamenti e dei microtubuli (Dhavan et al., 2001; Sahlgren et al., 2006). La sua attivazione conduce prima all'accumulo e poi al taglio della sua subunità regolatrice p35. Quest'ultima è espressa solo a livello dei neuroni, rendendo questo pathway caratteristico di queste linee cellulari. In effetti, dopo decremento della Cu,ZnSOD si verifica l'attivazione di Cdk5, che viene così fosforilata, assieme all'aumento dei livelli intracellulari di p35. Il fatto che non si osservi il taglio tipico della p35 nelle subunità p25-p10, deriva probabilmente dall'efficiente tamponamento della produzione di O_2^- a tempi oltre le 24h. L'attivazione di questo pathway, comunque, può in parte essere la causa della depolimerizzazione dei microtubuli, e viene in ogni caso inibita dall'uso dell'antiossidante NAC. Infatti, il trattamento con NAC dopo RNA interference, inibisce la fosforilazione di Cdk5, l'accumulo di p35 e contemporaneamente la depolimerizzazione dell'actina, avvalorando ancor più l'ipotesi del rimodellamento del citoscheletro ROS-dipendente.

L'altra faccia dei ROS è rappresentata dalla loro capacità di modulare *pathway* di segnalazione chinasi implicati nel ristabilire l'equilibrio del citoscheletro stesso. È il caso di p38MAPK, che può essere attivata in condizioni di stress ossidativo portando alla fosforilazione di Hsp27, promuovendo, infine, la riorganizzazione del citoscheletro e la resistenza alla morte cellulare (Huot et al., 1996; Huot et al., 1997). Ancora, p38 può attivare la fosforilazione di Hsf1, attivando la trascrizione della stessa Hsp27, e l'accumulo di quest'ultima è noto per essere una risposta ROS-mediata al danno ai microfilamenti (Huot et al., 1997). Questa combinazione di eventi si ritrova proprio in questo sistema sperimentale. Il decremento della Cu,ZnSOD, infatti, inducendo un rapido accumulo intracellulare di ROS, innesca l'attivazione di p38 come dimostrato anche dall'attivazione della sua chinasi a monte MKK3/6. P-p38 a sua volta è responsabile della traslocazione di Hsf1 nel nucleo a 16 e 24h, come dimostrato dagli esperimenti condotti in presenza dell'inibitore di p38 SB203580. Hsf1, come detto sopra, è il fattore responsabile della trascrizione di Hsp27, che infatti si accumula in seguito al decremento di Cu,ZnSOD, per poi associarsi al citoscheletro. L'aumento dei livelli di Hsp27, e la sua conseguente stabilizzazione del citoscheletro, è stato correlato alla resistenza allo stress ossidativo e sembra essere uno *step* necessario al ritardo del ciclo cellulare e la protezione dalla morte apoptotica (Lee et al., 2007). Infatti, l'uso dell'inibitore di p38, bloccando la traslocazione di Hsf1, e quindi la

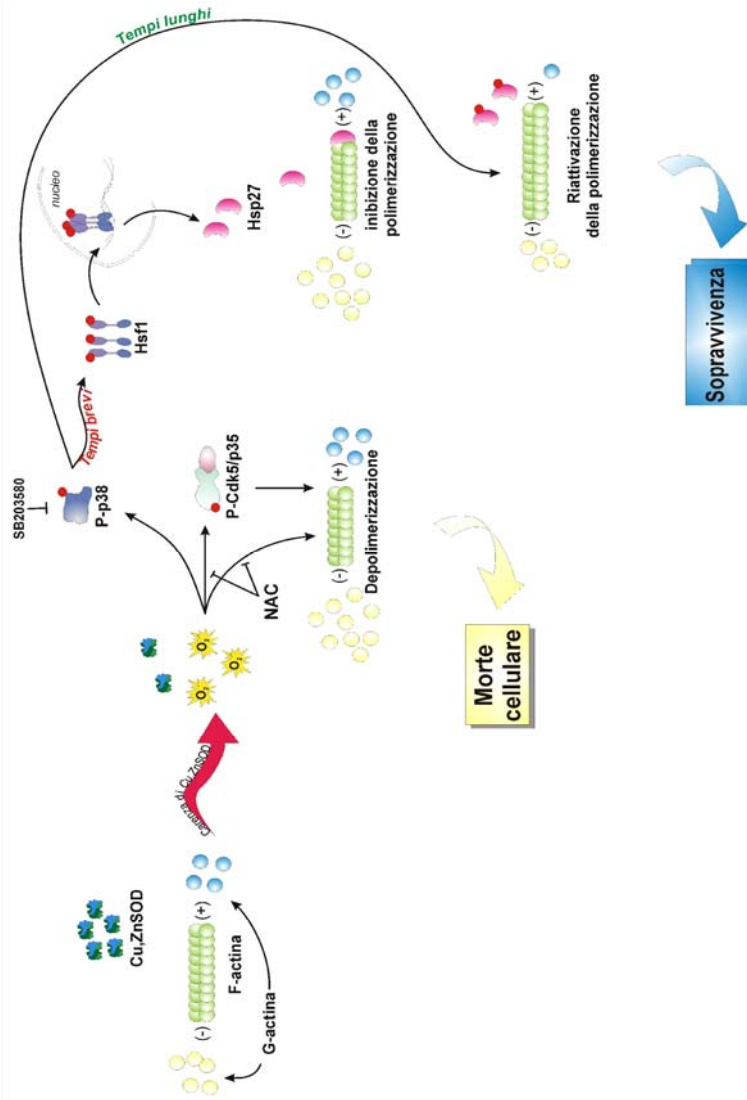
trascrizione di Hsp27, induce morte cellulare come dimostrato dall'analisi in citofluorimetria dopo marcatura con ioduro di propidio. Il conseguente distacco di Hsp27 dal citoscheletro è probabilmente dovuto alla persistenza della segnalazione chinasi di p38, che a sua volta fosforila Hsp27 e dunque induce il distacco dall'F-actina. I dati riguardanti gli effetti della down-regolazione della Cu,ZnSOD sul citoscheletro di cellule di origine neuronale, ci offrono una ulteriore chiave di lettura per spiegare l'elevata concentrazione intracellulare di questo enzima. La sua così elevata concentrazione sembra essere in effetti necessaria ad evitare un seppur transiente flusso di superossido all'interno della cellula; flusso che, nonostante il successivo aumento di GSH, è, in una breve finestra di tempo, responsabile dell'attivazione di percorsi redox sensibili in grado di destabilizzare transientemente il citoscheletro. Questa complessa rete di eventi è schematizzata nello Schema 2.

In effetti, è possibile ipotizzare una comune chiave di lettura per entrambi gli eventi, quelli legati al citoscheletro e quelli legati al mitocondrio. I mitocondri, infatti, come gli altri organelli intracellulari, si trovano imbrigliati nella rete del citoscheletro. I loro movimenti, specie nelle cellule neuronali, sono finemente regolati, come anche i loro cicli di fissione e fusione.

Dati presenti in letteratura, dimostrano che l'F-actina lega direttamente i mitocondri interagendo con i VDAC e regolandone l'apertura/chiusura insieme a Bcl-2 (Tsujimoto et al., 2002). La stessa Hsp27 è in grado di inibire il processo di morte apoptotica inibendo la fuoriuscita di cyt c dai mitocondri (Gorman et al., 2005). Per questa ragione è possibile ipotizzare uno scenario temporale come il seguente: l'aumento intracellulare di superossido, attivando percorsi redox contrapposti, dapprima intacca il citoscheletro e poi è responsabile del recupero del danno e dell'inibizione dell'apoptosi; il parziale sconvolgimento dell'equilibrio del citoscheletro potrebbe essere comunque in grado successivamente di operare come cofattore alla perdita del potenziale transmembrana, già indotta dal calo di Bcl-2.

Schema 2: Effetti della down-regolazione della Cu,ZnSOD sul citoscheletro.

I microfilamenti sono in equilibrio tra la forma polimerizzata (F-actina) e quella non (G-actina). La Cu,ZnSOD assicura un adeguato stato redox intracellulare. Infatti, il suo decremento induce l'accumulo del radicale superossido e il conseguente decremento e depolimerizzazione dell'F-actina direttamente e indirettamente, tramite l'attivazione di Cdk5/p35. Contemporaneamente, tuttavia, si ha l'attivazione di meccanismi di compensazione quali quello dell'attivazione di p38MAPK. Una volta attivata, p38 induce



l'attivazione di Hsf1 e conseguentemente l'aumento dei livelli di Hsp27. Quest'ultima, dapprima si lega al citoscheletro inibendone la polimerizzazione, poi si stacca da esso, probabilmente fosforilata da p38, e riattiva la polimerizzazione.

Qualunque dei due meccanismi venga prima o dopo, gli studi sulla down-regolazione della Cu,ZnSOD ci hanno mostrato come una piccola variazione della sua concentrazione induca comunque un effetto rapido e rilevante sullo stato redox intracellulare. Inoltre, la sua funzione, finora catalogata come citosolica, in realtà si è rivelata di grande importanza nel mitocondrio, dove sembra correlarsi in maniera stretta a quella della proteina Bcl-2. L'attività enzimatica della Cu,ZnSOD è ben nota, ma il suo ruolo intracellulare merita di essere ancora approfondito, benché questo lavoro abbia la pretesa di aver messo un piccolo tassello alla sua comprensione.

I risultati di questa tesi sperimentale sono stati oggetto di pubblicazione su due riviste scientifiche *peer reviewed*.

Aquilano K., **Vigilanza P.**, Rotilio G. and Ciriolo M.R. (2006) Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1. *The FASEB J.* 20:1683-1685.

Vigilanza P., Aquilano K., Rotilio G. and Ciriolo M.R. (2008). Transient cytoskeletal alterations after SOD1 depletion in neuroblastoma cells. *Cell. Mol. Life Sci.* (Pubblicato on-line il 1° Feb 2008)

BIBLIOGRAFIA

- Adam-Vizi V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1140-1149.
- Adam-Vizi V. and Chinopoulos C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 639-645.
- Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Butterfield D.A., Geddes J.W. and Markesbery W.R. (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 103: 373-383.
- Al-Chalabi A, Miller CC. (2003) Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays.* 25: 346-355.
- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E. and Starkov A.A. (2005) Mitochondrial Metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow).* 70: 200-214.
- Arrigo A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 936-944.
- Azzouz M., Hottiger A., Paterna J. C., Zurn, A.D. Aebischer P., and Bueler H. (2000) Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* 9: 803-881.
- 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: 217-21.
- Banan A., Fitzpatrick L., Zhang Y. and Keshavarzian A. (2001) OPC compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 287-298.
- 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.
- Bartnikas T.B. and Gitlin J.D. (2003) Mechanisms of biosynthesis of mammalian Copper/Zinc Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 278: 33602-33608.
- Basu A. and Haldar S. (1998) Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of Bcl2 protein. *Int J Oncol.* 13: 659-664.
- Beal M.F. (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58: 495-505.
- Beyer RE. (1992) An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol* 70: 390-403.
- Blander G., de Oliveira R.M., Conboy C.M., Haigis M., and Guarente L. (2003) Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 278: 38966–38969
- Boillée S., Vande Velde C. and Cleveland DW. (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 52: 39-59.
- Boutte A.M., Woltjer R.L., Zimmerman L.J., Stamer S.L., Montine K.S., Manno M.V., Cimino P.J., Liebler D.C. and Montine T.J. (2006) Selectively increased oxidative modifications mapped to detergent-insoluble forms of A β and β -III tubulin in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 20: 1473-1483.
- Boveris A, Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-16.
- Cadenas E., Sies H., Nastainczyk W. and Ullrich V. (1983) Singlet oxygen formation detected by low-level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G2 to H2. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364: 519-528.

- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Cahuana G.M., Tejedo J.R., Jimenez J., Ramirez R., Sobrino F., and Bedoya F.J. (2004) Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulinsecreting RINm5F cells. *Exp. Cell Res.* 293: 22-30.
- Carvalho F., Duarte J.A., Neuparth M.J., Carmo H., Fernandes E., Remião F. and Bastos M.L. (2001) Hydrogen peroxide production in mouse tissues after acute d-amphetamine administration. Influence of monoamine oxidase inhibition. *Arch. Toxicol.* 75: 465-469.
- Casareno R.L., Waggoner D. and Gitlin J.D. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 23625-23628.
- Cashman N.R., Durham H.D., Blusztajn J.K., Od, K., Tabira T., Shaw I.T., Dahrouge S. and Antel J.P. (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev. Dyn.* 194: 209-221.
- Ciriolo M.R., Aquilano K., De Martino A., Carri M.T., and Rotilio G. (2001) Differential role of superoxide and glutathione in S-nitrosoglutathione-mediated apoptosis: a rationale for mild forms of familial amyotrophic lateral sclerosis associated with less active Cu,Zn superoxide dismutase mutants. *J. Neurochem.* 77, 1433–1443.
- Coll O., Colell A., García-Ruiz C., Kaplowitz N. and Fernández-Checa J.C. (2003) Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology.* 38: 692-702.
- Cova E., Cereda C., Galli A., Curti D., Finotti C., Di Poto C., Corato M., Mazzini G. and Ceroni M. (2006) Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci. Lett.* 399: 186-190.

- Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B. and Gitlin J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272: 23469-72.
- Dhavan R. and Tsai L.H. (2001) A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 749-759.
- Dalle Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. (2001a) The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1624-1632.
- Dalle Donne I., Rossi R., Giustarini D., Gagliano N., Di Simplicio P., Colombo R. and Milzani A. (2002) Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 927-937.
- Dalle Donne I., Rossi R., Giustarini D., Gagliano N., Lusini L., Milzani A., Di Simplicio P. and Colombo R. (2001b) Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1075-83.
- Dalle Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R. and Milzani A. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 389-406.
- Davies K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Davies K.J.A., Lin S.W. and Pacifici R.E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 262: 9914-9920.
- Dean R.T., Gieseg S. and Davies M.J. (1993) Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 437-441.
- Delacourte A. and Buée L. (1997) Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int Rev Cytol.* 171: 167-224..

- de Oliveira R.B., de Bittencourt Pasquali M.A., Filho A.Z., Dalmolin R.J., Gelain D.P., Gottfried C., Rodrigues J.L., Klamt F. and Moreira J.C. (2007) Can electrons travel through actin microfilaments and generate oxidative stress in retinol treated Sertoli cell? *Mol Cell Biochem.* 301: 33-45.
- Donald S.P., Sun X.Y., Hu C.A., Yu J., Mei J.M., Valle D. and Phang J.M. (2001) Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res* 61: 1810-1815.
- Eiserich J.P., Estévez A.G., Bamberg T.V., Ye Y.Z., Chumley P.H., Beckman J.S. and Freeman B.A. (1999) Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6365-6370.
- Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S., Jackson Roberts L., Van Remmen H., Epstein C.J., and Huang T.T. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene.* 24: 367-380.
- Fanara P., Banerjee J., Hueck R.V., Harper M.R., Awada M., Turner H., Husted K.H., Brandt R. and Hellerstein M.K. (2007) Stabilization of hyperdynamic microtubules is neuroprotective in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 282: 23465-23472.
- Farah M.E. and Amberg D.C. (2007) Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 18: 1359-1369.
- Fernández-Checa J.C., Kaplowitz N., García-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Marí M., Ardite E. and Morales A. (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 273(1 Pt 1):G7-17.
- Ferri A., Cozzolino M., Crosio C., Nencini M., Casciati A., Gralla E.B., Rotilio G., Valentine J.S. and Carrì M.T. (2006) Familial ALS-

superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:13860-13865.

Filomeni G., Rotilio G. and Ciriolo M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1057-1064.

Filomeni G., Aquilano K., Rotilio G. and Ciriolo M.R. (2005a) 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 M.R. (2005b) Antiapoptotic response to induced GSH depletion: involvement of heat shock proteins and NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 446-55.

Finkel T. (2000) Redox-dependent signal transduction *FEBS Lett.* 476: 52-54.

Finkel T. and Holbrook N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.

Flood D.G., Reaume A.G., Gruner J.A., Hoffman E.K., Hirsch J.D., Lin Y.G., Dorfman K.S. and Scott R.W. (1999) Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of neuromuscular junctions. *Am. J. Pathol.* 155: 663-672

Fojta M., Kubicarova T., Vojtesek B. and Palecek E. (1999) Effect of p53 protein redox states on binding to supercoiled and linear DNA. *J. Biol. Chem.* 274: 25749-25755.

Fulga T.A., Elson-Schwab I., Khurana V., Steinhilb M.L., Spires T.L., Hyman B.T. and Feany M.B. (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* 9: 139-148.

Gélinas S., Chapados C., Beaugard M., Gosselin I. and Martinoli M.G. (2000) Effect of oxidative stress on stability and structure of neurofilament proteins. *Biochem Cell Biol.* 78: 667-674.

- Gilbert H.F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange In: *Advances in enzymology* (Meister, A., ed.) New York, Wiley Interscience. pp.69-173.
- Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F. and Pelicci P.G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*. 122: 221-233.
- Goldsteins G., Keksa-Goldsteine V., Ahtoniemi T., Jaronen M., Arens E., Akerman K., Chan P.H. and Koistnaho J. (2008) Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem. In press*.
- Gorman A.M., Szegezdi E., Quigney D.J. and Samali A.. (2005) Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 801-810.
- 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.
- Guzman A., Wood W.L., Alpert E., Prasad M.D., Miller R.G., Rothstein J.D., Bowser R., Hamilton R., Wood T.D., Cleveland D.W., Lingappa V.R. and Liu J. (2007) Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 12524-12529.
- Gutteridge J.M. and Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.* 899: 136-147.
- Han D., Williams E. and Cadenas E. (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353: 411-416.

- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278: 5557-5563.
- Harman D. (1981) The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7124-7128.
- Harrison J.F., Hollensworth S.B., Spitz D.R., Copeland W.C., Wilson G.L. and LeDoux S.P. (2005) Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res.* 33: 4660-4671.
- Holmgren A. and Luthman M. (1978) Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay. *Biochemistry* 17: 4071-4077.
- 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.
- Huang T.T., Carlson E.J., Gillespie A.M., Shi Y.P. and Epstein C.J. (2000) Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B5-B9
- Huang T.T., Carlson E.J., Gillespie A.M., and Epstein C.J. (1998) Genetic modification of the dilated cardiomyopathy and neonatal lethality phenotype of mice lacking manganese superoxide dismutase. *Age Ageing* 21: 83-84,
- Hung J.J., Cheng T.J., Lai Y.K. and Chang M.D. (1998) Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J. Biol. Chem.* 273: 31924-31931.
- Huot J., Houle F., Spitz D.R. and Landry J. (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 56: 273-279.

- Huot J., Houle F., Marceau F. and Landry J. (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 80, 383-392.
- Iñarra P. (2002) Purification and determination of activity of mitochondrial cyanidesensitive superoxide dismutase in rat tissue extract. *Methods Enzymol.* 349: 106-114.
- Iñarra P., Moini H., Rettori D., Han D., Matinez, J. Garcia, I. Fernandez-Vizarra E., Iturralde M. and Cadenas E. (2005) Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochem. J.* 387: 203-209.
- Iñarra P., Moini H., Han D., Rettori D., Aguiló I., Alava M.A., Iturralde M. and Cadenas E.. (2007) Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis. *Biochem. J.* 405: 173-179.
- Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P. and Rouleau G.A. (2007) Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Ann. Neurol.* 62: 553-559.
- Kakkar P. and Singh B.K. (2007) Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol. Cell. Biochem.* 305: 235-53.
- Kang K.W., Lee S.J. and Kim SG. (2005) Molecular Mechanism of Nrf2 Activation by Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1664-1673.
- Kikuchi H., Furuta A., Nishioka K., Suzuki S.O., Nakabeppu Y. and Iwaki T. (2002) Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 103: 408-414.
- Kim N.H. and Kang J.H. (2003) Oxidative modification of neurofilament-L by copper-catalyzed reaction. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 488-492.

- Kira Y., Sato E.F. and Inoue M. (2002) Association of Cu,Zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 399: 96-102.
- Kostrominova T.Y., Pasyk K.A., Van Remmen H., Richardson A.G. and Faulkner J.A. (2007) Adaptive changes in structure of skeletal muscles from adult *Sod1* homozygous knockout mice. *Cell. Tissue Res.* 327: 595-605.
- Kumar MJ, Nicholls DG, Andersen JK. (2003) Oxidative alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition via subtle elevations in monoamine oxidase B levels results in loss of spare respiratory capacity: implications for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 46432-46439.
- Kunduzova O.R., Bianchi P., Parini A. and Cambon C. (2002) Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* 448: 225-230.
- Kusano H., Shimizu S., Koya R.C, Fujita H., Kamada S., Kuzumaki N. and Tsujimoto Y. (2000) Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene.* 19: 4807-4814.
- Kwong L.K. and Sohal R.S. (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 350:118-26.
- Lambrechts D, Robberecht W, Carmeliet P. (2007) Heterogeneity in motoneuron disease. *Trends Neurosci.* 30: 536-544.
- Landino L.M., Koumas M.T., Mason C.E. and Alston J.A. (2007) Modification of tubulin cysteines by nitric oxide and nitroxyl donors alters tubulin polymerization activity. *Chem Res Toxicol.* 20: 1693-700.
- Landis, G.N. and Tower J. (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Aging Develop.* 126: 365–379.

- Lash L.H. (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem. Biol. Interact.* 163: 54-67.
- Lebovitz R.M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J., Dionne L., Lu N., Huang S. and Matzuk M.M. (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9782-9787.
- Lee J.H., Sun D., Cho K.J., Kim M.S., Hong M.H., Kim I.K., Lee J.S. and Lee J.H. (2007) Overexpression of human 27 kDa heat shock protein in laryngeal cancer cells confers chemoresistance associated with cell growth delay. *J. Cancer Res. Clin. Oncology* 133: 37-46.
- Lee M., Hyun D.H., Halliwell B. and Jenner P. (2001) Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J. Neurochem.* 78: 209-220.
- 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.
- Lee S.R., Bar-Noy S., Kwon J., Levine R.L., Stadtman T.C. and Rhee S.G. (2000) Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2521-2526.
- Lee V.M., Goedert M. and Trojanowski J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1121-59.
- Lemasters J.J. (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 8: 3-5.

- Li G., Yin H. and Kuret J. (2004) Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J. Biol. Chem.* 279: 15938-15945.
- Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C., and Epstein C.J. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11: 376-381.
- Lledias F., Rangel P. and Hansberg W. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273: 10630-10637.
- Löffler M., Becker C., Wegerle E. and Schuster G. (1996) Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochem. Cell. Biol.* 105: 119-28.
- Lovell M.A. and Markesbery W.R. (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res. In Press.*
- Luthman M. and Holmgren A. (1982) Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry.* 21:6628-6633.
- Matthews J.R., Wakasugi N., Virelizier J.L., Yodoi J. and Hay R.T. (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* 20: 3821-3830.
- Mattiazzi M., D'Aurelio M., Gajewski C.D., Martushova K., Kiaei M., Beal M.F. and Manfredi G. (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 277: 29626-29633.
- McCord J.M. and Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

- Maloney M.T. and Bamburg J.R. (2007) Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. *Mol Neurobiol.* 35: 21-44.
- Mannella C.A. (1998) Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J. Struct. Biol.* 121: 207-218.
- Mao G., Pan X., Zhu B.B., Zhang Y., Yuan F., Huang J., Lovell M.A., Lee M.P., Markesbery W.R., Li G.M. and Gu L. (2007) Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 35: 2759-2766.
- Mattson M.P. and Magnus T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 278-294.
- Maurel A., Hernandez C., Kunduzova O., Bompard G., Cambon C., Parini A. and Francés B. (2003) Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284:H1460-7.
- Mazanetz M.P. and Fischer P.M.. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 464-479.
- McMurray C.T. (2000) Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton? *Cell Death Differ.* 7: 861-865
- Miwa S., St-Pierre J., Partridge L. and Brand M.D. (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 35: 938-948.
- Muller F.L., Liu Y. and Van Remmen H. (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 49064-49073.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O. and Remacle J. (1994) Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 235-248.

- Mirabelli F., Salis A., Perotti M., Taddei F., Bellomo G. and Orrenius S. (1988) Alterations of surface morphology caused by the metabolism of menadione in mammalian cells are associated with the oxidation of critical sulfhydryl groups in cytoskeletal proteins. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3423-3427.
- Murakami T., Nagai M., Miyazaki K. Morimoto N., Ohta Y., Kurata T., Takehisa Y., Kamiya T. and Abe K. (2007) Early decrease of mitochondrial DNA repair enzymes in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice carrying a mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 1150: 182-189.
- Murashov A.K., Ul Haq I., Hill C., Park E., Smith M., Wang X., Wang X., Goldberg D.J. and Wolgemuth D.J. (2001) Crosstalk between p38, Hsp25 and Akt in spinal motor neurons after sciatic nerve injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 93: 199-208.
- Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Yamaguchi H., Sakumi K. (2007) Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 85: 919-934.
- Nakamura H., Nakamura K. and Yodoi J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 351-369.
- Neely M.D., Sidell K.R., Graham D.G. and Montine T.J. (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J. Neurochem.* 72: 2323-2333.
- 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. *J. Immunol. Methods.* 139: 271-279.
- Niewiadomska G., Baksalerska-Pazera M. and Riedel G. (2006) Cytoskeletal transport in the aging brain: focus on the cholinergic system. *Rev. Neurosci.* 17: 581-618.

- Nimnual A.S., Taylor L.J. and Bar-Sagi D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biology* 5: 236-241.
- Nixon R.A. and Lewis S.E. (1986) Differential turnover of phosphate groups on neurofilament subunits in mammalian neurons in vivo. *J. Biol. Chem.* 261: 16298-16301.
- Nixon R.A. and Shea T.B.(1992) Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 22: 81-91.
- Noor, R., Mittal, S., and Iqbal, J. (2002) Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med. Sci. Monit.* 8, RA210-215.
- Oh-Ishi M., Ueno T. and Maeda T. (2003) Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 11-22.
- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 38388-38393.
- Okamoto T., Ogiwara H., Hayashi T., Mitsui A., Kawabe T. and Yodoi J. (1992) Human thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor activates the enhancer binding protein of human immunodeficiency virus type 1 by thiol redox control mechanism. *Int. Immunol.* 4: 811-819.
- O'Reilly P.J., Hickman-Davis J.M., Davis I.C. and Matalon S. (2003) Hyperoxia impairs antibacterial function of macrophages through effects on actin. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*28: 443-450.
- Parker J.D., Parker M.K., Sohal B.H., Sohal R.S. and Keller L. (2004) Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3486-3489.
- Pasinelli P., Belford M.E., Lennon N., Bacskai B.J., Hyman B.T., Trotti D. and Brown R.H. Jr. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated

SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*. 43: 19-30.

Patrick G.N., Zhou P., Kwon Y.T., Howley P.M. and Tsai L.H. (1998) p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 24057-24064.

Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P. and Tsai L.H. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615-622.

Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D. and Levine B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 122: 927-939.

Poppek D., Keck S., Ermak G., Jung T., Stolzing A., Ullrich O., Davies K.J., Grune T. (2006) Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem. J.* 400: 511-520.

Powell S.R., Gurzenda E.M. and Wahezi S.E. (2001) Actin is oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1171-1176.

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.

Rafiee P., Theriot M.E., Nelson V.M., Heidemann J., Kanaa Y., Horowitz S.A., Rogaczewski A., Johnson C.P., Ali I., Shaker R. and Binion D.G. (2006) Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and Hsp27. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C931-945.

Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.F., Wilcox H.M., Flood D.G., Beal M.F., Brown R.H. Jr, Scott R.W.

- and Snider W.D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13: 43-47.
- Raha S., McEachern G.E., Myint A.T. and Robinson B.H. (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 29: 170-180.
- Rainwater R., Parks D., Anderson M.E., Tegtmeier P. and Mann K. (1995) Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3892-3903.
- Reed D.J. (1990) Glutathione: toxicological implication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.
- Ricci C., Pastukh V., Leonard J., Turrens J., Wilson G., Schaffer D. and Schaffer S.W. (2007) Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* *In press*
- Rokutan K., Johnston R.B. Jr. and Kawai K. (1994) Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* 266: G247-G254.
- Rothstein J.D., Bristol L.A., Hosler B., Brown R.H., Jr. and Kuncl R.W. (1994) Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4155-4159.
- Rotilio G., Morpurgo L., Giovagnoli C., Calabrese L. and Mondovì B. (1972) Studies of the metal sites of copper proteins. Symmetry of copper in bovine superoxide dismutase and its functional significance. *Biochemistry.* 11: 2187-2192.
- Rotilio G., Mavelli I., Rossi L. and Ciriolo M.R. (1985) Biochemical mechanism of oxidative damage by redox-cycling drugs. *Environ. Health Perspect.* 64: 259-264.
- Ruvolo P.P., Deng X., May W.S. (2001) Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia.* 15: 515-522.

- Sahlgren C.M., Pallari H.M., He T., Chou Y.H., Goldman R.D. and Eriksson J.E. (2006) A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J.* 25: 4808-4819.
- 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.
- Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C. and Davies K.J.A. (1990) Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* 265: 11919-11927.
- Santa-María I., Smith M.A., Perry G., Hernández F., Avila J. and Moreno F.J. (2005) Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740: 472-80.
- Sen C.K. (1998) Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1747-1758.
- 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.
- Schraufstatter I., Hyslop P.A., Jackson J.H. and Cochrane C.G. (1988) Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest.* 82: 1040-1050.
- Shefner J.M., Reaume A.G., Flood D.G., Scott R.W., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.F., Upton-Rice M. and Brown R.H. Jr (1999) Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53: 1239-1246.
- Simic M.G., Bergtold D.S. and Karam L.R. (1989) Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutat. Res.* 214: 3-12.

- Skulachev V.P. (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q.Rev. Biophys.* 29: 169-202.
- Slivka A., Mytilineou C. and Cohen G. (1987) Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain Res.* 409: 275-284.
- Spector A., Kleiman N.J., Huang R.R. and Wang R.R. (1989) Repair of H₂O₂-induced DNA damage in bovine lens epithelial cell cultures. *Exp. Eye Res.* 49: 685-698.
- Spiteller G. (2006) Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 362-387.
- Smith M.A., Rudnicka-Nawrot M., Richey P.L., Praprotnik D., Mulvihill P., Miller C.A., Sayre L.M. and Perry G. (1995) Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 64: 2660-2666.
- Smith C.V., Jones D.P., Guenther T.M., Lash L.H. and Lauterburg B.H. (1996) Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxico. Appl. Pharmacol.* 140: 1-12.
- Starkov A.A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B.J., Browne S.E., Patel M.S. and Beal M.F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 24: 7779-7788.
- Stewart B.J., Doorn J.A. and Petersen D.R. (2007) Residue-specific adduction of tubulin by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal causes cross-linking and inhibits polymerization. *Chem Res Toxicol.* 20: 1111-1119.
- Strocchi P., Pession A. and Dozza B. (2003) Up-regulation of cDK5/p35 by oxidative stress in human neuroblastoma IMR-32 cells. *J. Cell. Biochem.* 88: 758-765.

- Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R. and Culotta V.C. (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276: 38084-38089.
- 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.
- Suzuki Y., Ono Y. and Hirabayashi Y. (1998) Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 425: 209-212.
- Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Gu J., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Overexpression of mutated Cu,Zn-SOD in neuroblastoma cells results in cytoskeletal change. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: 253-259.
- Teebor G.W., Boorstein R.J. and Cadet J. (1988) The repairability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. In. *J. Radiat. Biol.* 54: 131-150.
- Tian Q. and Wang J. (2002) Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 11: 262-9.
- Tretter L. and Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci.* 24: 7771-7778.
- Tsujimoto Y. and Shimizu S. (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 7: 1174-1181.

- Ushio-Fukai M., Zafari A.M., Fukui T., Ishizaka N. and Griending 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.
- Valentine J.S and Gralla E.B. (1997) Delivering copper inside yeast and human cells. *Science.* 278: 817-818.
- Vijayvergiya C., Beal M.F., Buck J. and Manfredi G.. (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice *J. Neurosci.* 25: 2463-2470.
- Xie H., Litersky J.M., Hartigan J.A., Jope R.S. and Johnson G.V. (1998) The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res.* 798, 173-183.
- Whatley S.A., Curti D., Das Gupta F., Ferrier I.N., Jones S., Taylor C. and Marchbanks R.M.(1998) Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol. Psychiatry.* 3: 227237.
- Wolff S.P, Garner A. and Dean R.T. (1986) Fragmentation of proteins by free radicals and its effects on their susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Biochem. J.* 234: 399-403.
- Wu H.H. and Momand J. (1998) Pyrrolidine dithiocarbamate prevents p53 activation and promotes p53 cysteine residue oxidation. *J. Biol. Chem.* 273: 18898-18905.
- Zheng M., Aslund F. and Storz G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-1721.

I miei ringraziamenti vanno a tutti coloro che hanno creduto in questo lavoro e offerto fiducia alle mie capacità. Grazie anche a coloro che hanno dubitato, ma soprattutto a chi ha saputo proporre e suggerire la strada da intraprendere di fronte ai bivi incontrati nel corso degli ultimi tre anni.

Un grazie alla Prof. Ciriolo, soprattutto per la pazienza dimostrata e che spero di aver saputo ricambiare con questo lavoro.

Un grazie speciale a Katia Aquilano, al suo spirito critico e propositivo e al suo aiuto tecnico, qualità fondamentali per il compimento di questo lavoro. Grazie per l'amicizia discreta e le serate al cinese a chiacchiere di esperimenti, di ipotesi e tesi, anche mai verificate...

Grazie a Sara Baldelli per la terza mano offerta in aiuto delle mie sole due e a tutto il Lab 360 per aver condiviso successi e difficoltà di questo lungo percorso.

Last but not least, ringrazio Fabio, compagno di vita e sostegno indispensabile per poter perseverare in un lavoro impegnativo e appassionante come quello che mi sono scelto.