



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

**DOTTORATO IN BIOCHIMICA E
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
XVIII Ciclo**

**Identificazione e caratterizzazione di geni
coinvolti nell’adattamento allo stress ossidativo e
nella chemioresistenza**

Dottorando

Dott. Nicola Montesano Gesualdi

Docente guida

Prof.ssa Franca Esposito

Controrelatore

Prof.ssa Piera Quesada

Coordinatore

Prof. Giuseppe D’Alessio

Ringraziamenti

Un immenso grazie ai miei genitori, per avermi amato, sostenuto e fatto crescere, avermi dato la serenità di studiare e conseguire la laurea. Avrei voluto ci foste anche ora che si conclude questa ulteriore tappa della mia vita, a te papà che mi hai seguito dall'alto proprio da quando il percorso di dottorato iniziava e a te, mia cara e adorata mamma, che lo stai facendo da così poco... Vi porto con me e non mancherò mai di far sapere quanto splendidi siate stati.

Grazie a Franca, per motivi che oltrepassano di gran lunga i suoi indiscutibili meriti professionali, didattici e formativi: grazie di avermi aspettato e compreso, per aver condiviso, persino, quegli ostacoli che quotidianamente hanno fatto parte della mia vita in questi quattro lunghi, travagliati, agrodolci anni, "siamo una squadra fortissimi". Grazie alle mie maestre di lab: a Lucia e Pinuzza, cui voglio un mondo di bene, sorelle maggiori, presenze rassicuranti, due persone vere, al di là di ogni retorica. A Mary T e Manu, care e affettuose, con cui ho condiviso lunghe giornate in lab sempre con un sorriso sulle labbra: vi auguro la massima fortuna. Grazie ai miei più recenti compagni di viaggio, Serena, che ha appena cominciato il suo periodo "catartico" di dottorato, Alessia e Velia appena laureate, e Nadia e Maurizio che lo saranno tra un po'. Grazie a tutti, nessuno escluso, i ragazzi e i prof. del III piano, Daria e il prof. D'Alessio. Grazie al Prof. Cimino per la disponibilità e la fiducia accordatami di cui sono onorato. Grazie al prof. Russo per i suoi preziosi consigli scientifici e per una lettera... Grazie ad Ale e Marc, e a tutti i miei amici di Matera e Napoli.

Infine, un voluminoso grazie alla mia Lina per tutti quei motivi che tengono uniti due persone che... 5!

Sommario

La comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'adattamento allo stress ossidativo riveste un ruolo importante per la salute umana, soprattutto nelle patologie in cui le condizioni di stress ne favoriscono l'insorgenza, quali le neoplasie e le malattie infiammatorie e degenerative croniche. La selezione di due linee cellulari di osteosarcoma umano (Saos-2) adattate a crescere in condizioni di blando stress ossidativo da DEM (diethylmaleato), agente depletore di glutatione ridotto, si è rivelata utile per questo tipo di studio. Parametri biochimici come l'aumento di GSH intracellulare, la maggiore resistenza ai danni ossidativi al DNA e la minore induzione di chinasi da stress, nonché la reversibilità del fenomeno hanno suggerito che queste cellule adattate avevano modificato profondamente il proprio assetto di espressione genica che abbiamo analizzato mediante la tecnica del mRNA differential display. Abbiamo, quindi, studiato due geni iperespressi nel nostro sistema sperimentale: AROS-29 e Trap-1.

1. *AROS-29*: mediante studi sul promotore abbiamo dimostrato una regolazione del gene di tipo trascrizionale, fortemente influenzata dallo stato ridotto della cellula. Inoltre, generando cloni stabilmente iperesprimenti la proteina, abbiamo dimostrato che AROS-29 induceva maggiore resistenza al danno ossidativo e all'apoptosi mediante saggi comet di dosaggio del danno al DNA e analisi citofluorimetrica.

2. *TRAP-1*: TRAP-1 è una heat shock protein mitocondriale. Una maggiore espressione del gene era già stata dimostrata in cellule resistenti al cisplatino ed è stato recentemente suggerito un suo possibile ruolo nell'apoptosi indotta da ROS. I livelli della proteina diminuiscono in seguito all'induzione di apoptosi con cisplatino solo nelle cellule non adattate indicando che la diminuzione di Trap-1 sia necessaria perché la cellula attivi il processo di morte programmata e che la sua iperespressione nelle cellule adattate sia in parte responsabile della loro resistenza all'apoptosi. Per supportare tale ipotesi, abbiamo prodotto cloni stabili iperesprimenti la proteina in cellule Saos-2 e dimostrato un ruolo funzionale di Trap-1 nella protezione dai danni ossidativi e dall'apoptosi. Mutanti di delezione ci hanno permesso di dimostrare che la rimozione dei primi cento amminoacidi della proteina è responsabile della perdita della funzione antiapoptotica di Trap-1 poiché il mutante che ne è privo agisce da dominante negativo.

L'adattamento allo stress ossidativo è un fenomeno strettamente correlato alla chemioresistenza. Il sistema sperimentale di adattamento da noi selezionato, e l'identificazione di due geni la cui espressione era indotta in tali condizioni biologiche, ci ha stimolato a ipotizzare che i livelli di espressione di AROS-29 e Trap-1 potessero risultare incrementati anche in linee tumorali resistenti a differenti chemioterapici. Abbiamo analizzato l'espressione di Trap-1 e AROS-29 in due linee cellulari di HT29 (carcinoma del colon umano) resistenti al 5-fluorouracile e in una resistente all'oxaliplatino. Entrambi i trascritti sono risultati iperespressi in questi sistemi di chemioresistenza: questi dati suggeriscono meccanismi comuni di adattamento cellulare a diversi tipi di stress, e confermano l'ipotesi che la resistenza allo stress ossidativo possa essere un meccanismo coinvolto nello sviluppo della chemioresistenza.

Summary

Adaptation to oxidative stress plays a crucial role in all stress related diseases like cancer or chronic inflammatory and degenerative diseases. To study the pattern of gene expression induced by adaptation to oxidative stress, we selected two Saos-2 cell lines chronically grown in sub-toxic concentrations of diethylmaleate (DEM), a glutathione (GSH) depleting agent. These cell lines showed higher GSH levels, an increased resistance to oxidative DNA damage and a reduced activation of stress kinases; moreover, the adaptation was transient suggesting that this phenomenon was due only to changes of gene expression pattern and not to genetic alterations. An mRNA differential display screening was performed to discover various genes up-regulated in DEM adapted cells. Two genes of them were selected for further studies: AROS-29 and Trap-1.

1. AROS-29: studies on AROS-29 promoter regions demonstrated that AROS-29 is regulated transcriptionally in a redox dependent manner. The comet assay analysis of DNA damage and cytofluorimetric analysis demonstrated that AROS-29 stable clones increased resistance to oxidative DNA damage and to apoptosis.

2. Trap-1: Trap-1 is a mitochondrial heat shock protein. Trap-1 up-regulation was previously observed in cisplatin resistant cells and it is suggested that it may play a role in ROS-dependent apoptosis. Protein levels lower when apoptosis is induced by cisplatin only in non adapted Saos-2 cells, suggesting that Trap-1 decrease is required to activate apoptosis and that its up-regulation may induce apoptosis resistant phenotype. Likewise AROS-29, Trap-1 stable clones increased resistance to oxidative DNA damage and to apoptosis, confirming the role of Trap-1 in the induction of the adaptation. A deletion mutant of the first 100 aminoacids of the protein acts as a dominant negative protein, reducing the ability of the wild-type Trap-1 to prevent apoptosis; this suggests that N-terminal domain is involved in the protection against apoptosis.

Adaptation to oxidative stress is a phenomenon deeply linked to chemotherapeutic drug resistance. Based on our experimental system and on the identification of these two genes, we supposed that mRNA levels of our genes could be up-regulated also in chemoresistant cell lines. We measured mRNA levels of AROS-29 and Trap-1 in two cell lines of HT29 (human colon carcinoma) resistant to 5-Fluorouracil and in one resistant to oxaliplatin. Both mRNAs were up-regulated in those chemoresistant cell lines supporting our hypothesis that oxidative stress is a mechanism involved in the establishment of chemoresistance.

INTRODUZIONE.....	6
RISPOSTE ADATTATIVE CELLULARI.....	6
STRESS OSSIDATIVO E RISPOSTE ADATTATIVE	7
<i>Lo stress ossidativo.....</i>	7
<i>Le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species).....</i>	7
DIFESE ANTIOSSIDANTI	9
<i>Il Glutatione</i>	9
<i>Altre molecole e sistemi enzimatici antiossidanti.....</i>	11
DANNI DA ROS ALLE MACROMOLECOLE BIOLOGICHE	12
I ROS NELLA REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI CELLULARI.....	14
<i>Regolazione redox dei fattori trascrizionali</i>	15
<i>Regolazione della trasduzione del segnale.....</i>	16
<i>I ROS come secondi messaggeri.....</i>	17
ADATTAMENTO DI LINEE CELLULARI ALLO STRESS OSSIDATIVO	19
ADATTAMENTO ALLO STRESS OSSIDATIVO E CHEMIORESISTENZA	21
<i>Suscettibilità delle cellule ai chemioterapici.....</i>	21
IL DIETILMALEATO (DEM) GENERA CONDIZIONI PRO-OSSIDANTI IN CELLULE VITALI.	23
OBIETTIVO DELLA TESI.....	26
MATERIALI E METODI.....	27
COLTURE CELLULARI.....	27
DOSAGGIO DEL GLUTATIONE	27
PREPARAZIONE DI ESTRATTI PROTEICI TOTALI	27
PREPARAZIONE DI ESTRATTI NUCLEARI E CITOPLASMATICI	28
TRASFEZIONE TRANSIENTE	28
WESTERN BLOT	29
ESTRAZIONE DI RNA TOTALE.....	29
RETROTRASCRIZIONE	30
DIFFERENTIAL DISPLAY	30
<i>Colorazione con nitrato d'argento.....</i>	32
REAL-TIME PCR.....	33
SAGGIO CITOFLUORIMETRICO DELL'ANNESSINA	34
ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL CICLO CELLULARE.....	34
COMET ASSAY	35
CLONAGGIO DEL CDNA DI TRAP-1 NEL VETTORE D'ESPRESSIONE EUCARIOTICO	
PRC/CMV	35
<i>Amplificazione della sequenza codificante la proteina TRAP-1.....</i>	35
<i>Eluizione delle bande dal gel di agarosio</i>	36
<i>Digestione preparativa.....</i>	36
<i>Clonaggio di TRAP-1 in pRC/CMV.....</i>	37
<i>"Minipreparazione" di DNA plasmidico</i>	38
MUTANTI DI DELEZIONE DI TRAP-1	39
CLONAGGIO CDNA E PROMOTORE DI AROS-29.....	40
SAGGIO DI LUCIFERASI	40
RISULTATI.....	42
SELEZIONE DI CELLULE ADATTATE ALLO STRESS OSSIDATIVO.	42
ANALISI DELLE VARIAZIONI DELL'ESPRESSIONE GENICA NELLE CELLULE ADATTATE	
MEDIANTE MRNA DIFFERENTIAL DISPLAY.	43
AROS-29 (ADAPTIVE RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS) È COINVOLTA NELLA RISPOSTA	
ADATTATIVA ALLO STRESS OSSIDATIVO.....	43
TRAP-1, UNA HSP MITOCONDRIALE, PROTEGGE LE CELLULE DAI DANNI OSSIDATIVI E	
DALL'APOPTOSI.	45
CORRELAZIONI TRA ADATTAMENTO ALLO STRESS OSSIDATIVO E CHEMIORESISTENZA:	
RUOLO DI TRAP-1 ED AROS-29	49
DISCUSSIONE	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

Introduzione

Risposte adattative cellulari

Nel corso dell'evoluzione, gli organismi, dai più semplici ai più complessi, hanno messo a punto una serie di meccanismi di risposta a numerosi tipi di stress siano essi di natura chimica, fisica, ossidativa o di danno diretto al DNA. In generale, si tratta di eventi cellulari che, riconosciuto uno stimolo come dannoso, tendono ad organizzare selettive cascate di segnalazione intracellulare fino ad una profonda modificazione dell'espressione genica per far fronte allo stress. La totale comprensione di questi meccanismi riveste un ruolo cruciale per la salute umana, soprattutto nelle patologie in cui le condizioni di stress giocano un ruolo particolarmente importante, quali le neoplasie e malattie infiammatorie e degenerative croniche, perché rappresenta il punto di partenza, ad esempio, per lo sviluppo di antibiotici innovativi o nuovi tipi di molecole ad azione antitumorale.

I più recenti database cercano di classificare tutti i processi biologici, tra cui gli eventi di risposta agli stress, ed organizzarli in elenchi semplici da navigare ai quali è associato tra parentesi il numero di geni coinvolti nel processo in esame. [The Gene Ontology project](#) fornisce questo servizio, e in **figura 1** possiamo notare che sono stati classificati in *homo sapiens* ben 6146 geni associati a 24 diversi tipi di stress.

Un breve esempio di risposta adattativa ad uno stress è riportato in **figura 2**,¹ in cui è evidenziato il network di risposte cellulari che controllano la sopravvivenza e la proliferazione di una cellula eucariotica di *Saccharomyces cerevisiae* in risposta allo stress osmotico: vengono attivati cascate di trasduzione del segnale MAPK dipendenti rivolti non solo ad aumentare le quantità intracellulare di glicerolo indispensabile a contrastare l'iperosmolarità dell'ambiente extracellulare, ma anche cascate di trasduzione del segnale di rimodellamento del citoscheletro e della cromatina, e persino pathway di progressione del ciclo cellulare.

AmiGO

Search GO

Exact Match
 Terms
 Gene Symbol/Name

[Advanced Query](#)
[Query By Sequence](#)

Gene Product Filters

Species

All
A. thaliana
B. anthracis str. Am

Datasource ?

All
CGD
dictyBase

Evidence Code ?

All Curator Approved
IGI
IEP

Ontology Filter

All
Biological Process
Cellular Component
Molecular Function

[XML](#)
[Flat File](#)
[Permalink](#)

Graphical View

all : all (<145069)

GO:0008150 : biological_process (<145069)

- GO:0000004 : biological process unknown (<37140)
- GO:0009987 : cellular process (<77006)
- GO:0007275 : development (<30545)
- GO:0040007 : growth (<17596)
- GO:0051704 : interaction between organisms (<1469)
- GO:0021700 : maturation (<0)
- GO:0007582 : physiological process (<93768)
- GO:0043473 : pigmentation (<98)
- GO:0050789 : regulation of biological process (<30665)
- GO:0000003 : reproduction (<22231)
- GO:0050896 : response to stimulus (<16174)**
- GO:0007610 : behavior (<2656)
- GO:0051716 : cellular response to stimulus (<179)
- GO:0051606 : detection of stimulus (<1544)
- GO:0048583 : regulation of response to stimulus (<11)
- GO:0009628 : response to abiotic stimulus (<6555)
- GO:0009607 : response to biotic stimulus (<3954)
- GO:0009719 : response to endogenous stimulus (<2698)
- GO:0009605 : response to external stimulus (<2589)
- GO:0006950 : response to stress (<6146)**
- GO:0042262 : DNA protection (<3)
- GO:0042596 : fear response (<21)
- GO:0051866 : general adaptation syndrome (<0)
- GO:0043620 : regulation of transcription in response to stress (<2)
- GO:0043555 : regulation of translation in response to stress (<11)
- GO:0009409 : response to cold (<225)
- GO:0006974 : response to DNA damage stimulus (<1680)
- GO:0009413 : response to flooding (<1)
- GO:0009408 : response to heat (<306)
- GO:0009635 : response to herbicide (<5)
- GO:0051599 : response to hydrostatic pressure (<0)
- GO:0001666 : response to hypoxia (<112)
- GO:0051788 : response to misfolded protein (<0)
- GO:0051409 : response to nitrosative stress (<4)
- GO:0006970 : response to osmotic stress (<340)
- GO:0006979 : response to oxidative stress (<495)
- GO:0048265 : response to pain (<14)
- GO:0009613 : response to pest, pathogen or parasite (<1881)
- GO:0042594 : response to starvation (<351)
- GO:0006991 : response to sterol depletion (<7)
- GO:0006986 : response to unfolded protein (<158)
- GO:0009414 : response to water deprivation (<134)
- GO:0009611 : response to wounding (<1310)
- GO:0009432 : SOS response (<28)
- GO:0007600 : sensory perception (<3322)
- GO:0016032 : viral life cycle (<309)
- obsolete_biological_process : obsolete_biological_process (<0)

[Help](#) [GOst](#) [The Gene Ontology](#) [GO Request](#) [AmiGO Request](#)

Last updated: 2006-08-27

Copyright The Gene Ontology Consortium

The Gene Ontology Project. Pagina web che riassume i vari tipi di stress cellulare ed i geni ad essi associati.

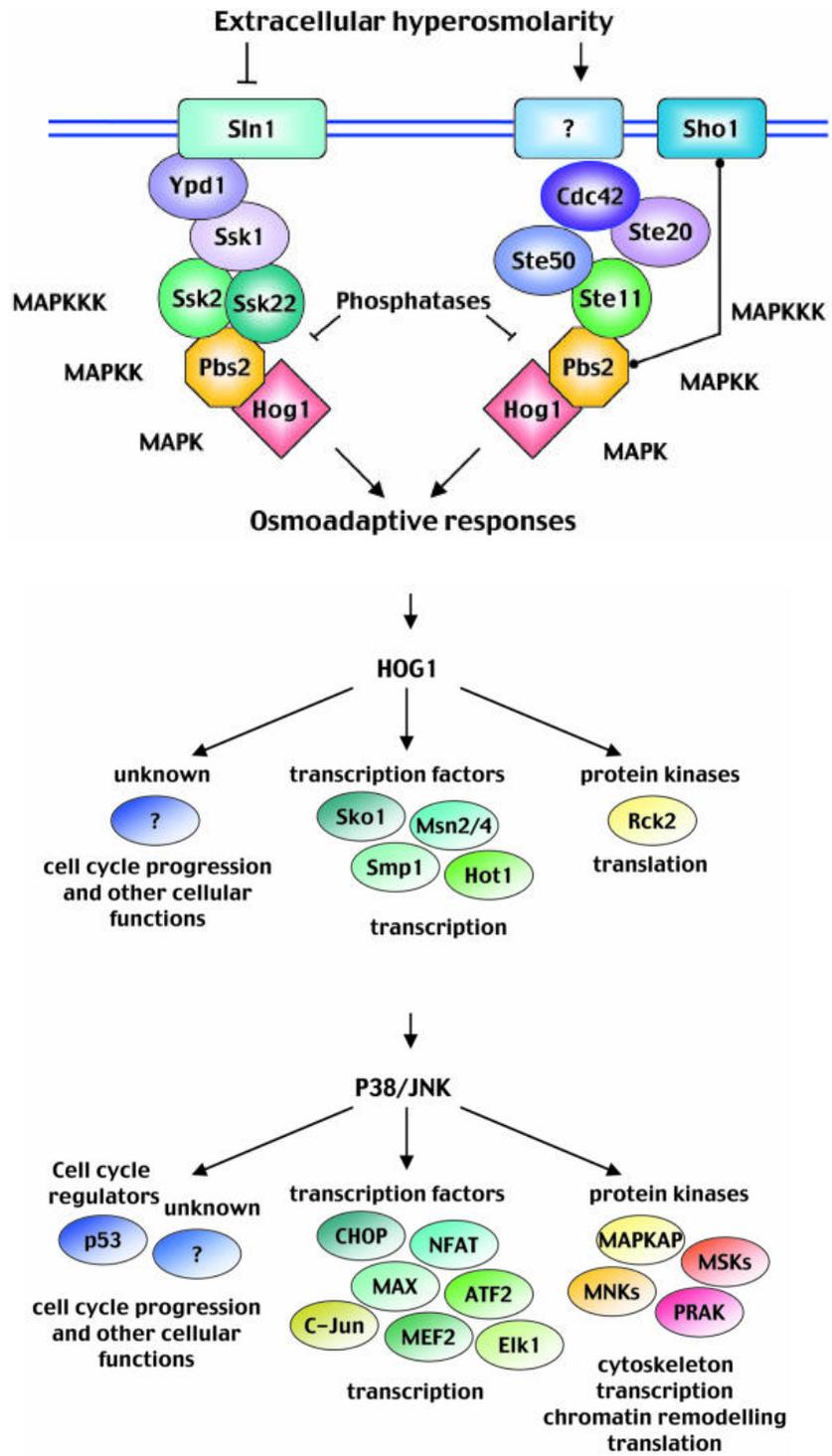


Figura 2

Stress ossidativo e risposte adattative

Lo stress ossidativo

Il metabolismo cellulare include numerose reazioni di ossidoriduzione. Uno squilibrio in senso ossidativo, cioè un aumento di specie chimiche elettronegative o la rimozione di elementi elettropositivi o elettroni, comporta quello squilibrio nei meccanismi omeostatici cellulari che prende il nome di stress ossidativo. I principali responsabili dello stress ossidativo sono le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), molecole elettronicamente instabili capaci di interagire velocemente con le macromolecole biologiche, interferendone con la funzionalità. Lo stress ossidativo si instaura, naturalmente, quando la concentrazione di ROS in una cellula supera la capacità della stessa di far fronte allo squilibrio redox mediante le sue difese antiossidanti.

Le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species)

I ROS sono molecole derivate dall'ossigeno molecolare che comprendono specie radicaliche e non. I radicali (o radicali liberi) sono molecole contenenti un elettrone spaiato nell'orbitale esterno; la necessità di raggiungere una configurazione elettronica più stabile rende loro particolarmente adatti a catturare elettroni da altre molecole o a formare con esse legami covalenti.

I principali radicali dell'ossigeno sono:

HO· (radicale idrossilico);

O₂^{·-} (anione superossido);

HO₂· (radicale idroperossido);

NO· (monossido d'azoto);

ROS di tipo non radicalico sono:

H₂O₂ (perossido d'idrogeno);

¹O₂ (ossigeno singoletto);

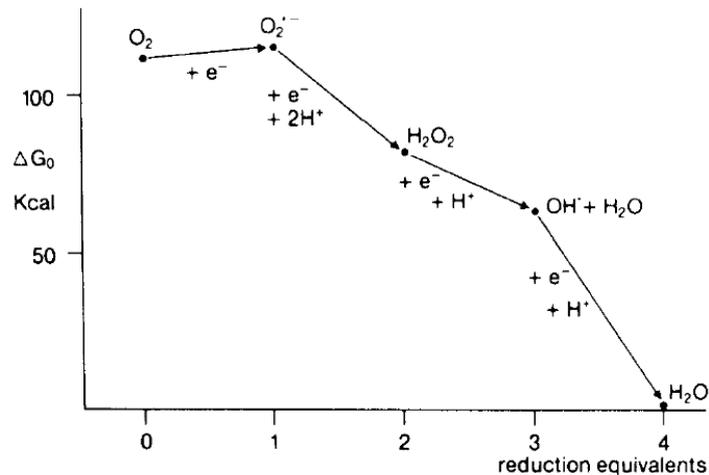
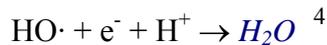
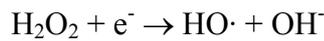
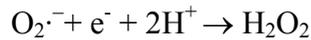
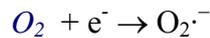
HOCl (acido ipocloroso);

ONOO⁻ (anione perossinitrito).²

Queste molecole, pur non essendo radicali di per sé vengono facilmente convertite in radicale idrossilico.³

La fonte dei ROS è per lo più metabolica; in ciascun compartimento cellulare, infatti, esistono numerose attività enzimatiche coinvolte nella generazione dei ROS.

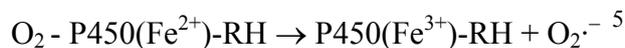
Nei *mitocondri*(*citocromo C e complesso IV*), la riduzione “univalente” dell’ O_2 può portare, nel 2 – 5 % dei casi, alla formazione di numerosi intermedi reattivi:



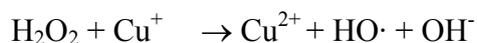
Nei perossisomi la *Aminoacido ossidasi* catalizza la deaminazione ossidativa (cofattori FMN e FAD) di aminoacidi nei relativi α -chetoacidi:



Nel reticolo endoplasmico il complesso del citocromo P450 può liberare anione superossido:



Ioni Cu e Fe possono generare ROS attraverso reazioni di Fenton (ferro e rame possono essere rilasciati anche a livello ematico da transferrina, albumina o ceruloplasmina):



Numerose ossidasi intracellulari (NAD(P)H Ossidasi, Cicloossigenasi, NO sintasi, Xantina ossidasi) producono ROS:



Inoltre una fonte non endogena di ROS è rappresentata dagli xenobiotici particolarmente elettrofili e dall'esposizione a radiazioni ionizzanti.

Difese antiossidanti

Il Glutatione

Il Glutatione, γ -glutammil cisteinil glicina, è un tripeptide non convenzionale, poiché il legame amidico tra glutammina e cisteina coinvolge il gruppo γ -carbossilico della glutammina. Può presentarsi come tripeptide in forma ridotta (GSH), o come dimero di due tripeptidi in forma ossidata (GSSG) in cui due molecole di glutatione sono legate tra loro dai gruppi sulfidrilici delle cisteine. E' il composto tiolico più abbondante nei liquidi biologici e nei tessuti, in particolar modo nel fegato dove è largamente utilizzato nella coniugazione degli xenobiotici nella reazione catalizzata dalla Glutatione-S-Transferasi⁸. Può fungere da antiossidante diretto o essere utilizzato come substrato di numerosi enzimi deputati al controllo dello stato redox della cellula, come la glutaredossina e la tioredossina o la Glutatione perossidasi (Gpx). La sua concentrazione nel citosol delle cellule raggiunge valori nell'ordine del millimolare, e la reazione di ossidazione presenta un $\Delta E^\circ = -0.33 \text{ V}$, altamente negativo, mentre il rapporto tra la forma ridotta rispetto a quella ossidata (GSH/GSSG) è di circa 100:1.

L'omeostasi del Glutatione è mantenuta nella cellula dall'equilibrio tra la sua biosintesi, l'utilizzo, e la sua rigenerazione catalizzata dalla Glutatione reductasi.

La biosintesi del GSH coinvolge due enzimi e parte dalla formazione del legame amidico tra il gruppo γ -carbossilico della Glutammina e il gruppo amminico della Cisteina; questa reazione è catalizzata dalla γ -glutammil – cisteinil sintetasi, o glutammato cisteina ligasi, con consumo di ATP. Le riserve intracellulari di Cisteina rappresentano il fattore limitante di questa reazione, mentre il GSH ridotto inibisce, mediante un feedback su questo enzima, la sua stessa produzione. Il GSH come tale si forma nella reazione catalizzata dalla GSH Sintetasi tra γ -glutammil –cisteina e glicina con spesa di ATP.

A questo punto il GSH è pronto a svolgere le sue numerose funzioni come substrato di enzimi o da solo (*figura 3*).

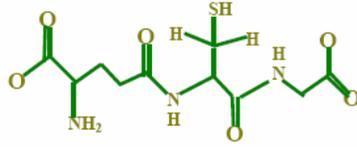
In primo luogo il GSH è substrato di una famiglia di enzimi conosciuti come Glutazione Perossidasi (GPx). Ossidando il Glutazione, le GPx tetrameriche degradano perossidi organici:



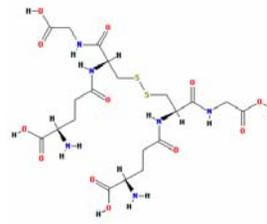
Ne esistono numerose isoforme, selenio dipendenti e non, ciascuna codificata da un diverso gene e si differenziano per la diversa localizzazione intracellulare. La GPx monometrica, associata alle membrane, è specifica per i lipoperossidi di membrana. Come substrato di transidrogenasi il GSH può scindere i disolfuri intracellulari, ripristinare lo stato ridotto dell'acido deidroascorbico in Acido ascorbico o convertire ribonucleotidi in desossiribonucleotidi.⁹ Il GSH può agire da antiossidante diretto in numerose reazioni in cui dona e⁻ formando un radicale scarsamente reattivo o dando origine alla sua forma ossidata GSSG.

La rigenerazione di GSH a partire dal GSSG è catalizzata dalla GSH Reduttasi NADPH dipendente.

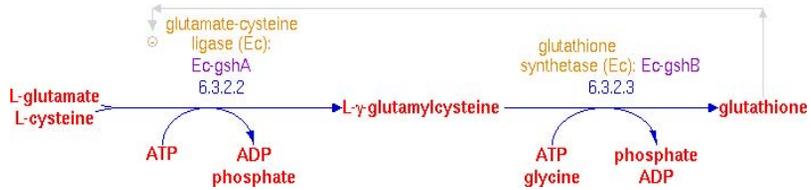
L'aspetto più interessante della biochimica del GSH, per i fondamentali risvolti che assume nella fisiologia cellulare, è rappresentato dal ruolo che svolge nell'omeostasi dei gruppi sulfidrilici delle proteine. Lo stato redox delle cisteine (RSH ↔ RSSR) di molte proteine è fondamentale per la loro attività. Molte proteine tirosina fosfatasi, ad esempio, sono inattivate dall'ossidazione delle cisteine nel loro sito attivo. Ca⁺⁺ ATPasi, Adenilato ciclasi¹⁰, Guanilato ciclasi,¹¹ Piruvato chinasi e molti altri enzimi sono regolati in base allo stato redox delle loro cisteine. Anche l'emoglobina negli eritrociti è sotto controllo redox: l'ossidazione del ferro nell'emoglobina porta alla formazione della metemoglobina, incapace di trasportare ossigeno; la metemoglobina reduttasi ossidando il GSH riconverte la metemoglobina in emoglobina funzionale.¹² Inoltre, il GSH è substrato di tioredossina e glutaredossina, due enzimi coinvolti nella regolazione dello stato ridotto delle cisteine intracellulari. Una blanda ossidazione del compartimento intracellulare comporta la formazione di ioni sulfenici sui residui di cisteine delle proteine. Il glutatione forma addotti covalenti con queste cisteine. Tioredossina e glutaredossina intervengono nel ripristino delle cisteine ridotte rimuovendo gli addotti. Questo meccanismo è stato proposto come probabile



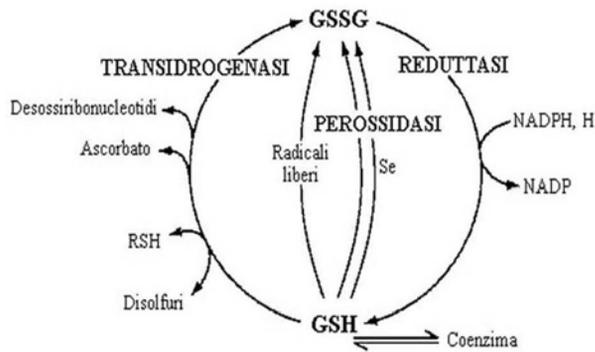
Glutatione ridotto (GSH)



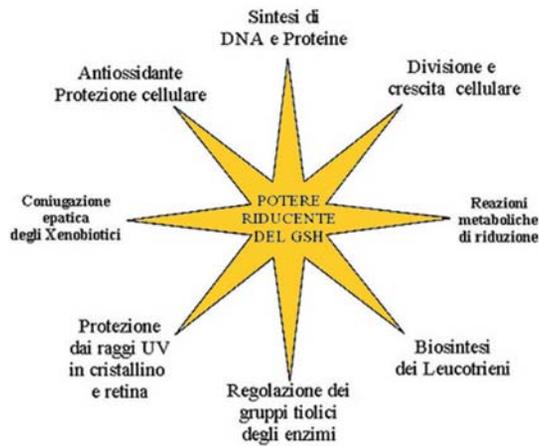
Glutatione ossidato (GSSG)



Biosintesi del GSH



Reazioni di ossidoriduzione del GSH



Principali funzioni del GSH

punto di regolazione della trasduzione del segnale mediato dalle specie reattive dell'ossigeno¹³.

Altre molecole e sistemi enzimatici antiossidanti

Il glutatione e gli enzimi che lo metabolizzano non rappresentano il solo meccanismo di difesa dai ROS messo a punto dalle cellule. Esistono, infatti, numerosi enzimi e molecole antiossidanti che prevengono il danno ossidativo. I principali enzimi coinvolti sono la Superossido Dismutasi (SOD) e la Catalasi: essi tendono a rimuovere direttamente l'ossidante e non intervengono dunque nel controllo delle modificazioni indotte dai ROS sulle macromolecole biologiche.

La SOD dismuta l'anione superossido a perossido d'idrogeno e acqua:

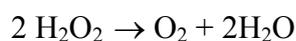


Ne esistono numerose isoforme che si differenziano in base ai cofattori e alla localizzazione cellulare.

La Cu-Zn SOD presenta un atomo di rame ed uno di zinco come cofattori ed è prevalentemente localizzata nel citosol o nel nucleo; la Mn-SOD con il manganese come cofattore è mitocondriale. Ne esistono anche forme secrete.

La Fe-SOD è, invece, prevalentemente batterica; tra i batteri sono state scoperte anche altre isoforme di SOD che utilizzano il Nickel nel proprio sito attivo.

La Catalasi è un'emoproteina prevalentemente perossisomiale che catalizza la dismutazione del perossido d'idrogeno:



Si tratta di un enzima ubiquitario specifico per il perossido d'idrogeno, e non riconosce come substrati i perossidi organici.¹⁴ Si presenta come tetramero ed è uno degli enzimi a più alta velocità di turnover conosciuti, poiché è in grado di dismutare 5 milioni di molecole di perossido d'idrogeno al minuto. Utilizza un atomo di ferro come cofattore nel sito attivo.

Tra le piccole molecole antiossidanti, le principali sono: l'ascorbato, l' α -tocoferolo, la melatonina, il β -carotene, l'urato.

Il Tocoferolo, il principale antiossidante liposolubile, previene la lipoperossidazione nelle membrane generando un radicale scarsamente

reattivo che interrompe le reazioni a catena che caratterizzano questo processo.

La vitamina C, funge da "scavenger" diretto ed idrosolubile dei radicali liberi nei liquidi intra ed extracellulari, ed ha la capacità di rigenerare la vitamina E dopo che questa ha neutralizzato i radicali liberi, formando un radicale ascorbico facilmente riconvertito ad acido ascorbico da una reduttasi NADPH dipendente.¹⁵

La melatonina, un derivato dell'aminoacido Triptofano, era studiata inizialmente come un regolatore dei ritmi circadiani; negli ultimi anni le sono stati riconosciuti i ruoli di immunomodulatore, inibitore della crescita tumorale e regolatore della funzione retinica. Svolge, inoltre, un'importante ruolo antiossidante sia diretto che indiretto: è infatti capace di neutralizzare due molecole di radicale idrossilico con la formazione di ciclico-3-idrossi melatonina oppure una molecola di perossido d'idrogeno con la formazione di N1-acetil-N2-formil-5-metossikinuramina, convertita dalla catalasi in N1-acetil-5-metossikinuramina. La melatonina, inoltre, stimola la biosintesi di numerosi enzimi con azione antiossidante (γ -glutammina-cisteinil sintetasi, SOD).¹⁶

Negli ultimi anni l'interesse nel campo dello stress ossidativo è enormemente cresciuto, e sono state identificate numerose altre proteine coinvolte direttamente o indirettamente nel fenomeno: tra queste vi è l'inibitore dell'RNasi, una proteina di circa 50kD ricca in cisteine (32 residui). È stato suggerito in letteratura un suo ruolo antiossidante, dal momento che in vitro è in grado di fungere da scavenger diretto di numerosi ROS¹⁷, e la sua iperespressione induce un aumento della vitalità cellulare associata ad elevati livelli di GSH e bassi livelli di MalonilDiAldeide (MDA), marker di lipoperossidazione.¹⁸

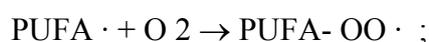
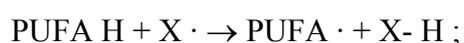
Danni da ROS alle macromolecole biologiche

Nel complesso, i meccanismi di difesa illustrati nel precedente paragrafo, sono fondamentali nel prevenire i danni che i ROS possono provocare alle macromolecole biologiche. Elevate concentrazioni di ROS, infatti, possono comportare modificazioni a proteine, lipidi, carboidrati e DNA.

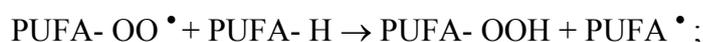
Per ciò che riguarda le proteine, gli aminoacidi più sensibili sono la Prolina, l'Arginina e l'Istidina, le cui modificazioni tendono a frammentare le catene

aminoacidiche. Inoltre il danno ossidativo può causare la formazione di legami crociati tra due o più proteine, mediante l'ossidazione di gruppi sulfidrilici delle cisteine.¹⁹ Nell'insieme queste alterazioni comportano l'abolizione della funzione e la prematura degradazione delle proteine danneggiate. E' stata dimostrata la sensibilità di alcuni enzimi, tra i quali l'aconitasi mitocondriale, all'anione superossido. L'inibizione dell'attività dell'enzima è dovuta al rilascio di ferro libero dal dominio catalitico.²⁰ Le metalloproteine (emoproteine, Cu/Zn SOD) sono sensibili a elevati livelli fisiologici di H₂O₂ che causano il rilascio di ioni metallo e la perdita dell'attività biologica di queste proteine.²¹ Diversi enzimi del ciclo di Calvin (fruttosio bisfosfatasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) sono direttamente inattivati dall'H₂O₂, che ossida i gruppi tiolici importanti per la funzionalità di questi enzimi.²²

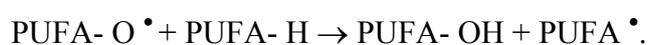
La perossidazione lipidica è considerata la principale fonte di danno da ROS: il processo è costituito da una serie di reazioni a catena di iniziazione, propagazione e terminazione che destabilizzano la struttura del doppio strato fosfolipidico delle membrane e portano alla formazione di prodotti tossici come le aldeidi. Particolarmente suscettibili alla perossidazione sono gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA, PolyUnsaturated Fatty Acids) come l'acido linoleico ed arachidonico. Le reazioni di iniziazione coinvolgono i gruppi metilenici dei PUFA con una specie radicalica, portando alla formazione di lipoperossidi e idroperossidi o coniugati dieni:



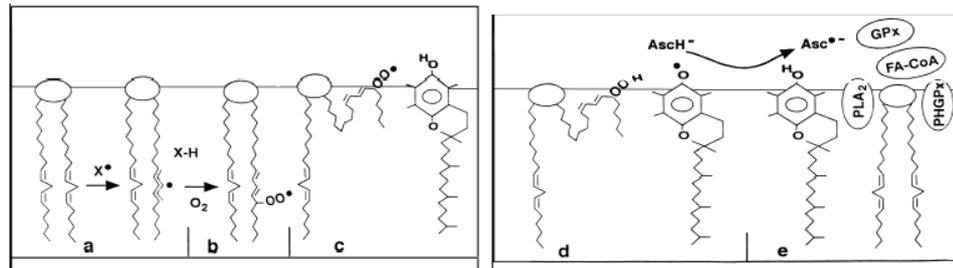
I perossidi formati sono responsabili della propagazione della reazione:



I lipoperossidi, in presenza di metalli ridotti come il Fe²⁺, possono formare ulteriormente altri radicali lipidici capaci di propagare ulteriormente la reazione



L'esito finale è la completa scomposizione del doppio strato lipidico delle membrane.



Infine, i danni al DNA, particolarmente da parte del radicale idrossilico, si evidenziano nella rottura o nel riarrangiamento della doppia elica in seguito alla formazione di idantoine, glicoli, prodotti di deaminazione e riarrangiamenti nell'anello pirimidinico.²³

I ROS nella regolazione delle funzioni cellulari

Ad elevate concentrazioni, i ROS rappresentano indubbiamente una fonte di danno per tutte le macromolecole biologiche. E' oggi chiaro che, a più basse concentrazioni, essi svolgono dei ruoli fondamentali nelle cellule e che siano le cellule stesse, in particolari e controllate condizioni, a produrre la quantità di ROS necessaria per lo svolgimento di funzioni biologiche quali la crescita cellulare, la morte per apoptosi, il differenziamento, la risposta immunitaria. L'interesse dei biochimici per i radicali liberi è nato a fine anni 60 con la scoperta della SOD, prima dimostrazione di come i sistemi biologici si erano evoluti in modo da difendersi dagli insulti ossidativi a loro carico. Le prime evidenze sulla funzionalità fisiologica dei ROS si sono ottenute in quelle linee cellulari in cui la loro produzione è più consistente: la linea monocito-macrofagica, quella dei granulociti neutrofili e più recentemente le cellule NK.²⁴ In queste cellule la NADPH ossidasi, la mieloperossidasi e la NO sintasi producono anione superossido, acido ipocloroso e monossido d'azoto nel complesso di reazioni conosciuto come "esplosione respiratoria",²⁵ evento fondamentale nelle risposte citotossiche del sistema immunitario. Nel tempo, però, è stato chiarito il ruolo dei ROS anche in altre linee cellulari in cui la produzione fisiologica di queste molecole non è correlata a effetti citotossici nei confronti di agenti patogeni. In alcuni casi queste molecole sembrano comportarsi come veri e propri secondi messaggeri, al pari, ad esempio, dei nucleotidi ciclici o dell'inositolo trifosfato. Questi meccanismi sono stati messi in evidenza non solo nelle cellule eucariotiche animali, ma anche in batteri²⁶ e nelle piante²⁷, in processi riguardanti tanto l'espressione genica quanto la trasduzione del segnale.

Regolazione redox dei fattori trascrizionali

I primi effetti dei ROS nella fisiologia cellulare sono stati messi in evidenza nello studio dei fattori trascrizionali. L'attivazione o l'inattivazione di tali proteine da parte dei ROS, può essere diretta, per l'ossidazione dei residui di Cisteine, o indiretta, come conseguenza dell'attivazione di cascate di trasduzione del segnale. L'effetto meglio studiato è l'attivazione di NF- κ B,²⁸ eterodimero di p50 e p65, che media numerosi effetti tra cui la risposta immune, la risposta allo stress, la crescita e la sopravvivenza cellulare. Sebbene *in vitro* p50 sia inattivata da agenti ossidanti,²⁹ il complesso risulta attivo trascrizionalmente in seguito al trattamento con ossidanti: questo effetto è dovuto in parte all'azione regolatoria di tioredossina e Ref-1 su p50 che impediscono la sua inattivazione, e in parte alla fosforilazione indotta dall'ossidazione della subunità inibitoria I κ B, che, una volta fosforilata, si dissocia da NF- κ B favorendo la sua traslocazione nucleare. Anche AP-1 (eterodimero di c-Jun e c-Fos) è regolato dallo stato redox della cellula: una cisteina nel dominio di legame al DNA può ossidarsi compromettendo l'attività trascrizionale del dimero: mutazioni in queste cisteine rendono insensibile AP-1 ai cambi redox, rendendolo, tra l'altro, costitutivamente attivo: è quanto succede in v-jun che presenta una serina al posto della cisteina, suggerendo che un punto di controllo del ciclo cellulare è proprio la regolazione redox dei fattori trascrizionali.³⁰ Facilmente inattivati da agenti ossidanti sono invece i fattori trascrizionali del tipo "Zinc-Finger" e "Zinc-Finger like", tra cui p53, poiché la cisteina che forma legami di coordinazione con lo Zinco può ossidarsi destabilizzando la struttura tridimensionale del dominio di legame al DNA. Una proteina che fattore trascrizionale non è, ma gioca un ruolo fondamentale nella trascrizione mediata dai ROS, è Ref-1 (Redox Factor-1).³¹ Interagendo con la tioredossina, Ref-1 è in grado di ridurre specifiche cisteine di NF- κ B, AP-1 e p53 regolando in tal modo la loro attività, in particolar modo in condizioni di ipossia.³²

Regolazione della trasduzione del segnale

L'esposizione ad agenti ossidanti risulta il più delle volte nella fosforilazione ed attivazione di proteine chinasi, fosfolipasi e vie di segnalazione mediate dal Ca^{++} , che trasducono il segnale sino ai fattori trascrizionali. Un esempio è dato dallo studio delle cascate di segnalazione di NGF (Nerve Growth Factor) e $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor alpha). Il legame dell'NGF al suo recettore ne determina l'autofosforilazione e l'attivazione di una cascata di segnalazione che coinvolge Shc, SOS, Ras, MEK e MAPK. L'effetto osservato è l'attivazione trascrizionale di AP-1, che abbiamo visto essere inattivato dagli ossidanti. Il trattamento con agenti riducenti come il NAC (N-Acetil-Cisteina, precursore del GSH) se da un lato può favorire il legame di AP-1 al DNA da un altro inibisce l'attivazione di questa cascata mitogenica.³³ Trattamenti ossidanti invece attivano cascate di trasduzione del segnale favorendo la fosforilazione e la conseguente attivazione di queste proteine. I primi effetti di agenti ossidanti diretti come H_2O_2 , vanadato o Raggi UV, sono evidenziati dalla fosforilazione di proteine tirosina chinasi, recettoriali e non, come l'EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor), il PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor Receptor), Src e proteine della medesima famiglia (Fyn, Lyn, Lck, ZAP 70). Non è chiaro tuttora se la fosforilazione di queste proteine sia un effetto diretto dell'ossidazione oppure sia connesso con l'inattivazione di numerose proteine Tirosin Fosfatasi. Queste ultime, infatti, presentano una cisteina nel sito attivo la cui ossidazione porta ad una rapida inattivazione, provocando così un probabile incremento nella fosforilazione in tirosina di numerose proteine cellulari.^{34 35} Inoltre resta da chiarire se diversi ossidanti possono evocare diverse risposte cellulari: un esempio è fornito dal diverso comportamento di raggi UV e H_2O_2 nell'attivazione di ZAP 70 nei linfociti T. CD45, una fosfatasi accessoria del TCR (T-cell receptor) è essenziale nell'attivazione di ZAP 70 solo nella stimolazione con H_2O_2 , mentre non è richiesta nella stimolazione da parte di raggi UV.³⁶ Effetti sullo stato della fosforilazione sono anche evidenti in proteine serina-treonina chinasi e fosfatasi. L'esempio migliore è rappresentato dalla famiglia delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase): ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) 1 e 2 (p42 e p44), p38 MAP Kinase, JNK (c-Jun N-terminal Kinase), BMK1 (Big MAP Kinase 1). Tutte queste proteine risultano fosforilate, e quindi attive, in seguito a stress ossidativo. L'attività di tali

chinasi è spesso associata a fenomeni di proliferazione cellulare: è infatti stato dimostrato come l'inibizione di tali cascate di trasduzione da parte di agenti antiossidanti e scavenger (spazzini) di ROS, come la SOD possano inibire la progressione nel ciclo.³⁷ Non è tuttora chiaro, però, se queste proteine siano fosforilate come diretta conseguenza dell'ossidazione o solo perché poste a valle di altre direttamente attivate dallo stress ossidativo. Inoltre proteine serina/treonina fosfatasi, come PP1, PP2A e calcineurina, sono inibite dall'ossidazione che destabilizza il centro Fe – Zn del loro sito attivo, e questo di conseguenza può comportare l'aumento della fosforilazione dei substrati di serina/treonina chinasi. Attualmente sono stati proposti due modelli sulla trasduzione del segnale mediata dai ROS, il primo prevede l'interazione fisica tra proteine sensibili allo stato redox e proteine coinvolte nella trasduzione, il secondo ipotizza la regolazione redox dello stato delle cisteine sulla superficie di proteine regolatorie della trasduzione. La regolazione mediata dall'interazione proteina/proteina è stata messa in luce studiando il comportamento di ASK1 (Apoptosis Signal Regulated Kinase 1), una MAPKKK: questa proteina è inibita dall'associazione con la tioredossina che in condizioni di ossidazione si dissocia da ASK1 rendendola attiva.³⁸ Meccanismi analoghi sono stati proposti per la famiglia delle periredossine.³⁹ Il secondo meccanismo coinvolge direttamente lo stato di ossidazione delle cisteine sulla superficie di proteine che regolano i segnali di trasduzione. Una blanda ossidazione può portare alla formazione di ioni sulfenici sui residui di cisteina di numerose proteine. Questa struttura è velocemente convertita in disolfuro per coniugazione con GSH. Tioredossina, glutaredossina e proteine omologhe chiudono il ciclo di reazioni ripristinando lo stato ridotto delle cisteine. Questo meccanismo è stato proposto nella regolazione dell'attività della fosfatasi PTP-1B.⁴⁰

I ROS come secondi messaggeri

Lo stato redox intracellulare è sicuramente coinvolto nella regolazione di svariate funzioni cellulari, ma in taluni casi i ROS svolgono il ruolo di veri e propri secondi messaggeri. La produzione di ROS può seguire un particolare stimolo extracellulare, oppure la loro rimozione tramite trattamento con antiossidanti può attenuare la risposta allo stesso stimolo. Il TGF β (Tumor

Growth Factor), ad esempio, induce la produzione di H_2O_2 per bloccare il ciclo cellulare in fibroblasti umani ⁴¹ Anche la via di trasduzione del β FGF (Basic Fibroblast Growth Factor) richiede produzione di ROS da parte della NADPH Ossidasi, tanto che il DPI (Diphenileneiodonium), inibitore selettivo di questo enzima, blocca la trascrizione di c-fos, effetto a valle osservato dopo stimolazione con TGF β in condrociti. ⁴² Proprio la NADPH Ossidasi sembra la principale fonte biologica di quei ROS coinvolti nella trasduzione del segnale. Si tratta di un complesso multiproteico che in seguito a stimoli diversi (Angiotensina II, TNF α , Trombina) si assembla al di sotto della membrana plasmatica producendo $O_2^{\cdot-}$. Sebbene la sua funzione sia chiara in cellule fagocitiche, dove funge da mediatore della risposta citotossica del sistema immunitario, le diverse subunità del complesso sono state individuate in numerosi altri tipi cellulari o ne sono stati individuati gli omologhi. Le subunità del complesso sono gp91 e gp22 presenti in membrana e p40, p47 e p67 citosoliche. La subunità regolatoria è invece rappresentata da Rac (Rac-1 ubiquitaria, Rac-2 fagocitica), una piccola proteina G la cui attivazione in seguito a stimoli extracellulari permette la produzione di ROS come secondi messaggeri: fibroblasti murini, infatti, se trasfettati con p21 Ras costitutivamente attivo (H-Ras V12) producono grosse quantità di anione superossido attivando le MAPK e il ciclo cellulare. L'inibizione dell'attività di Rac-1 mediante trasfezione di dominanti negativi o l'inibizione della produzione di ROS con SOD inibiva gli effetti di RAS. ⁴³ La stimolazione con fattori di crescita, inoltre, è spesso associata all'aumento di ROS intracellulari, la cui rimozione determina l'attenuazione della trasduzione del segnale su effettori a valle: è questo il caso dei recettori dell'EGF e del PDGF. ⁴⁴ ⁴⁵ Il legame del PDGF al suo recettore in cellule muscolari lisce, infatti, provoca un netto incremento di H_2O_2 intracellulare, rilevabile con metodi colorimetrici. ⁴⁴ L'aggiunta di catalasi non solo provoca la riduzione della quantità di H_2O_2 prodotta, ma riduce anche gli effetti a valle della stimolazione come la fosforilazione in tirosina di estratti totali, l'attivazione di MAPK e l'incorporazione di timidina triziata. Questi stessi effetti sono rilevabili anche trattando le cellule con NAC. E' stato dimostrato anche un incremento di anione superossido in seguito a stimolazione con PDGF. L'inibizione con antiossidanti è sufficiente a inibire la trascrizione di c-fos e la proliferazione cellulare. Questa produzione di anione superossido dipende

dall'attività NADPH ossidasica di cellule muscolari lisce, perché è inibita dal DPI.⁴⁶ Questo dato è ulteriormente confermato dal fatto che la cascata del PDGF-R attiva Ras e Rac, proteine G coinvolte, tra l'altro, nell'attivazione dell'NADPH ossidasi.⁴⁷ La fosforilazione stessa del recettore del PDGF può essere modificata in seguito a esposizione a ossidanti, in questo caso l'inattivazione di una specifica fosfatasi, LMW-PTP (Low Molecular Weight Protein Tyrosin Phosphatase), sembra essere tra le cause della fosforilazione del recettore. Più recentemente nel nostro laboratorio abbiamo ulteriormente caratterizzato i meccanismi con cui i ROS modulano la trasduzione del segnale mediata dal PDGF-R: abbiamo infatti dimostrato che uno stimolo ossidante in cellule RAT-2 (fibroblasti di ratto) attiva la produzione di NO che, come già detto, porta alla formazione di anione perossinitrito, specie radicalica che è in grado di nitrosilare le tirosine del PDGF-R, attivando una cascata di traduzione del segnale anche in assenza di fosforilazione del recettore stesso, meccanismo molecolare mai descritto in precedenza.⁴⁸ Nel complesso questi dati suggeriscono non solo che le cellule abbiano finemente modellato la propria fisiologia per far fronte agli squilibri redox, ma che esse sfruttino la loro produzione per utilizzarli come veri e propri secondi messaggeri.

Adattamento di linee cellulari allo stress ossidativo

Negli ultimi anni, le conoscenze dei meccanismi molecolari che regolano l'adattamento allo stress ossidativo, innanzitutto nei batteri, poi nei lieviti e negli organismi superiori, si sono rapidamente intensificate. In particolare è stato osservato che è possibile l'adattamento anche a stress ossidativi molto elevati, se prima viene applicato uno stimolo ossidativo blando. Ad esempio, batteri pre-esposti per un certo tempo a basse concentrazioni di H₂O₂ (10-60 μM) diventano transientemente resistenti ad alte concentrazioni dello stesso agente, che invece risultano normalmente letali.⁴⁹ Questa forma di resistenza osservata dipende dall'espressione di almeno 30 diversi geni che codificano per molti enzimi antiossidanti, enzimi di riparo del DNA ed altre proteine la cui funzione non è ancora nota. In alcuni tipi di batteri poi, sono stati descritti 2 regoloni per lo stress ossidativo: oxyR, che comprende 9 geni implicati nella resistenza all'H₂O₂ e soxRS, che include numerosi geni importanti per la resistenza all'anione superossido. Per quanto riguarda invece le cellule di

mammifero, in cellule HA-1 è stato osservato un aumento di circa 40 volte della resistenza all' H_2O_2 (350 μM) dopo pretrattamento con dosi basse dell'ossidante (150 μM), valutando la sopravvivenza rispetto alle cellule non pretrattate (76% verso 2%). La risposta adattativa in tali cellule è massimale 18 ore dopo il pretrattamento, dopo di che declina lentamente, dimostrando che si tratta di un fenomeno reversibile e non della selezione di una sottopopolazione preesistente. È stato dimostrato che il tempo che intercorre tra le due dosi di H_2O_2 serve per attivare la sintesi de novo di almeno 20 proteine: infatti il blocco della sintesi proteica con cicloesimide impedisce a queste cellule di adattarsi, indicando in maniera inequivocabile che è in corso un vero e proprio riassetto regolato dell'espressione genica in seguito allo stress ossidativo. È interessante notare che, come per i batteri, sono state individuate 3 distinte fasi dell'adattamento all' H_2O_2 : precoce, intermedia e tardiva. Tuttavia, mentre per i batteri resistenti all' H_2O_2 le proteine sintetizzate nella fase precoce sono essenzialmente enzimi antiossidanti (Superossido Dismutasi, Catalasi, Glutazione Perossidasi e Glutazione Transferasi), per le cellule HA-1 non si osserva né un aumento trascrizionale, né traduzionale di tali enzimi. Nelle prime 4 ore che seguono il pretrattamento, le HA-1 aumentano l'espressione di c-fos, c-jun, c-myc, gadd-45 e 153 (geni associati all'arresto della crescita), eme ossigenasi. Probabilmente i geni e le proteine responsabili della resistenza all' H_2O_2 in cellule di mammifero agiscono attraverso un meccanismo indiretto, vale a dire non di tipo antiossidante. È possibile che le cellule indirizzino il macchinario trascrizionale e traduzionale verso la sintesi di enzimi del riparo. Sono stati compiuti studi non solo sull'esposizione acuta al perossido di idrogeno, ma anche su trattamenti cronici, per comprendere le analogie e le differenze tra queste due risposte. Recentemente è stata isolata una variante resistente all' H_2O_2 della linea cellulare HA-1 (OC14) coltivando tali cellule per più di 200 giorni in concentrazioni crescenti di perossido di idrogeno (50-800 μM). Tale resistenza, persiste ancora altri 200 giorni dopo la rimozione dell'agente ossidante ed è determinata da un'augmentata attività di vari enzimi antiossidanti, tra cui Superossido Dismutasi, Catalasi, Glutazione Perossidasi e Glutazione Transferasi, nonché dall'incremento significativo del contenuto di GSH (di 2-3 volte maggiore). L'adattamento correla con alterazioni nella ploidia delle cellule esposte all' H_2O_2 , nel senso che la popolazione cellulare

tetraploide è più resistente della diploide. Questo fenomeno potrebbe dipendere dall'amplificazione sui cromosomi di alcuni geni "protettivi", come ad esempio la catalasi: è stato infatti osservato che la resistenza all' H_2O_2 è associata ad un aumento dell'attività della catalasi.⁵⁰ Un meccanismo di questo tipo sarebbe alla base dello sviluppo della resistenza ai trattamenti citotossici in una popolazione neoplastica; infatti la poliploidia e l'aneuploidia correlano con una maggiore aggressività del tumore ed una prognosi peggiore. Inoltre, le stesse cellule OC14 adattate all' H_2O_2 , hanno sviluppato una resistenza crociata alla tossicità indotta dall'iperossia. Infine l'uso del BSO, un inibitore della biosintesi di GSH, ha consentito di dimostrare l'importanza dei meccanismi di detossificazione dipendenti dal GSH nello sviluppo e nel mantenimento del fenotipo resistente a questi 2 tipi di stress ossidativo; tale composto è un inibitore della γ -glutamminil-cisteinil sintetasi primo enzima della biosintesi del GSH. Mentre l'inibizione della catalasi in cellule OC14 iperossiche non determina sensibilizzazione alla tossicità indotta dall' O_2 , viceversa tali cellule mostrano notevoli danni se esposte allo stesso stress ossidativo dopo una deplezione di GSH, confermando così che il glutatione riveste un'importanza maggiore nella resistenza all'iperossia.⁵¹

Adattamento allo stress ossidativo e chemioresistenza

Suscettibilità delle cellule ai chemioterapici.

La maggior parte degli agenti chemioterapici agisce provocando un danno (ossidativo e non) al DNA. In cellule non tumorali, ciò dovrebbe indurre l'attivazione di oncosoppressori, come p53, con conseguente blocco del ciclo cellulare e riparo e/o apoptosi. Purtroppo, in cellule neoplastiche molti di questi meccanismi di difesa sono mutati o inefficienti. Inoltre, in cellule tumorali trattate con chemioterapici, l'elevato numero di danni al DNA supera le capacità di riparo con conseguente accumulo di mutazioni. L'accumulo di queste, a livello del DNA mitocondriale, dove i sistemi di difesa e riparo sono meno efficienti, provoca un ulteriore malfunzionamento della catena respiratoria e pertanto aumento della produzione dei ROS.⁵² Le cellule tumorali, tenuto conto dell'aumentata produzione di ROS, dipendono maggiormente, rispetto alle cellule normali, sia dall'attività di oncosoppressori che dai meccanismi antiossidanti. In p53, ad esempio, sono numerosi i residui

di Cisteina sensibili allo stress ossidativo: alcune (Cys 173, 235, 239) sono fondamentali per il legame al DNA, altre (Cys 121, 132, 138, 272) lo influenzano solo in parte,⁵³ indicando che un ambiente ossidante limita l'attività di regolatore trascrizionale della proteina. Inoltre, è stato suggerito, che un ulteriore aumento dello stress ossidativo, dovuto all'esposizione delle cellule tumorali a chemioterapici che producono ROS, possa saturare le capacità antiossidanti della cellula e indurre apoptosi. Tra i farmaci il cui meccanismo di azione provoca aumento nella produzione dei ROS ci sono: il cis-platino,^{54 55 56} la bleomicina, le antracicline. Il successo della terapia antineoplastica risulta, però, legata al superamento di alcuni problemi uno dei quali è rappresentato dalla chemioresistenza sia essa intrinseca che acquisita. In particolare, i meccanismi molecolari responsabili della resistenza al cis-platino possono essere riassunti in: aumento dei livelli di glutatione e metallotionine, meccanismi che prevenono la formazione d'addotti DNA-cisplatino, diminuzione dell'accumulo del farmaco nella cellula, alterazione dei pathway apoptotici, aumento di proteine responsabili del riparo al DNA.⁵⁷ In diversi studi, ad esempio, è stato osservato che la overespressione di proteine con gruppi tiolici come GSH e metallotionine (MT) può causare resistenza al cis-platino.⁵⁸ Le metallotionine sono proteine ricche in Cisteine, di basso peso molecolare (6 KDa) con elevata affinità per i metalli pesanti (Cu, Zn). Sono coinvolte in diversi processi cellulari come detossificazione da metalli, proliferazione cellulare, apoptosi, protezione da radiazioni e chemioterapici³⁶.

Per la loro capacità di legare ioni metallici, sono in grado di controllare, attraverso il sequestro dello zinco, l'attività biologica di diversi enzimi e proteine come DNA e RNA polimerasi, fattori trascrizionali. Ad esempio p53 lega il DNA attraverso un dominio stabilizzato da ioni Zn, tale stabilizzazione è necessaria per ottenere la conformazione attiva del fattore wild-type ; una overespressione delle metallotionine promuove, dunque, la crescita cellulare. La loro sintesi è indotta dalla presenza, oltre che dai metalli pesanti, anche dagli interferoni e dallo stress. Le metallotionine legano il cis-platino, formano con esso un complesso dalla stechiometria di 10:1 (MT: platino) e ne impediscono il legame al DNA, prevenendo così la formazione di addotti DNA-cisplatino.⁵⁹ Anche il glutatione, che rientra nei meccanismi di detossificazione della cellula, si complessa con il cis-platino (2:1) e il

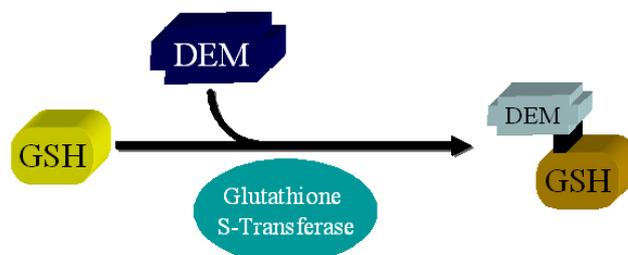
complesso formatosi viene attivamente pompato fuori dalla cellula ad opera di una trasportatore ATP dipendente, impedendo così l'accumulo del farmaco nella cellula. Inoltre il GSH potrebbe direttamente o indirettamente partecipare al riparo del DNA tenuto conto che la deplezione del GSH inibisce il processo di riparo. È interessante notare come il trattamento della linea tumorale KU7 con BSO (butionina sulfossimina) e DEM (dietilmaleato), provocando una deplezione di GSH, causi un aumento della suscettibilità al cis-platino.⁶⁰ L'azione citotossica delle bleomicine deriva dalla capacità di indurre danni ossidativi al deossiribosio dei nucleotidi causando la rottura del DNA a singolo e a doppio filamento. L'interazione del farmaco con Fe⁺⁺, porta alla formazione di un complesso che funziona come un'ossidasi ferrosa, trasferendo elettroni da Fe⁺⁺ a molecole di ossigeno e generando in tal modo specie reattive dell'ossigeno responsabili del danno ossidativo. Le antracicline (doxorubicina e daunorubicina) sono tra i più importanti farmaci antitumorali e agiscono intercalandosi con il DNA e compromettendo i processi di sintesi degli acidi nucleici. In virtù dei loro gruppi chinonici, tali chemioterapici, generano anche radicali liberi: reagiscono con la citocromo P450 riduttasi in presenza di NADPH, generano radicali intermedi semichinonici che, a loro volta, possono reagire con l'ossigeno e produrre radicali anionici superossidi. Questi possono generare sia perossido di idrogeno sia radicali ossidrilici che attaccano il DNA e ossidano le basi; quindi le difese enzimatiche come la superossido dismutasi e la catalasi sembrano svolgere un ruolo importante nella protezione delle cellule contro la tossicità delle antracicline.⁶¹

Da questi dati appare chiaro che la messa a punto di un modello cellulare adattato allo stress ossidativo possa rappresentare un strumento adatto alla comprensione di alcuni dei meccanismi molecolari responsabili della chemioresistenza, dall'identificazione di nuove proteine coinvolte nel fenomeno alla comprensione del loro ruolo nell'instaurarsi dei fenotipi resistenti allo stress o ai chemioterapici.

Il Dietilmaleato (DEM) genera condizioni pro-ossidanti in cellule vitali.

L'omeostasi del rapporto GSH/GSSG è fondamentale nella cellula per assicurare un ottimale equilibrio redox. Una molecola in grado di modificare questo rapporto a favore del GSSG può essere particolarmente utile per studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione redox delle

cellule. Numerose molecole permettono di raggiungere questo obiettivo, ciascuna delle quali attraverso uno specifico meccanismo d'azione: la BSO (Buthionine sulfoximine) inibendo la γ -glutamilmcisteina sintetasi, l' N-etilmaleimide alchilando i gruppi tiolici, la Diamide ossidandoli.⁶² Anche il dietilmaleato (DEM) altera questo equilibrio formando coniugati covalenti col GSH in una reazione catalizzata dalla Glutathione-S-Transferasi.⁶³



Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un metodo per indurre variazioni dell'ambiente redox in varie linee cellulari, basato sull'uso del DEM che, sottraendo GSH intracellulare, rende le cellule più sensibili allo stress ossidativo. Tale azione ossidante è diversa da quella svolta dall' H_2O_2 : infatti, mentre quest'ultima se aggiunta *in vitro* a proteine purificate si comporta da ossidante diretto, alterandone alcune funzioni biologiche, l'incubazione con DEM di estratti proteici cellulari non determina alcun effetto ossidante su tali molecole e ciò è in accordo con l'azione indiretta di deplezione di GSH svolta dal DEM.⁶⁴ Abbiamo inoltre dimostrato che una concentrazione pari a 1mM di DEM riduce i livelli di GSH del 70% circa già nei 30 minuti successivi al trattamento; fortunatamente, i test di vitalità cellulare hanno messo in evidenza come la stessa concentrazione sembra essere ben tollerata dalle cellule fino a trattamenti di 6 ore. Negli ultimi anni questo sistema sperimentale ci ha permesso di studiare numerosi effetti mediati dai ROS, tutti reversibili e prevenuti dal pretrattamento con N-Acetil-Cisteina, diretto precursore del GSH :

- Effetto dei ROS sui fattori trascrizionali: il legame al DNA di alcuni fattori trascrizionali, come p53 o il recettore dei Glucocorticoidi (GR),⁶⁵ risulta alterato dopo esposizione al DEM: questi due fattori trascrizionali sono entrambi del tipo "Zinc-Finger, inattivati dal DEM.
- Effetto dei ROS sulla regolazione dell'espressione genica: l'evidenza che l'attività di alcuni fattori trascrizionali sia inibita, non necessariamente risulta in una generale diminuzione dell'attività trascrizionale delle cellule. Si è notato che proprio l'RNA messaggero del gene codificante la proteina

p21^{waf1}, la cui trascrizione è prevalentemente sotto il controllo di p53, a sua volta inattivato dall'esposizione al DEM, risulta incrementato dopo trattamento con DEM anche in cellule deficienti di p53 (SAOS-2, T98G).⁶⁶

- Effetto dei ROS sull'attivazione della cascata di trasduzione Ras – MAPK: l'incremento di p21^{waf1} sembra a sua volta dipendente dall'attivazione delle MAPK, proteine note per la loro capacità di attivarsi in seguito a stress ossidativo, e del proto oncogene p21 ras probabilmente mediante un aumento della stabilità del messaggero di p21^{waf1}. Poiché p21^{waf1} è un potente inibitore delle CDK (chinasi dipendenti da ciclina), la sua attivazione p53 indipendente induce arresto del ciclo cellulare, evidenziando una fine regolazione dell'espressione genica in risposta ad agenti ossidanti. L'accumulo di mRNA di p21^{waf1} porta all'aumento della quantità di proteina nel giro di 3 ore dal trattamento.⁶⁷
- Attivazione di proteine serin treonin fosfatasi da parte dei ROS: sono stati messi in evidenza anche effetti precoci del DEM come la comparsa di una isoforma di p21^{waf1} a più veloce migrazione elettroforetica: questo effetto è probabilmente legato all'attivazione di una serin treonin fosfatasi già a 5 minuti dal trattamento⁶⁸. Analogamente la proteina pRb risulta defosforilata già nei 5 – 15 minuti successivi al trattamento, inibendo così l'attività dei fattori trascrizionali della famiglia di E2F⁶⁹. La mancanza di inibizione delle CDK che fosforilano pRb da parte del DEM suggerisce anche in questo caso l'attivazione di specifiche fosfatasi.

Obiettivo della tesi

Lo scopo della presente tesi è quello di studiare i meccanismi molecolari che sono responsabili dell'adattamento allo stress ossidativo, per identificare nuovi geni responsabili dello sviluppo del fenotipo adattato. A tale proposito abbiamo selezionato un sistema sperimentale di linee cellulari (Saos-2, osteosarcoma umano) adattate a crescere in condizioni di blando stress ossidativo indotto dal DEM. Una volta caratterizzato dal punto di vista fenotipico, il sistema delle cellule adattate è stato utilizzato per un'analisi differenziale di espressione genica rispetto alle stesse linee cellulari non adattate. Sono stati identificati diversi geni iperespressi nelle nostre condizioni sperimentali, alcuni dei quali non erano mai stati studiati per il ruolo svolto nel fenomeno dell'adattamento allo stress ossidativo. Tra questi abbiamo studiato AROS-29, prodotto proteico di una EST, e Trap-1, una heat shock protein mitocondriale appartenente alla famiglia delle hsp90, due proteine che svolgono un ruolo determinante nell'insorgenza dell'adattamento. Come già anticipato nell'introduzione, esistono strette correlazioni tra il fenomeno dell'adattamento allo stress ossidativo e la chemioresistenza. Lo studio dei meccanismi che inducono aumento dell'espressione di questi geni nelle cellule adattate rappresenta un requisito fondamentale per la comprensione dei meccanismi che culminano nella sopravvivenza delle cellule tumorali in seguito alla somministrazione di un farmaco citotossico. Per questo motivo abbiamo misurato i livelli di espressione genica dei due mRNA confermando la loro iperespressione anche in sistemi chemioresistenti. Questa osservazione getta le basi per lo studio di questi due geni sia come possibili marker di chemioresistenza con un proprio valore diagnostico/prognostico, che come veri e propri bersagli molecolari nella terapia delle neoplasie.

Materiali e Metodi

Culture cellulari

Cellule Saos-2 (osteosarcoma umano) e SHsy5y sono state cresciute in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Bio Whittaker) supplementato con FCS al 10% (Foetal Calf Serum) (ICN), con 100unità/ml di Ampicillina e 100µg/ml di Streptomicina (ICN), in un' atmosfera umidificata al 5% di CO₂ ed alla temperatura di 37°C.

I cloni stabili di AROS-29 e Trap-1 sono stati ottenuti mediante la trasfezione di cellule Saos-2 con un vettore d'espressione (pRC/CMV) contenente la sequenza di cDNA codificante TRAP-1 o AROS-29 a monte del gene per resistenza alla neomicina; dopo una selezione con neomicina alla concentrazione di 600µg/ml, i cloni cellulari hanno dimostrato un'espressione stabile di TRAP-1 verificata mediante western blot con anticorpo anti Trap-1.

Dosaggio del Glutazione

Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS, raccolte e centrifugate a 4000rpm per 10' a 4°C. Sono stati aggiunti ai pellet 100µl di acido perclorico 3% per 15' e le cellule così lisate sono state centrifugate a 20000rcf per 10' a 4°C. Dopo neutralizzazione del sovrantante con 900µl di una soluzione composta da NaH₂PO₄ 0.1M ed EDTA 5mM pH 7.5, l'aggiunta di Glutazione Redattasi (1u/ml) e del cofattore enzimatico NADPH (0.21 mM), i campioni sono stati incubati per 10' a 37°C. Il contenuto di glutazione ridotto (GSH) è stato misurato mediante l'aggiunta ai campioni di acido ditionitrobenzoico 600 µM e successiva interpolazione dei valori ottenuti allo spettrofotometro (a 412 nm) su una retta di taratura, costruita leggendo concentrazioni note di GSH. Il pellet ottenuto dalla lisi in perclorico è stato risospeso in NaOH 1M e le proteine così solubilizzate sono state quantizzate con il saggio di Bradford. Infine il contenuto di GSH è stato normalizzato per la quantità di proteine totali.⁷⁰

Preparazione di estratti proteici totali

Le cellule sono state lavate 2 volte in PBS(Phosphate Buffered Saline) freddo e lisate con 750 µl di buffer di lisi (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl,

0.1mM EDTA, 1 mM Sodio Ortovanadato, 50mM NaF (inibitori di fosfatasi), 0.5% NP-40, 1mM PMSF (Phenyl-methyl-sulphonilfluoride) e 10 µg/ml di Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina (inibitori di proteasi)). La lisi è stata condotta a 4°C, 30'. Il contenuto delle piastre è stato raccolto e centrifugato a 4000rpm, 10' a 4°C. Il sovrinatante, contenente l'estratto proteico, è stato sottoposto al saggio di Bradford (Biorad) per la determinazione spettrofotometrica della concentrazione proteica (a 595 nm). Le concentrazioni sono state ricavate interpolando i valori ottenuti su una retta di taratura, costruita leggendo concentrazioni note di BSA (Albumina Sierica Bovina).

Preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici

Le cellule sono state lavate 2 volte in PBS freddo, raccolte con 300 µl di buffer di lisi 1x (HEPES 10mM pH 7.9, EDTA 1mM, KCl 60mM, NP-40 0.2%, DTT 1mM, PMSF 1mM, Na Ortovanadato 1mM, Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina 10 µg/ml) e tenute 5' in ghiaccio. Le cellule così lisate sono state centrifugate a 2500rpm per 5' a 4°C. Il sovrinatante (contenente proteine citoplasmatiche e di membrana) è stato recuperato e poi centrifugato a 14000 rpm per 15' a 4°C, al fine di eliminare eventuali altri organelli contaminanti. Il pellet nucleare è stato lavato con 1ml di buffer di lisi senza NP-40, i nuclei sono stati risospesi in 300 µl della stessa soluzione e adagiati su un cuscino di saccarosio (150 µl di buffer 2x senza NP-40 con 150 µl di saccarosio al 60%). I campioni sono stati centrifugati a 6000 rpm per 10' ed il pellet di nuclei è stato risospeso in 50-100 µl di buffer di risospensione nucleare (Tris-HCl 250mM pH 7.8, NaCl 60mM, DTT 1mM, PMSF 1mM, Na Ortovanadato 1mM, Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina 10 µg/ml). I nuclei sono stati lisati mediante 3 cicli di congelamento/scongelo (ghiaccio secco+etanolo/37°C) e centrifugati a 9500rpm per 15' a 4°C.

Trasfezione transiente

Le cellule sono state state piastrate alla concentrazione di 3×10^6 cellule in piastra da 100 mm, in maniera tale da raggiungere una confluenza del 90-95% al momento della trasfezione; il giorno seguente, 1ora prima della trasfezione, il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo senza siero e senza antibiotico. Il DNA da trasfettare (24µg) e la lipofectamina 2000 (60µl) sono stati diluiti

in 1.5 ml di mezzo senza siero e senza antibiotico. Dopo 5' di incubazione le soluzioni contenenti il DNA e la lipofectamina sono state combinate e tenute in incubazione per ulteriori 30' a temperatura ambiente per permettere la formazione di liposomi DNA-lipofectamina. I complessi, così ottenuti, sono stati aggiunti alle cellule in coltura e dopo almeno 5-6 ore dal trattamento ad ogni piastra il mezzo senza siero e senza antibiotico è stato sostituito con il normale mezzo di coltura. Le cellule sono state raccolte 24-48 ore dopo la trasfezione.

Western Blot

Gli estratti proteici (25 – 50 µg), dopo denaturazione al calore (5', 100°C), sono stati separati mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilammide. Le proteine sono state trasferite elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (PVDV Immobilon-P, Millipore) (1h a 4°C, 100V) ed i filtri incubati con una soluzione al 5% di latte in PBS contenente 0.1% Tween per 45' a temperatura ambiente. Successivamente, i filtri sono stati incubati nella stessa soluzione contenente l'opportuna diluizione (1:100 – 1:1000) di anticorpo primario. I filtri sono stati lavati tre volte per 5' con una soluzione di TBS-Tween 0.1%(NaCl 150mM, Tris 10mM pH8) ed incubati con l'anticorpo secondario (proteina A per gli anticorpi primari policlonali, anti-Mouse per i monoclonali) coniugato a perossidasi di rafano diluito 1:3000 per 45' a temperatura ambiente. Si ripetono tre lavaggi come dopo l'incubazione con l'anticorpo primario. Le proteine sono state infine rivelate utilizzando un sistema di chemiluminescenza, ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham).

Estrazione di RNA totale

Le cellule sono state lavate in PBS freddo, raccolte in 1ml di reagente TRIzol e trasferite in tubi eppendorf e incubate 5' a temperatura ambiente. Ad ogni tubo sono stati aggiunti 200µl di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1). I campioni sono stati incubati per ulteriori 2-3' a temperatura ambiente e poi centrifugati a 12000rcf per 15' a 4°C.

Successivamente, è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA cui sono stati aggiunti 0.5 volumi di isopropanolo 100% ed incubati a temperatura

ambiente per 10'. I campioni sono stati centrifugati a 12000rcf per 10' a 4°C, il pellet di RNA è stato lavato con 1ml di etanolo al 75%, ricentrifugato (a 7500 rcf per 5' a 4°C) ed infine risospeso in un adeguato volume di acqua sterile. L'RNA è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e analizzato su gel denaturante di agarosio/formaldeide, per valutarne la qualità.

Retrotrascrizione

La reazione della trascrittasi inversa è stata effettuata su 2µg di RNA totale per ciascun campione utilizzando un oligo dT (1µM) come innesco. La soluzione contenente RNA e oligo dT è stata denaturata a 70°C per 3' e poi raffreddata in ghiaccio per 2', allo scopo di evitare la rinaturazione. Sono stati aggiunti ai campioni 5 µl di Master Mix (per ciascun campione: 2µl di First-strand buffer 5X, 2µl di dNTP mix 5mM, 1µl di trascrittasi inversa 200u/µl) e incubati per 1 ora a 42°C. L'enzima è stato inattivato a 75°C per 10' e infine il cDNA è stato conservato a -20°C.

Differential display

Il protocollo del Differential Display consente di identificare molecole di RNA che sono espresse in maniera differenziale in due o più popolazioni cellulari.⁷¹ Il kit del Differential Display (Clontech) fornisce 10 oligo P (upstream primers) e 9 T(downstream primes): i P primers possono essere utilizzati sia in combinazione ai T primers che da soli per la loro capacità di legarsi potenzialmente a tutta la sequenza di un cDNA. I T primers, sono oligo di poli dT che appaiano sul sito di poliadenilazione di un cDNA. Un cDNA è sottoposto ad una Long Distance(LD) PCR, in cui l'utilizzo di una miscela di polimerasi (Taq e Pwo) favorisce l'amplificazione di grandi segmenti di DNA. Tale PCR prevede 3 cicli iniziali a bassa stringenza (basse temperature di appaiamento dell'oligo), per consentire ad ogni primer P di legarsi in maniera imperfetta e incompleta a più molecole di cDNA possibile. I prodotti di questi primi cicli sono quindi amplificati specificatamente nella successiva fase della PCR ad alta stringenza. Sono stati utilizzati i seguenti oligo:

P2 5'ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG 3'

P3 5'ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG 3'

P5 5'ATTAACCCTCACTAAAGATCACGACTG 3'
P8 5'ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG 3'
P10 5'ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC 3'
T1 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA3'
T2 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC 3'
T3 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAG 3'
T4 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA 3'
T5 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCC 3'
T6 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG 3'
T7 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA 3'
T8 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG 3'
T9 5'CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGG 3'

Nelle seguenti combinazioni. P2 +P(1→10); P3 + T(1→9); P5 + T(1→9); P8 + T(1→9); P10 +T(1→9).

Per ciascuna coppia di oligo sono stati effettuato i dovuti controlli:

a) Controllo positivo: PCR con cDNA di controllo (fornito dal kit), ottenuto da fegato umano adulto e fetale, adoperando la coppia di primers P10/T8.

b) Controlli negativi

Controllo dell' H₂O₂ : Per ogni coppia di primers si usa 1μl di H₂O₂ sterile come template, per sottrarre eventuali bande aspecifiche presenti in tutte le reazioni di PCR allestite utilizzando quei primers e per valutare la qualità della sintesi del cDNA.

Controllo dell'RNA totale: Utilizzando 1μl di una diluizione 1:100 dell'RNA servito da template per la sintesi del cDNA si valuta la purezza dell' RNA. Infatti, in caso di contaminazione da DNA genomico, si osserva un numero significativo di bande nel controllo dell'RNA.

c) Differential Display PCR con due diverse diluizioni dei campioni di cDNA da studiare.

Per ogni esperimento sono stati combinati i seguenti reagenti:

- 1μl cDNA del campione
- 1μl di primer P
- 1μl di primer T

tale protocollo è stato applicato ai tre cDNA ottenuti da cellule Saos-2 normali e da cellule trattate con 50 e 75μM DEM. Per i controlli, è stato utilizzato di

volta in volta: 1µl di H₂O sterile, 1µl di RNA totale diluito 1:100 e 1µl di cDNA di controllo.

La reazione di amplificazione, è stata effettuata con Perkin-Elmer GeneAmp:

- a) 1 ciclo: 94°C 5 min 40°C 5 min 68°C 5 min
- b) 2 cicli: 94°C 30 sec 40°C 30sec 68°C 5 min
- c) 23 cicli: 94°C 20sec 60°C 30 sec 68°C 2 min
- d) 1 ciclo: 68°C per altri 7 min

Le reazioni sono state conservate a -20°C fino al momento della corsa elettroforetica. La lastra piccola, cui aderisce il gel, è stata trattata per 5' con una soluzione di Binding Silane (3µl), acido acetico glaciale(5µl) ed etanolo al 95% (fino a 1ml). E' stata quindi lavata 3 volte con etanolo al 95% per evitare contaminazioni con Binding Silane sulla lastra lunga. Quest'ultima, invece, è stata trattata per 5 minuti con Repel Silane, in modo da potersi staccare agevolmente dal gel una volta terminata la corsa. Il gel (50 ml) è composto da: 10 ml acrilamide/bis-acrilamide 29:1; 5 ml di TBE 10X, 21g urea, 450 µl APS 10%, 45µl TEMED, H₂O sterile. Dopo una precorsa di 20 minuti a 33 mA, i campioni (5µl della miscela di PCR in 5µl di loading buffer) sono stati denaturati a 95°C per 2 minuti e caricati su gel. Il gel è stato corso in camera fredda a 1850v per 4 ore e, al termine della migrazione, è stato sottoposto a colorazione con nitrato d'argento.

Colorazione con nitrato d'argento

Il gel è stato immerso per 8 minuti in agitazione nella soluzione di fissaggio (10% acido acetico glaciale), lavato 3 volte in H₂O distillata e quindi trasferito nella soluzione di colorazione (1g nitrato d'argento, 1.5 ml formaldeide al 37%, H₂O distillato fino ad 1 litro) per 30 minuti in agitazione. Successivamente, il gel è stato lavato in H₂O per pochi secondi e rapidamente immerso nella soluzione di sviluppo (30 g Sodio Carbonato Anidro, 1.5 ml di formaldeide al 37%, 200 µl Sodio Trisolfato 10mg/ml, a 1 litro con H₂O distillata), fino alla risoluzione delle bande. La reazione di sviluppo è stata bloccata mediante l'aggiunta della soluzione di fissaggio, sono stati effettuati altri 2 lavaggi ed il gel è stato seccato a temperatura ambiente. Le bande differenzialmente espresse sono state tagliate con un bisturi dal gel, eluite in H₂O incubando i tubi di reazione per 15 minuti a 95°C e in seguito

riamplificate con gli stessi primers utilizzati per il differential display. Gli ampliconi sono stati clonati in pGEM T-easy e sequenziati. L'analisi mediante nucleotide Blast ci ha permesso di identificare le bande differenzialmente espresse.

Real-time PCR

La reazione di PCR è stata effettuata utilizzando un'aliquota del prodotto della reazione della trascrittasi inversa. Le condizioni della reazione prevedono:

- 3 minuti a 95°C (attivazione della Taq Polimerasi)
- 40 cicli di appaiamento degli oligo e di amplificazione a:
 - 95°C per 15 secondi
 - 60°C per 1 minuto

Ai cicli di amplificazione seguiva la determinazione della curva di denaturazione (melting) in cui la temperatura nell'intervallo 55°C- 95°C aumenta di 0,5°C ogni 10 secondi.

Il fluorocromo utilizzato per la quantizzazione è il Sybr Green, un colorante che si lega specificamente al DNA a doppio filamento ed emette fluorescenza verde, proporzionale alla quantità di DNA bersaglio amplificata. L'apparecchio è in grado di definire per ogni gene il "ciclo soglia" o Ct (Cycle Threshold), cioè il numero di cicli al quale la fluorescenza di un dato campione raggiunge il valore superiore a 10 volte la deviazione standard dell'intensità di segnale media dei primi cicli. Questo valore di Ct è inversamente proporzionale al n° di copie presenti nel campione iniziale. Esso è stato usato per effettuare l'analisi quantitativa dell'espressione genica utilizzando come controllo la misura del Ct della glucuronidasi, che codifica per un trascritto altamente stabile nelle nostre cellule. Infine la curva di melting premette di determinare la presenza di eventuali ampliconi contaminanti, dal momento che la funzione $f_x = dF/dT$ è unica per ciascun amplicone e si presenta come un grafico a singolo picco.

La reazione di PCR è condotta in multiwell da 96 pozzetti ciascuno contenente 25 µl di reazione:

- 5 µl di cDNA
- 0.38 µl di una mix (40 µM) dei primer forward e reverse
- 12.5 µl di 2x Biorad iQ Syber Green Supermix
- 7,15 µl di acqua.

Gli oligonucleotidi per i geni analizzati sono i seguenti:

Trap-1 forward: 5'-GGACGACCGCTCAACAT-3'

Trap-2 reverse: 5'-CACATCAAACATGGACGGTTTC-3'

glucuronidasi forward: 5'-GGTTTCACCAGGATCCACCTCT-3'

glucuronidasi reverse: 5'-CCAACCACGTATTTTCTGCGTT-3'

Syntaxin 3A forward: 5'-CCAACAACGTCCGGAACAA-3'

Syntaxin 3A reverse: 5'-AGGTCTGCCGATGACCTGAC-3'

AROS-29 forward: 5'-CCTGGTCCTGCGCTTCTTC-3'

AROS-29 reverse: 5'-ACGCCGCCCGAGTACA-3'

p21waf1 forward: 5'-CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA-3'

p21waf1 reverse: 5'-CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA-3'.

Saggio citofluorimetrico dell'annessina

Per evidenziare l'apoptosi con il metodo dell'annessina V-FITC/PI, le cellule sono state poi lavate 2 volte con PBS freddo 1x e quindi risospese in una soluzione di binding buffer 1x (10mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/ml. 100 µl di questa soluzione sono stati poi trasferiti in un tubo da citofluorimetro a cui sono stati successivamente aggiunti 5 µl di annessina V coniugata con FITC e 5 µl di ioduro di propidio. La soluzione è stata incubata per 15' a temperatura ambiente e al buio. Quindi sono stati aggiunti 400 µl di binding buffer 1x ed è stata effettuata l'analisi al citofluorimetro.

Le cellule sono state analizzate con un citofluorimetro Becton Dickinson FACSVantage fornito di un laser INNOVA Enterprise II con trasmettitore a 488nm regolato a 220mV. La fluorescenza era raccolta da filtri 610SP, 560SP, e 530/30BP. La fluorescenza del propidio era deviata da un filtro 610SP e raccolta da un filtro 660/20BP. I segnali di fluorescenza sono stati amplificati logaritmicamente. Sono stati analizzati 10⁴ 000 eventi per campione.

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

Le cellule sono state raccolte in PBS - EDTA 2mM, lavate una volta con PBS e lisate con una soluzione ipotonica colorante il DNA (0.1% Triton X-100, 0.1% sodio citrato, 1mg/ml RNAsi A e 50µg/ml di ioduro di propidio) per 2 ore a temperatura ambiente al buio.

L'analisi del DNA in citometria a flusso è stata eseguita utilizzando l'apparecchio FACSVantage (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) che monta un laser a ioni di argon raffreddato ad acqua (488nm, 150mw), software Cell Quest (Becton Dickinson) ed associato ad un modulo di discriminazione dei doppietti. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma di analisi del ciclo cellulare Mod-Fit (Verity, Software House, Inc.).

Comet assay

Le cellule sono state trattate con H₂O₂ 1 mM per 30' o con DEM 1 mM per 30', quindi sono state lavate in PBS, tripsinizzate, contate e risospese nuovamente in PBS. 1x10⁵ cellule sono state combinate con LM (low melting) agarosio in un rapporto di 1:10 (cellule/agarosio) e stratificate su un vetrino portaoggetti. I vetrini sono stati tenuti al buio per 20-30' a 4°C e poi immersi per 60' a 4°C nel buffer di lisi (2.5M NaCl, 100mM EDTA pH 10, 10mM Tris, 1% Sodio Lauryl Sarcosinato e 1% Tryton X-100). Il DNA è stato denaturato immergendo i vetrini in una soluzione a pH >13 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) per 30-60' a temperatura ambiente al buio ed è stato sottoposto a migrazione elettroforetica (~12 V per 30') nella stessa soluzione. I vetrini sono stati fissati 5' a temperatura ambiente in etanolo 70%. In seguito alla migrazione elettroforetica il DNA tagliato migrerà fuori dal nucleo con una velocità direttamente proporzionale all'entità del danno. L'aggiunta ai vetrini di SYBR Green, colorante fluorescente che si intercala nel DNA, permetterà di visualizzare una "cometa" di DNA al microscopio a fluorescenza a 521 nm. Il rapporto tra le aree della coda e della testa della cometa fornisce una stima quantitativa del danno indotto al DNA.

Clonaggio del cDNA di TRAP-1 nel vettore d'espressione eucariotico pRC/CMV

Amplificazione della sequenza codificante la proteina TRAP-1

Il cDNA dell'intera sequenza codificante la proteina TRAP-1 è stato ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA estratto dalle cellule Saos-2 secondo il protocollo descritto ed amplificato utilizzando due oligonucleotidi specifici

contenenti anche i siti di restrizione per il successivo clonaggio. Gli oligonucleotidi utilizzati per amplificare il frammento sono:

Trap-1 forward: 5'-ATTAGCGGCCGCGCAGCCAACATGGCGCGGAGCTGCGGG-3'

Trap-1 reverse: 5'-ATTATCTAGATTATCAGTGTGCTCCAGGGCCTTGACAAG-3'

La reazione è stata allestita nel seguente modo:

cDNA TRAP-1	100ng
oligo fw 50 μ M	1 μ l
oligo rev 50 μ M	1 μ l
buffer 10x	5 μ l
dNTP 10mM each	2 μ l
Taq Polimerasi 5u/ μ l	1 μ l
H ₂ O	fino a 50 μ l

La reazione di PCR è stata eseguita in un apparecchio fornito dall'Applied Biosystem secondo il seguente protocollo di amplificazione:

1. denaturazione: 94°C per 30''
2. annealing: 54°C per 30''
3. amplificazione: 72°C per 2'30''

I cicli sono stati ripetuti per 40 volte, preceduti da una denaturazione iniziale di 30'' a 94°C e seguiti da un'estensione finale di 7' a 72°C.

Eluizione delle bande dal gel di agarosio

I frammenti amplificati, corrispondenti alla sequenza codificante per la proteina TRAP-1, sono stati controllati su gel di agarosio e purificati utilizzando il "PureLink Quick Gel Extraction Kit" (Invitrogen), che sfrutta le proprietà di legame al DNA della membrana di silica posta nella colonnina. Il frammento di DNA è stato tagliato dal gel, dissolto con un'incubazione di 20' a 50°C in una opportuna soluzione. Il DNA, caricato su una colonnina, si è legato alla membrana ed è stato lavato 2 volte in una soluzione contenente etanolo, per eliminare l'eccesso di sali. E' stato infine eluito in 50 μ l di acqua sterile e quantizzato leggendo l'assorbanza a 260 nm allo spettrofotometro.

Digestione preparativa

Il frammento purificato ed il plasmide pRC/CMV sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione NotI e XbaI in maniera tale da creare delle estremità complementari. La reazione di digestione è avvenuta in 100 μ l finali:

ampicillina (resistenza del vettore). Le colonie formatesi dopo una notte di incubazione a 37°C sono state prelevate, cresciute in 5 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) per consentire la crescita batterica ed incubate ulteriormente a 37°C per 18 ore in agitazione costante.

“Minipreparazione” di DNA plasmidico

Dalle colture batteriche è stato purificato il DNA plasmidico utilizzando il kit Invitrogen. I 5 ml di ciascuna coltura batterica sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti; eliminato il sovrnatante, il pellet batterico è stato risospeso in 250µl di buffer di risospensione contenente RNasi A. Sono stati aggiunti 250µl di buffer di lisi e, dopo 5 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 350µl di buffer di precipitazione. Dopo una centrifugazione di 10 minuti a 12000rcf, il sovrnatante è stato trasferito su colonnina di silica, che lega per affinità il DNA estratto. Dopo una centrifugata di 1 minuto, la colonnina è stata lavata con 700 µl con una soluzione contenente etanolo e centrifugata ulteriormente; quindi il DNA è stato eluito dalla colonnina con 50 µl di H₂O sterile. Il DNA plasmidico così ottenuto è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm ed analizzato su gel di agarosio all'1% per valutarne la qualità. Il DNA plasmidico è stato poi digerito con gli stessi enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio al fine di controllare la presenza dell'inserto. Il polilinker del vettore pRC/CMV presenta un sito di taglio per l'enzima di restrizione NotI ed un sito per l'enzima XbaI, sfruttati per clonare l'inserto Trap-1; è stato possibile verificare su gel di agarosio se i frammenti rilasciati presentavano la grandezza attesa. La digestione è stata effettuata nel seguente modo:

- DNA 10 µl
- Buffer 10X 5 µl
- Not I (10 u/µl) 1 µl
- Xba I (10 u/µl) 1 µl
- H₂O 33µl

I campioni sono stati incubati per 2 ore a 37°C.

Infine, 1 µg di ciascuna miniprep (0,2 µg/µl) è stato sequenziato ed i campioni contenenti l'esatta sequenza di Trap-1 sono stati ritrasformati per ottenere una maggiore quantità di DNA plasmidico mediante Maxi Prep.

Mutanti di delezione di TRAP-1

I mutanti di delezione del gene TRAP-1 sono stati amplificati e clonati nel vettore pRC/CMV con modalità simili a quelle appena descritte per il suo cDNA, utilizzando gli stessi enzimi di restrizione ma oligonucleotidi specifici disegnati allo scopo di amplificare di volta in volta solo alcune porzioni di cDNA e che introducevano, inoltre, l'epitopo immunogenico HA della emoagglutinina virale all'estremità carbossi terminale della proteina, per permetterne il riconoscimento nel Western blot con un anticorpo anti-HA.

Sono stati "generati" sei mutanti di delezione della proteina TRAP-1 secondo il seguente schema:

- Mutante 1 (WT+HA): intero cDNA + l'epitopo HA.
- Mutante 2 (Δ N): delecto all'estremità N-terminale del segnale di localizzazione mitocondriale (aa 112-704 + HA).
- Mutante 3: delecto del dominio ATPasico, (amminoacidi 112-221). Presenta l'epitopo HA.
- Mutante 4: privo del segnale di localizzazione mitocondriale, e del dominio ATPasico (aa 222-704 +HA).
- Mutante 5: delecto del dominio hsp90 (aa 1-290 +HA).
- Mutante 6: delecto del segnale di localizzazione mitocondriale e del dominio hsp90 (aa 112-290 +HA).

Gli oligo utilizzati per il clonaggio dei mutanti sono di seguito elencati:

trapHA 1 fw: 5'-attaGCGGCCGCGCAGCCAACATGGCGCGGAGCTGCG GG -3'

trapHA 704 rev: 5'-attaTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACATCATATGGGT ATCAGTGTCGCTCCAGGGCCTTGA -3'

Δ mito-HA 101 fw: 5'-attaGCGGCCGCGCAGCCAACATGGTTGCCCGGTCCCTG TACT -3'

Δ atpase-HA 112 rev: 5'-attaCCGCGGAAACACCTCTTTTCTGAGT -3'

Δ atpase-HA 221fw: 5'-attaCCGCGGTCGGCAGCCCCGGGGAGCCT -3'

Δ mito atpase-HA 221fw: 5'-attaGCGGCCGCGCAGCCAACATGTCCGCGAGCCCCGGGGAGCC -3'

Δ hsp90-HA 291 rev: 5'-attaTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACATCATATGGGTACCGCCTCCATTCAAGTACA -3'

Tali oligo sono stati utilizzati nelle seguenti combinazioni:

1. per il mutante WT-HA: trapHA 1 fw + trapHA 704 rev
2. per il mutante Δ mito-HA: delta mito-HA 101 fw + trapHA 704 rev
3. per il mutante Δ atpase-HA: (trapHA 1 fw + Δ atpase-HA 112 rev) clonato in pRC/CMV in cui si subclonerà il prodotto della PCR ottenuta da: Δ atpase-HA 221 fw + trapHA 704 rev

4. per il mutante Δ mito atpase-HA: Δ mito atpase-HA 221 fw + trapHA 704 rev
5. per il mutante Δ hsp90-HA: trapHA 1 fw + Δ hsp90-HA 291 rev
6. per il mutante Δ mito hsp90-HA: Δ mito-HA 101 fw + Δ hsp90-HA 291 rev

Clonaggio cDNA e promotore di AROS-29

Il clonaggio del cDNA di AROS-29 nel vettore di espressione pRC/CMV è stato effettuato come i clonaggi precedentemente descritti.

La sequenza codificante AROS-29 è stata amplificata utilizzando i seguenti oligonucleotidi contenenti i siti Hind III e Not I per il clonaggio orientato nel vettore e con il primer reverse che ha in frame con AROS-29 la sequenza dell'epitopo HA.

AROS-29 fw ATTAAGCTTGCAGCCAACATGGCGGTCTCGGAGTACA

AROS-29rev

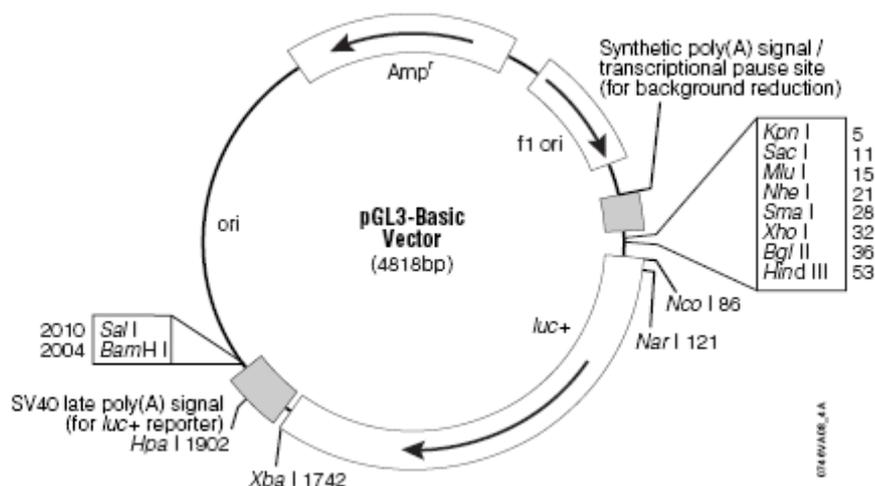
ATTAGCGGCCGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCATATGGGTAGGAGCCTGCCAAGTGCT

2000 bp del promotore di AROS-29 sono state amplificate da DNA genomico utilizzando gli oligo:

Promotore AROS-29 fw ATTAGAGCTCTGGACTCAAGTCTTCAACACTTCC

Promotore AROS-29 rev ATTAAGCTTGACGCGTGCGAGAACG

Contenenti i siti di restrizione Sac I e Hind III per il clonaggio orientato in pGL3 basic, vettore contenete il sito multiplo di clonaggio a monte del gene per la luciferasi di *firefly* (luciferasi), utilizzato come reporter per il saggio di luciferasi.



Saggio di luciferasi

L'espressione del gene reporter luciferasi a valle di un promotore o di altri elementi regolatori della trascrizione o della traduzione è proporzionale al

numero di molecole tradotte a partire dal costrutto (clonato in pGL3) recante tali elementi regolatori.

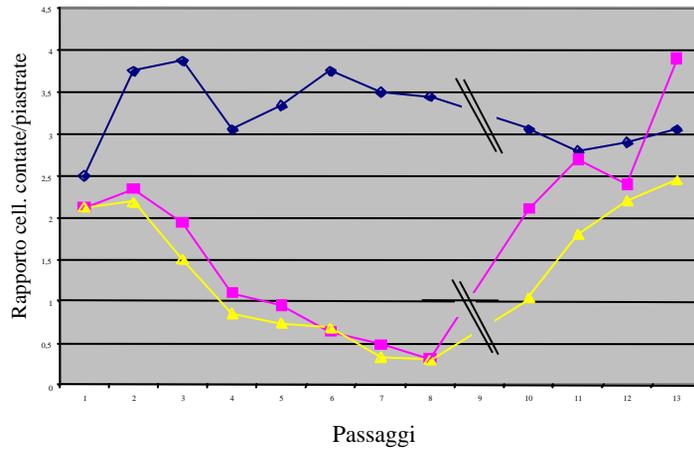
Il sistema utilizzato è quello del “Dual Luc” , in cui l’attività della luciferasi Firefly (il nostro gene “reporter”) è normalizzata rispetto all’attività di un altro gene “reporter” di controllo che è la luciferasi Renilla. Il doppio sistema permette di differenziare facilmente una risposta cellulare specifica da una aspecifica. Firefly e Renilla sono due enzimi distinti per struttura e substrati (luciferina di scarafaggio nel primo e celenterazina nel secondo).

Il saggio prevede due fasi: una prima in cui viene aggiunto il “Dual-Glo Luciferase Reagent” direttamente al mezzo di coltura delle cellule; il reagente induce lisi cellulare, e costituisce il substrato per la luciferasi Firefly , producendo un segnale di luminescenza che può essere letto al luminometro. Una volta completata la lettura, si passa alla seconda fase in cui si aggiunge il “ Dual-Glo Stop & Glo Reagent” che riduce il segnale luminescente di Firefly di almeno 10000 volte, e contemporaneamente fornisce il substrato per la luciferasi Renilla.

Risultati

Selezione di cellule adattate allo stress ossidativo.

Allo scopo di adattare le cellule ad un blando stress ossidativo, abbiamo coltivato diverse linee cellulari in presenza di basse concentrazioni di DEM (50-75 μ M) per alcuni mesi. Concentrazioni più elevate risultavano, infatti, citotossiche per tutte le linee cellulari prese in esame. Per i nostri studi abbiamo selezionato le cellule Saos-2 di osteosarcoma umano, le uniche in grado di sopravvivere per più di un mese al trattamento ossidante. Come mostrato in **figura 4**, dopo un iniziale periodo di morte cellulare, queste cellule hanno cominciato ad assumere parametri di crescita (numero di cellule e tempo di duplicazione) del tutto simili alla controparte non trattata, generando, quindi, una linea cellulare adattata al DEM. Dal momento che, come detto, il DEM induce deplezione di GSH,⁷² abbiamo ipotizzato che modifiche delle condizioni redox potessero essere responsabili della sopravvivenza di queste cellule al DEM. Le cellule adattate a 50 e 75 μ M DEM mostravano livelli di GSH significativamente maggiori rispetto alle cellule non adattate, suggerendo che l'adattamento di queste cellule alla condizione di cronica ossidazione potesse essere correlata ai livelli di GSH. Allo scopo di caratterizzare il meccanismo molecolare che ha determinato l'aumento del GSH nelle nostre cellule, abbiamo condotto esperimenti di Real Time PCR sui geni che controllano la sintesi e la degradazione del GSH; abbiamo determinato così che l'espressione di questi geni non varia tra le cellule adattate e non, fatta eccezione per il gene codificante la subunità catalitica della γ -glutammina-cisteina sintetasi, primo enzima della via biosintetica del GSH, aumentato di 2.5 volte rispetto alle cellule non adattate. Poiché un trattamento ossidante con DEM 1mM per 30' causa la deplezione del 70% del GSH in diverse linee cellulari,⁷³ abbiamo trattato le cellule adattate con la stessa alta concentrazione di DEM, dimostrando che la percentuale di deplezione era significativamente più bassa nelle cellule adattate (<20%) (**figura 5 alto**). Abbiamo, quindi, dimostrato che il fenomeno era reversibile: infatti, rimuovendo il DEM dal mezzo di coltura (**figura 5 basso**), abbiamo osservato livelli di GSH paragonabili a quelli del controllo già dopo 3 giorni dalla rimozione del DEM, dimostrando che l'adattamento era un fenomeno transiente e reversibile. E' ragionevole concludere, dai



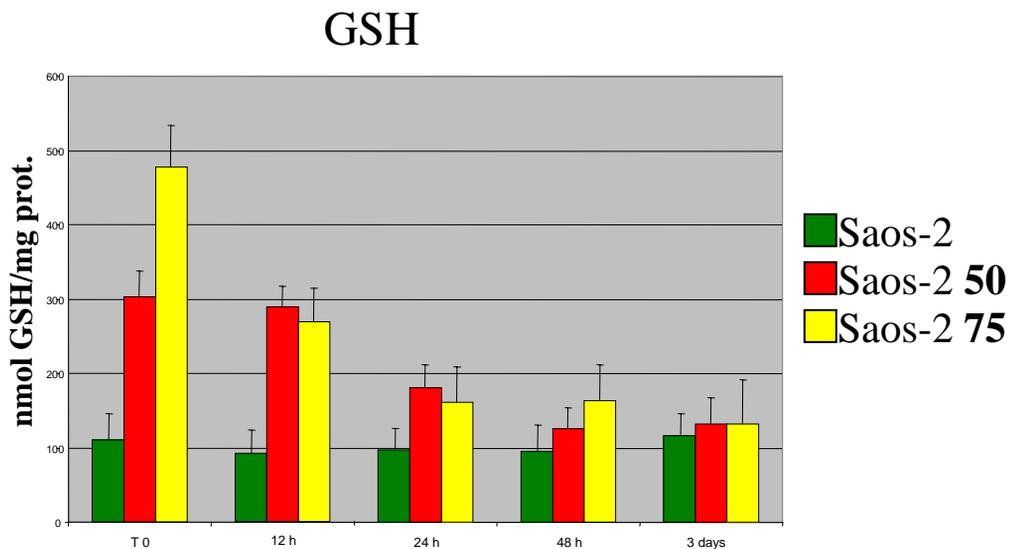
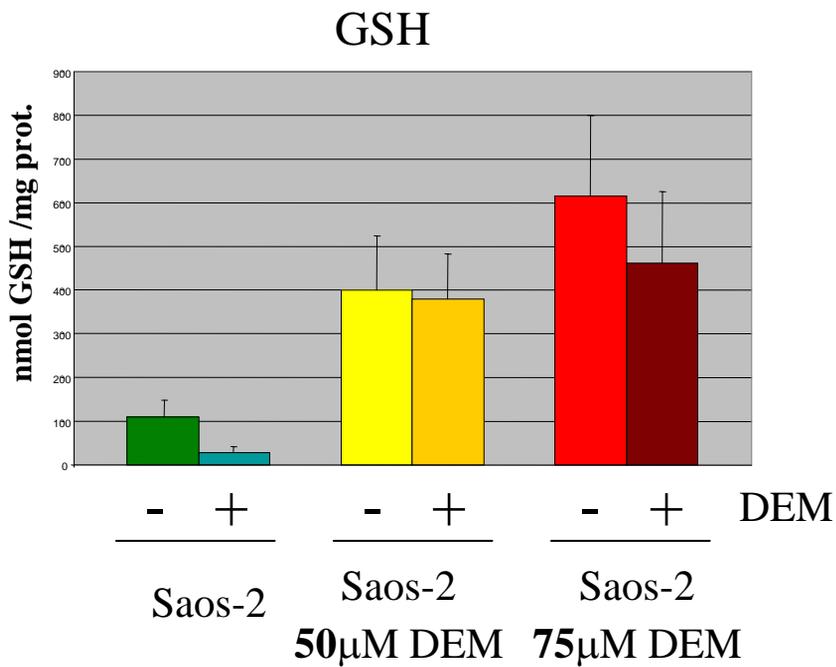
◆ Saos-2

▲ Saos-2 50 μ M DEM

■ Saos-2 75 μ M DEM

Selezione di popolazioni di Saos-2 adattate al DEM.

Cellule di osteosarcoma umano sono state mantenute in coltura per diversi mesi in presenza di DEM 50 e 75 μ M, quotidianamente sostituito. Le cellule erano contate prima di ogni passaggio e piastrate a 300000cell/piastra. L'intervallo tra due punti è stato espresso come rapporto tra cellule piastrate e quelle contate al momento passaggio cellulare.



Pannello superiore: Livelli di GSH nelle cellule adattate e non: livelli basali e in seguito a deplezione con DEM 1mM per 30'.

Pannello inferiore: Livelli di GSH in seguito alla rimozione del DEM dal mezzo di coltura.

risultati esposti, che l'adattamento non solo era il risultato di un ambiente intracellulare più riducente, ma che anche potesse portare ad una maggiore resistenza rispetto ad un successivo più forte stress ossidativo: abbiamo analizzato il danno al DNA in seguito al trattamento con H₂O₂ mediante il Comet assay, saggio che permette di quantizzare i danni al DNA: come mostrato in **figura 6 (alto)** le Saos-2 adattate sono più resistenti al danno da H₂O₂ (0.5mM 30'), come dimostrato dal più basso rapporto coda/nucleo, indice di minore danno al DNA (vedere Materiali e Metodi). Inoltre, l'attivazione di chinasi da stress come p38/MAPK, in seguito a trattamento con H₂O₂, risulta inferiore nelle cellule adattate (**figura 6, basso**) dimostrando ulteriormente una elevata resistenza agli stimoli da stress nelle cellule adattate.

Analisi delle variazioni dell'espressione genica nelle cellule adattate mediante mRNA Differential Display.

Per identificare le proteine coinvolte nel fenomeno dell'adattamento, abbiamo purificato RNA da cellule adattate e non, e ne abbiamo analizzato i profili di espressione genica mediante la tecnica del mRNA differential display, descritta nella precedente sezione. Sono stati individuati numerosi geni iperespressi nelle cellule adattate (**figura 7**): tra questi, una Acyl-CoA tioesterasi mitocondriale coinvolta nel metabolismo energetico,⁷⁴ la syntaxina 3A, proteina che modula il traffico vescicolare,⁷⁵ la Tropomiosina, PAR-1, proteina regolatoria nello sviluppo embrionale.⁷⁶

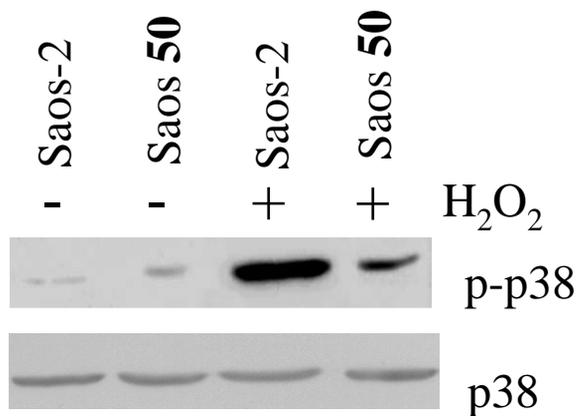
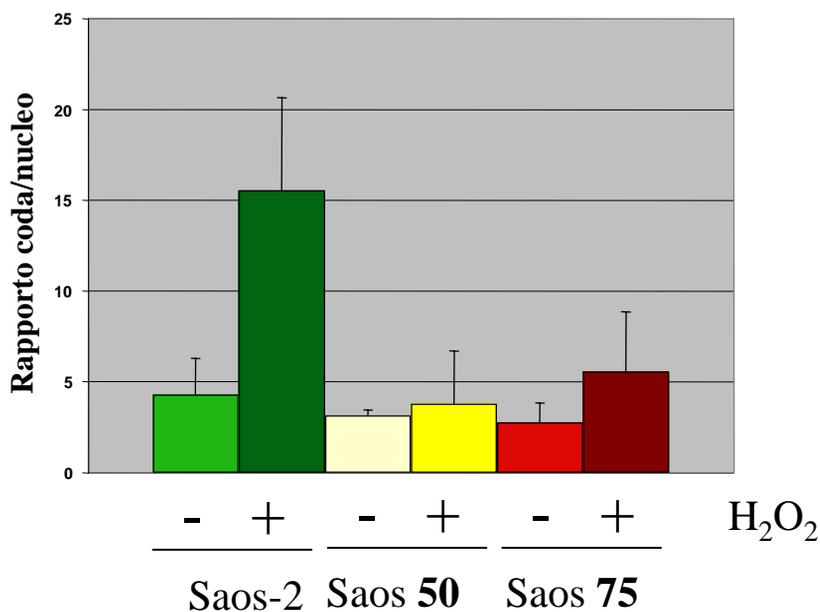
I trascritti su cui abbiamo concentrato principalmente i nostri studi sono stati due:

1. **FLJ20422**, una EST (Expressed Sequence TAG) codificante una proteina da noi chiamata **AROS-29**.
2. **Trap-1**, una Heat Shock Protein mitocondriale appartenente alla famiglia delle HSP90.

AROS-29 (Adaptive Response to Oxidative Stress) è coinvolta nella risposta adattativa allo stress ossidativo.

L'EST FLJ20422 trascritta sul cromosoma 19 codifica la proteina AROS-29, una proteina di 478 amminoacidi, altamente idrofobica con possibili multipli tratti transmembrana. La sua aumentata espressione nelle cellule adattate è

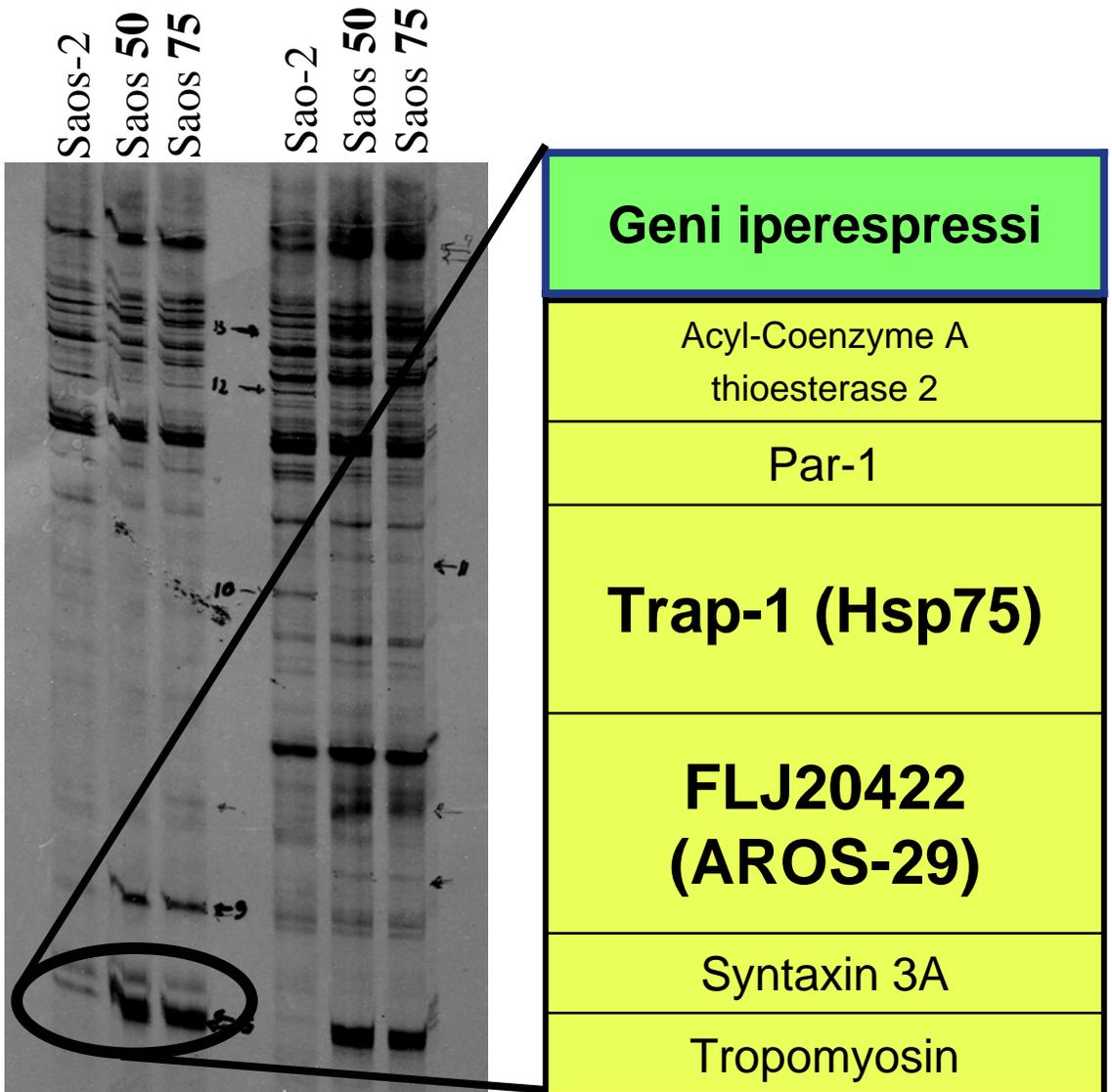
Comet Assay



Pannello superiore: comet assay per valutare gli effetti dell'H₂O₂ (500μM, 30') sui danni al DNA. L'analisi quantitativa e' stata condotta utilizzando il software NIH Image. I risultati sono espressi come rapporto tra la media dell'intensita' di colorazione della coda rispetto alla testa della cometa.

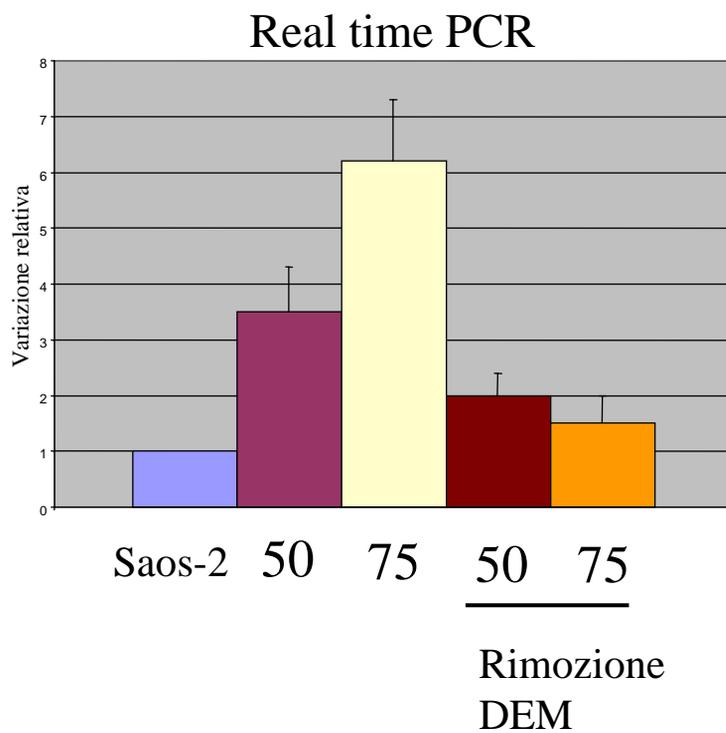
Pannello inferiore: Attivazione di p38 in seguito a trattamento con H₂O₂ (500μM, 30'). Western blot (40μg) di lisati proteici totali su gel al 10% incubati con anticorpo anti p38 fosforilato (attivo), il filtro e' stato successivamente normalizzato con anti p38 totale.

Differential Display



Geni iperespressi nelle cellule adattate al DEM identificati mediante differential display.

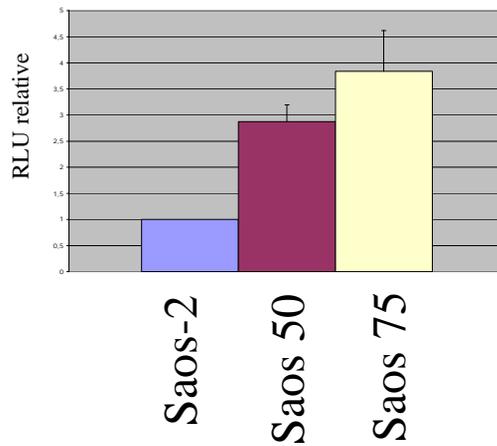
stata confermata mediante Real Time PCR. Inoltre, per accertarsi che l'aumentata espressione di FLJ20422 fosse un fenomeno reversibile e che correlasse, quindi, con il fenotipo adattato, abbiamo misurato i livelli di RNA messaggero dopo tre giorni dalla rimozione del DEM dal mezzo di coltura, osservando che i livelli di messaggero erano indistinguibili da quelli delle cellule non adattate (*figura 8*). Per valutare i meccanismi molecolari che regolano l'espressione di AROS-29 nelle cellule adattate, le cellule Saos-2, adattate e non, sono state trasfettate con un costrutto contenente la regione genomica comprendente 2000 paia di basi del promotore di Aros-29 a monte del gene della luciferasi. Come mostrato in *figura 9*, i livelli di attività luciferasica nelle cellule adattate era maggiore, mentre, condizioni pro-ossidanti indotte dai raggi UV, portavano ad una diminuzione della stessa; tale diminuzione era prevenuta dal pre-trattamento con NAC (N-Acetil Cisteina, un precursore del GSH), suggerendo che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella diminuzione dei livelli di AROS-29 mediata dagli UV. L'attività luciferasica correla anche con i livelli di messaggero di AROS-29 in seguito al trattamento con UV (*figura 10 alto*). I risultati appena esposti, quindi, dimostrano che la regolazione di AROS-29 avviene a livello trascrizionale e dipende dalle condizioni riducenti dell'ambiente intracellulare. Ciò è ulteriormente confermato da una simile induzione dell'espressione di AROS-29 in seguito a trattamento con Acido Retinoico (RA), un agente differenziante provvisto di proprietà antiossidanti.⁷⁷ In *figura 10 (basso)* è mostrata una analisi del mRNA di AROS-29 mediante Real Time PCR in cellule neuronali SHsy5y. L'aumento dell'espressione di AROS-29 non sembra essere correlato al differenziamento neuronale; infatti, è presente solo nelle prime ore del trattamento con RA (fino a 4 ore), in assenza di fenotipo differenziato: l'assenza di correlazione tra AROS-29 e il fenotipo differenziato è confermata dall'inverso comportamento del mRNA di p21waf1, la cui induzione, dimostrata nelle nostre condizioni sperimentali, è richiesta in queste cellule per differenziarsi e arrestare il ciclo cellulare.⁷⁸ Inoltre, in accordo con altri gruppi, che hanno dimostrato il coinvolgimento dell'acido retinoico nell'omeostasi del GSH,⁷⁹ i livelli intracellulari di GSH nelle cellule SHsy5y era aumentato. Per dimostrare il ruolo funzionale di AROS-29 nella protezione dallo stress ossidativo, abbiamo prodotto cloni stabili iperesprimenti la proteina in cellule Saos-2 per valutarne la risposta a



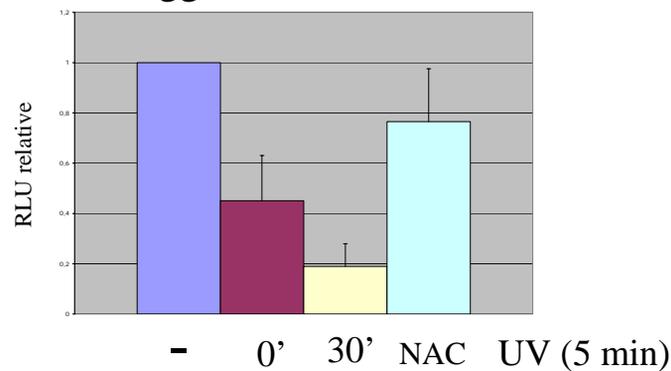
I livelli di AROS-29 correlano con il fenotipo adattato.

PCR Real Time di AROS-29 in cellule adattate prima e dopo 1 settimana dalla rimozione del DEM dal mezzo di coltura. Il valore di $\Delta\Delta Ct$ per AROS-29 delle Saos-2 non adattate è stato posto uguale ad 1.

Saggio di luciferasi



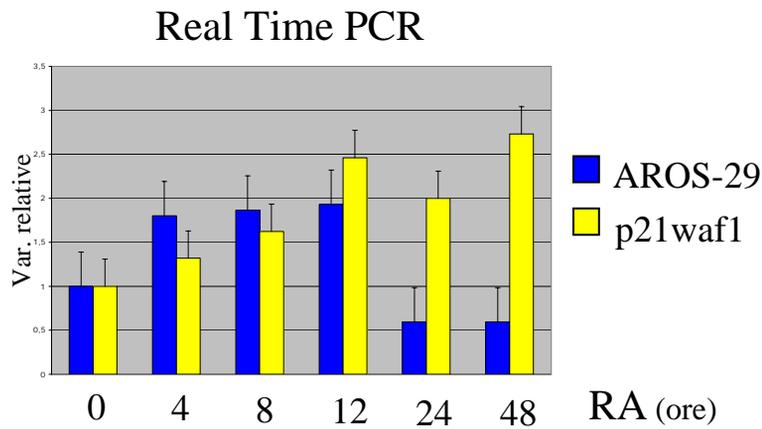
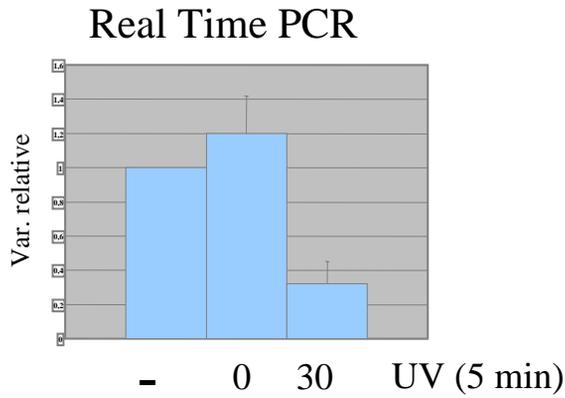
Saggio di luciferasi



Regolazione redox del promotore di AROS-29.

Pannello superiore: Saos adattate e non, trasfettate con la regione promotrice di AROS-29 (2000bp) clonata a monte del gene della luciferasi. I valori sono espressi ponendo le RLU delle Saos-2 pari a 1.

Pannello inferiore: Saos-2 trasfettate con la regione promotrice di AROS-29 (2000bp) irradiate per 5' con raggi UV 15 J/m² e raccolte subito dopo (0') o 30' dopo l'irradiazione. Il Trattamento con NAC 10mM precedeva di 24h l'irradiazione. I valori sono espressi ponendo le RLU delle Saos-2 pari a 1.



Regolazione redox del mRNA di AROS-29.

Pannello superiore: dosaggio mediante real time PCR dei livelli di mRNA di AROS-29 in seguito al trattamento con UV come descritto nella figura precedente. Il valore di $\Delta\Delta Ct$ per AROS-29 delle Saos-2 non trattate è stato posto uguale ad 1.

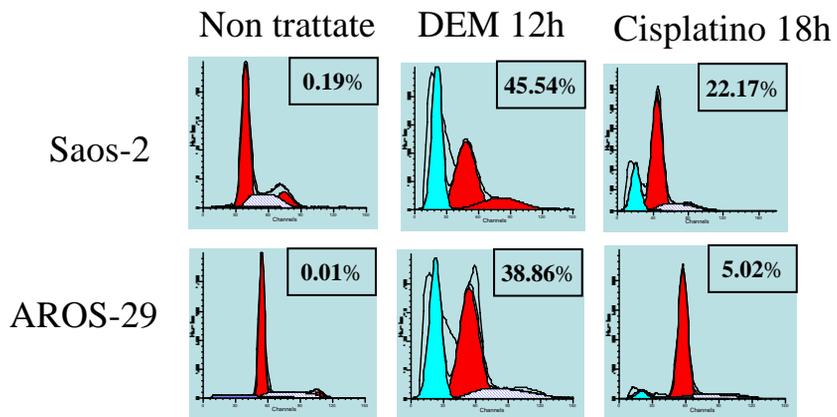
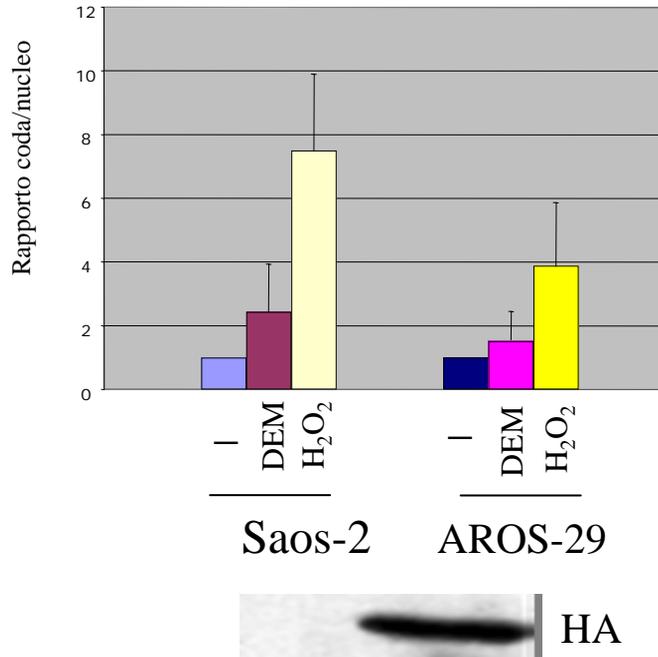
Pannello inferiore: Real time PCR dei messaggeri di AROS-29 e p21waf1 in cellule neuronali SHsy5y trattate per i tempi indicati con Acido Retinoico (RA) 10 μ M. Il valore di $\Delta\Delta Ct$ per AROS-29 e p21waf1 delle SHsy5y non trattate è stato posto uguale ad 1.

differenti tipi di stress. Il comet assay mostrato in *figura 11 (alto)*, dimostra che i livelli di danno arrecato al DNA dal DEM o dal perossido d'idrogeno, sono molto minori nei cloni stabili. Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti sulle cellule adattate. Inoltre, l'analisi citofluorimetrica di un insieme di cloni di AROS-29, esposte a diversi tempi a DEM e cisplatino, dimostrava anche una elevata resistenza dei cloni all'apoptosi (*figura 11, basso*). Queste osservazioni dimostrano che l'iperespressione di AROS-29 conferiva maggiore resistenza tanto al danno al DNA quanto all'apoptosi indotta da diversi tipi di stress.

Trap-1, una HSP mitocondriale, protegge le cellule dai danni ossidativi e dall'apoptosi.

Trap-1, o HSP75, è una proteina mitocondriale appartenente alla famiglia delle HSP90, ha una sequenza di 704 amminoacidi comprendenti una porzione N-terminale che la indirizza al mitocondrio, seguita da un dominio di idrolisi dell'ATP e da un dominio HSP90 (*figura 12*). Pur essendo la componente mitocondriale della famiglia delle HSP90, Trap-1 rappresenta il paralogo relativamente più distante filogeneticamente della famiglia, probabilmente il più vicino alle HTPG (high temperature protein G) eubatteriche (gli archeobatteri non hanno HSP).⁸⁰ E' stata isolata nel 1995 in un esperimento di doppio ibrido come ligando del TNF-Receptor (Tumor Necrosis Factor), successivamente ne è stata studiata la appartenenza alla famiglia delle HSP, dimostrando che anche Trap-1 idrolizza l'ATP con una K_M di 33 μ M, addirittura inferiore a quella delle altre HSP90 con cui non condivide, peraltro, il legame ai tipici co-chaperones come p23 e Hop.⁸¹ E' stato anche descritto un suo ruolo nell'apoptosi indotta dall'inibitore delle tirosine chinasi β -HIVS (β -Hydroxyisovalerylshikonin), che determinano una diminuzione dei livelli di proteina. La diminuzione dei livelli di Trap-1 è prevenuta sia dall'iperespressione di Bcl-2, una proteina antiapoptotica, che dal pre-trattamento con NAC, suggerendo così un coinvolgimento della proteina nei meccanismi molecolari che inducono apoptosi ROS dipendente.⁸² Questi dati mostravano come la diminuzione di Trap-1 avveniva in condizioni in cui la cellula era ormai indirizzata verso l'apoptosi da uno squilibrio redox, condizioni esattamente opposte a quelle delle nostre Saos-2 adattate in cui i

Comet Assay

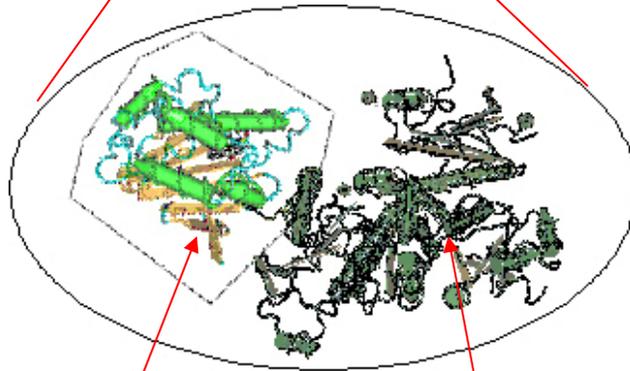
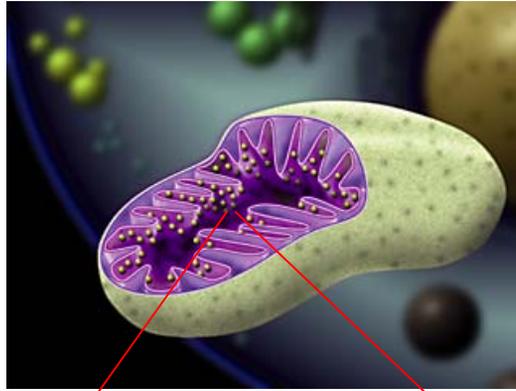


I cloni stabilmente iperesprimanti AROS-29 inducono resistenza al danno ossidativo e all'apoptosi.

Pannello superiore: Comet assay di cellule Saos-2 e cloni di AROS-29 trattati con DEM 1mM 30' o H₂O₂ 500μM 30'. Il western blot anti HA rivela l'espressione del transgene AROS-29/HA.

Pannello inferiore: analisi citofluorimetrica di Saos-2 e cloni di AROS-29 in seguito a trattamento con DEM 1mM 12ore e Cisplatino 50μM 18ore. Nel riquadro è indicata la percentuale di cellule apoptotiche.

TRAP-1 (hsp75)



Dominio
ATPasico

Dominio
HSP90

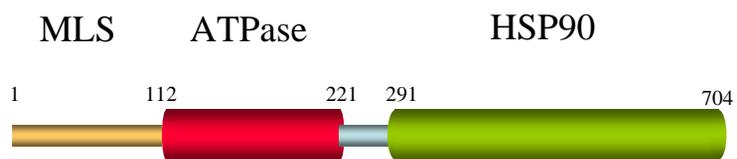
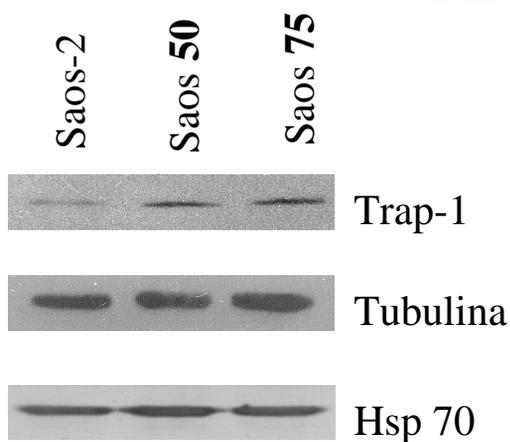
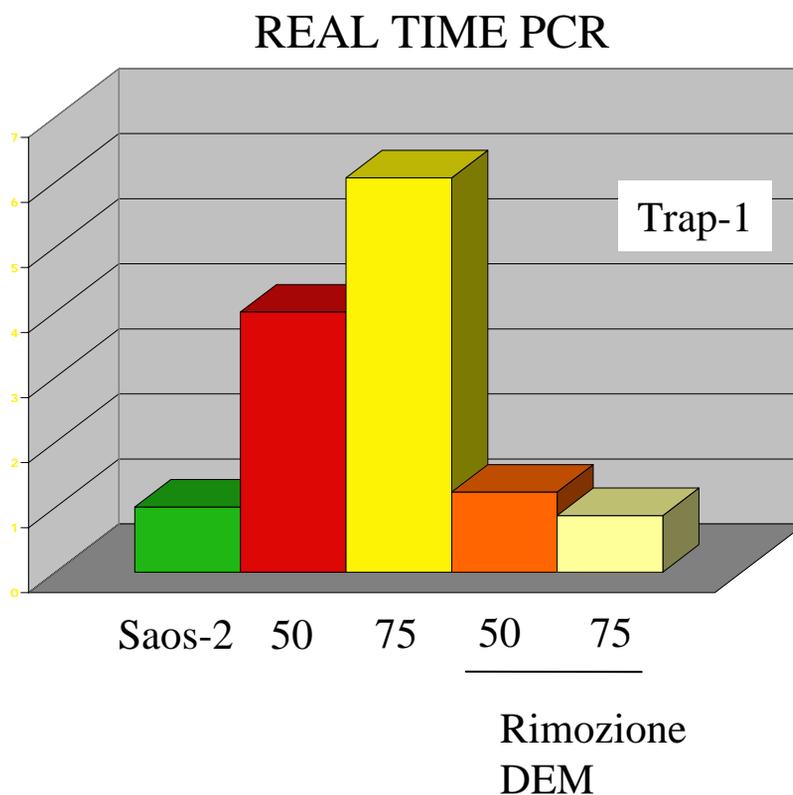


Figura 12

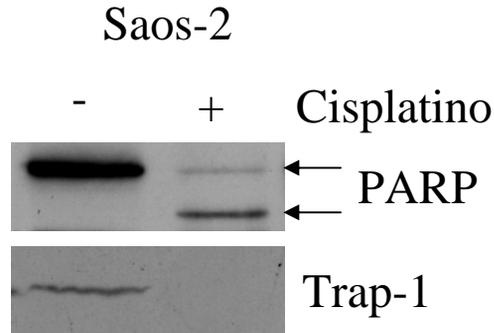
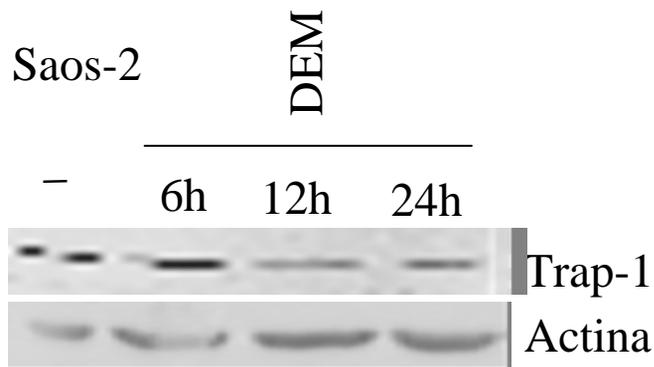
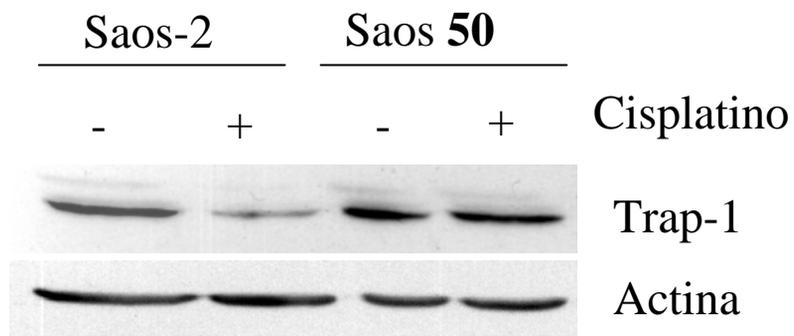
livelli di proteina erano aumentati e le cellule erano più resistenti allo stress ossidativo e all'apoptosi. Era quindi ragionevole pensare di correlare i livelli di Trap-1 con lo stato di benessere cellulare. Abbiamo confermato l'aumentata espressione di Trap-1 mediante la PCR Real Time e western blot (*figura 13*); i livelli di messaggero di Trap-1 risultavano aumentati nelle Saos-2 adattate e la rimozione del DEM dal mezzo di coltura riportava i livelli di messaggero a quelli di partenza, indicando che i livelli di Trap-1, come già quelli di FLJ20422, correlavano con i fenotipi delle cellule adattate. Anche il Western blot conferma l'aumento di Trap-1 nelle cellule adattate a differenza di quanto succede ad un'altra HSP, la HSP70, che non modifica il suo profilo di espressione, indicando come Trap-1 possa rappresentare una vera e propria sentinella redox del mitocondrio. Inoltre, la diminuzione intracellulare dei livelli di Trap-1 in seguito all'induzione di apoptosi con DEM o Cisplatino (confermato dal taglio di PARP, substrato di caspasi attiva) (*figura 14*) è evidente solo nelle cellule Saos-2 non adattate, suggerendo che gli aumentati livelli di Trap-1 possano contribuire alla maggiore resistenza all'apoptosi, e dimostrano ulteriormente una opposta correlazione tra Trap-1 e apoptosi. Per chiarire quali pathway molecolari fossero coinvolti nella regolazione dei livelli di proteina, abbiamo posto la nostra attenzione sulla chinasi JNK, attiva negli eventi precoci di attivazione del processo apoptotico: il segnale cellulare che coinvolge JNK sembra esercitare un ruolo protettivo nei confronti di Trap-1, dal momento che la sua inibizione sia farmacologica, con SP60024, che biochimica, trasfettando un dominante negativo di SEK-1, la chinasi che attiva JNK, accelerano la degradazione di Trap-1 durante l'apoptosi (*figura 15*). Per accertarci che l'incremento dei livelli di Trap-1 fosse necessario per indurre il fenomeno dell'adattamento, abbiamo selezionato cloni stabilmente iperespressivi la proteina e caratterizzato questo sistema per la risposta a diversi stress. Mediante comet assay abbiamo dimostrato come il trattamento ad alte concentrazioni di ossidanti come H₂O₂ e DEM danneggia molto di più il DNA delle cellule Saos-2 rispetto a quello dei cloni (*figura 16*). In letteratura è noto che la quantità intracellulare di HSP regola positivamente l'attività dell'enzima G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase), responsabile del metabolismo del glutatione in quanto fornisce alla cellula, attraverso la via del pentoso fosfato, equivalenti riducenti sottoforma di NADPH. ⁸³ Per questo motivo abbiamo dosato la quantità intracellulare di



I livelli di Trap-1 correlano con il fenotipo adattato.

Pannello superiore: PCR Real Time di Trap-1 in cellule adattate prima e dopo 1 settimana dalla rimozione del DEM dal mezzo di coltura. Il valore di $\Delta\Delta Ct$ per AROS-29 delle Saos-2 non adattate è stato posto uguale ad 1.

Pannello inferiore: Western Blot di Trap-1, Tubulina e HSP70 in cellule adattate e non. Lisati proteici totali (40 μ g) sono stati separati su gel al 10%.



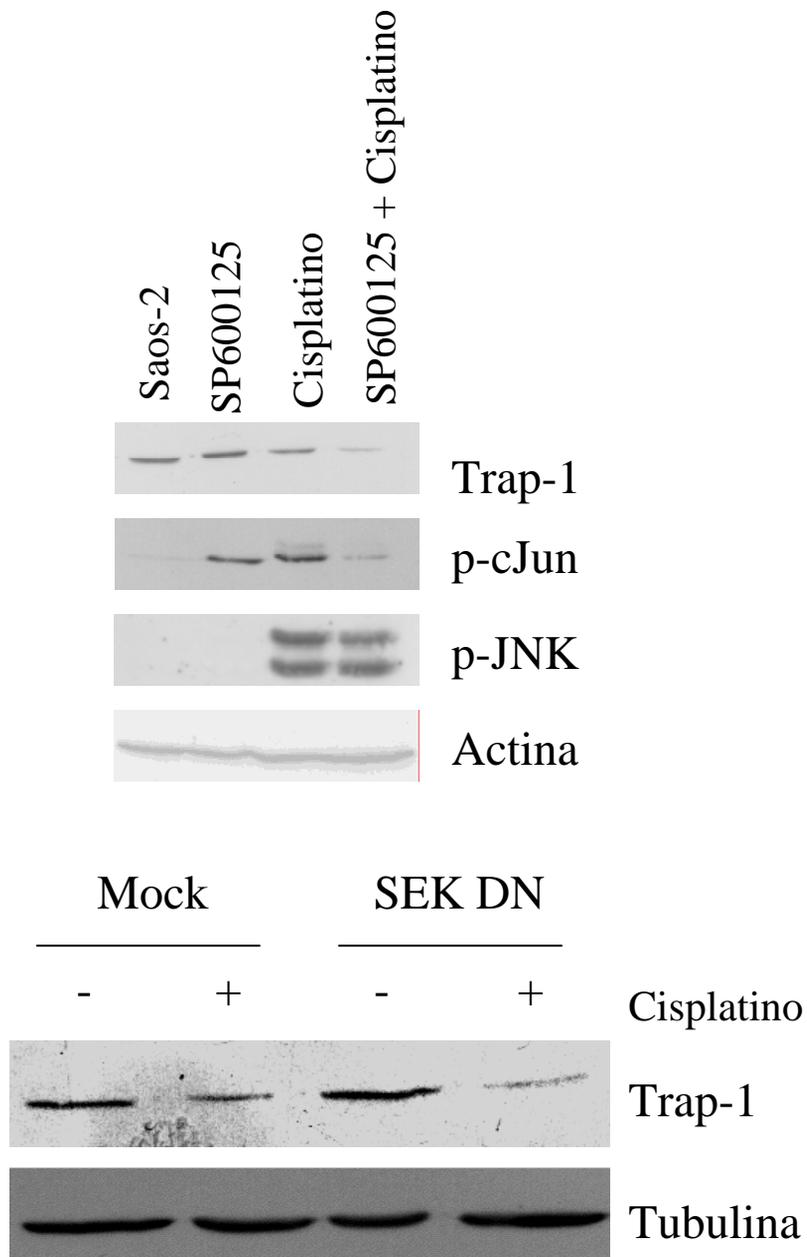
I livelli di Trap-1 non diminuiscono nelle cellule adattate.

Western blot anti Trap-1, actina e PARP: lisati proteici totali (40µg) sono stati separati su gel al 10%.

Pannello superiore: WB su Saos-2 adattate e non dopo trattamento con cisplatino 24ore, 50µM.

Pannello centrale: WB su Saos-2 dopo trattamento con DEM 12ore, 500µM.

Pannello inferiore: WB su Saos-2 dopo trattamento con cisplatino 24ore, 50µM.

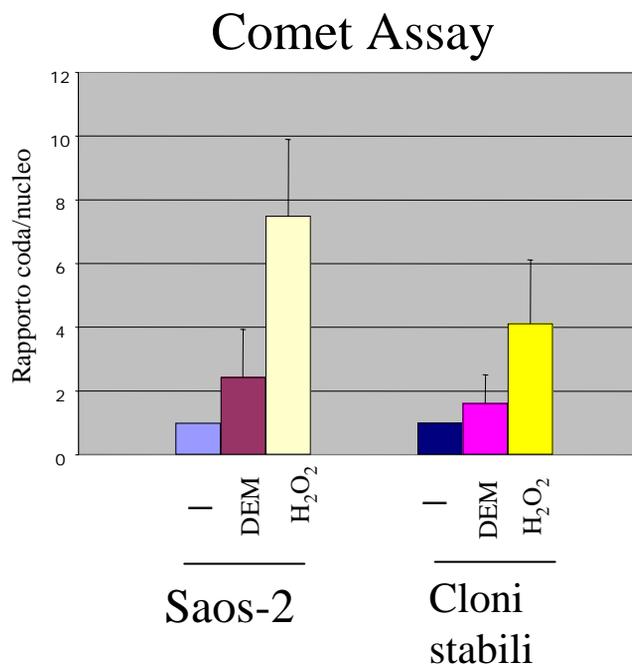
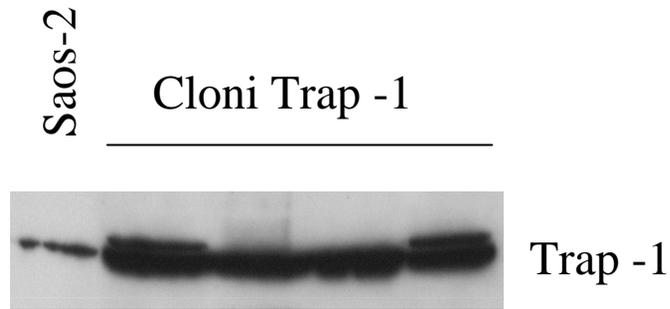


JNK esercita un ruolo inibitorio della degradazione di Trap-1

Western blot anti Trap-1, phospho c-Jun e phospho JNK Actina e tubulina: lisati proteici totali (40µg) sono stati separati su gel al 10%.

Pannello superiore: WB su Saos-2 in seguito a pretrattamento con SP600125 e trattamento con cisplatino 24ore, 50µM.

Pannello inferiore: WB su Saos-2 dopo 24h di trasfezione con il mutante dominante negativo di SEK e trattamento con cisplatino 24ore, 50µM.



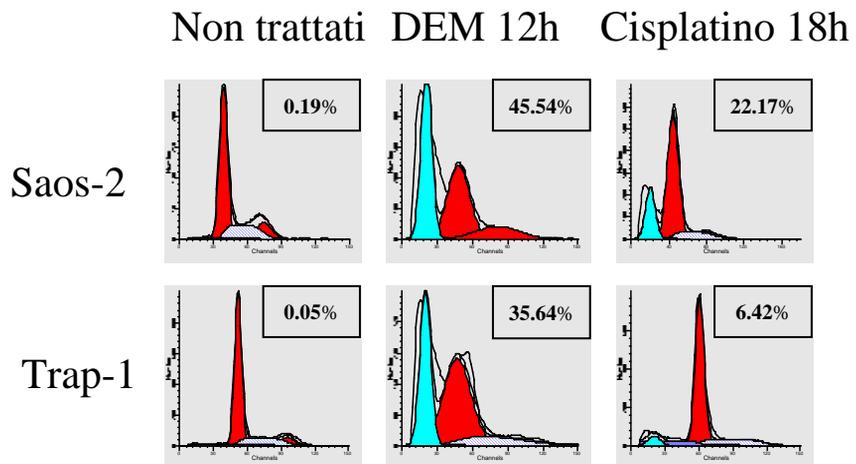
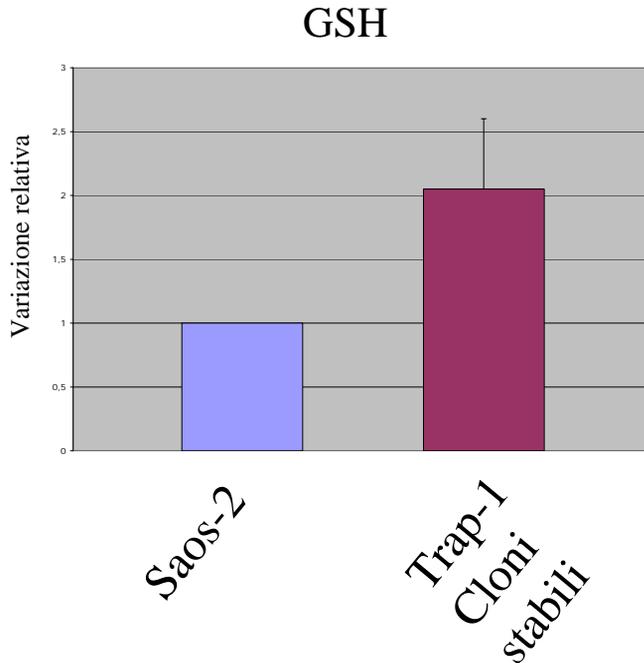
I cloni stabilmente iperesprimanti Trap-1 conferiscono resistenza al danno ossidativo.

Pannello superiore: Western blot anti Trap-1 su Saos-2 e cloni iperesprimanti Trap-1 di lisati proteici totali (10µg) separati su gel al 10%.

Pannello inferiore: Comet assay di cellule Saos-2 e cloni di Trap-1 trattati con DEM 1mM 30' o H₂O₂ 500µM 30'.

GSH nei cloni stabili di Trap-1 ed abbiamo confermato in essi una maggiore presenza di GSH (*figura 17 alto*). I nostri cloni, dunque, mostravano un ambiente intracellulare più resistente agli squilibri redox. La dimostrazione ulteriore che l'aumento di Trap-1 è sufficiente per modulare negativamente il processo di apoptosi è stata fornita da un'analisi citofluorimetrica dei cloni esposti ad alte concentrazioni di DEM o di Cisplatino: la percentuale di cellule apoptotiche in seguito ai trattamenti era decisamente inferiore nei cloni (*figura 17 basso*). Nel complesso, dunque, questi dati indicano un chiaro ruolo antiapoptotico di Trap-1. Abbiamo, quindi, cercato di chiarire alcuni meccanismi pro apoptotici con i quali l'iperespressione di Trap-1 potesse interferire. Uno di questi è il rilascio della flavoproteina mitocondriale AIF (Apoptosis Inducing Factor) nel nucleo dove contatta le endonucleasi deputate alla frammentazione del DNA genomico durante l'apoptosi. E' suggerito in letteratura che questo rilascio sembra dipendere in parte dalle HSP⁸⁴ e, nel nostro caso, è stato dimostrato che l'iperespressione di Trap-1, induce un ridotto accumulo nucleare di AIF in seguito a trattamento con cisplatino (*Figura 18 alto*). Anche l'attivazione della cascata delle Caspasi è ridotta nei cloni, come osservato mediante western blot anti pro-caspasi-3 citosolica. L'anticorpo riconosce solo l'oloenzima e non la sua forma tagliata e quindi attiva: una minore intensità di segnale, dunque, indica maggiore attivazione della caspasi-3. Questo è evidente nei cloni in seguito al trattamento con cisplatino, indicando che l'iperespressione di Trap-1 inibisce l'attivazione delle caspasi e del processo apoptotico (*figura 18 basso*). Nel complesso, tutti questi dati appena esposti chiariscono come la sola iperespressione di Trap-1 sia in grado di bloccare il processo di morte programmata di una cellula proteggendola da danni genotossici e ossidativi.

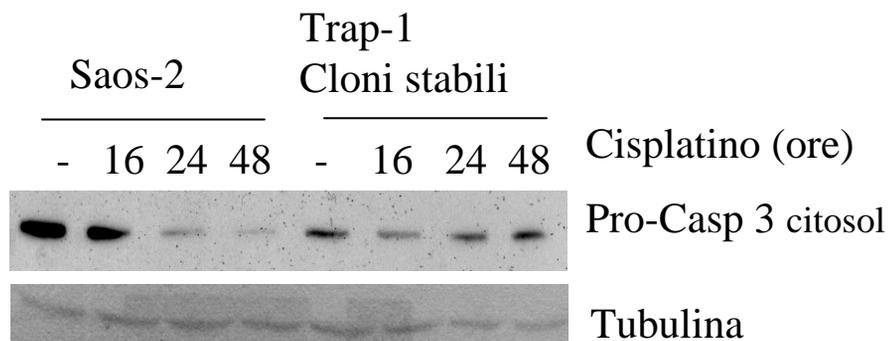
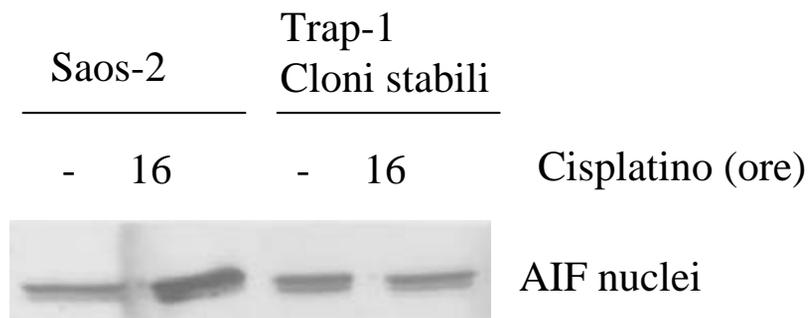
Per chiarire esattamente quali porzioni della proteina svolgessero un ruolo antiapoptotico, abbiamo generato una batteria di mutanti di delezione ciascuno privo di uno o più domini della proteina, recanti un epitopo immunogenico di HA (emoagglutinina virale) all'estremità carbossi terminale, secondo lo schema riportato in *figura 19*. I plasmidi contenenti i mutanti sono stati trasfettati in cellule Saos-2 e i trasfettanti analizzati in citofluorimetria mediante il saggio dell'Annessina/Ioduro di Propidio che permette di discriminare cellule in apoptosi (positive alla colorazione con annessina), in



I cloni stabilmente iperespressanti Trap-1 mostrano superiori livelli di GSH e conferiscono resistenza all'apoptosi.

Pannello superiore: livelli basali di GSH in Saos-2 e Cloni di Trap-1
La quantità di GSH delle Saos-2 è stata posta uguale a 1.

Pannello inferiore: analisi citofluorimetrica di Saos-2 e cloni di Trap-1 in seguito a trattamento con DEM 1mM 12ore e Cisplatino 50µM 18ore. Nel riquadro è indicata la percentuale di cellule apoptotiche.

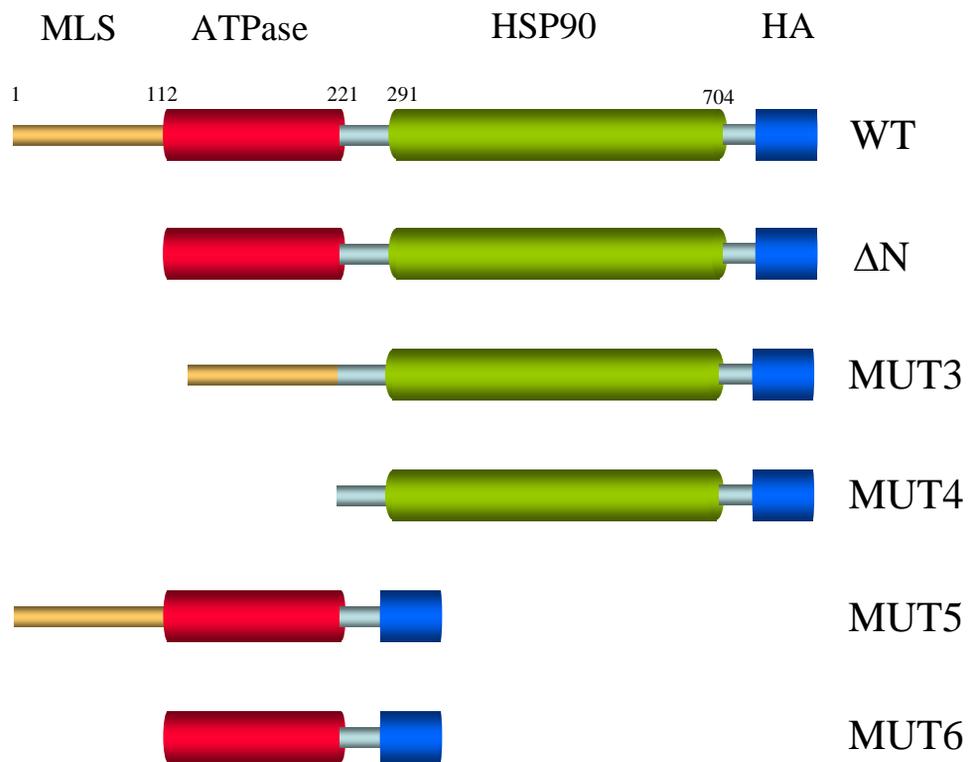


Trap-1 inibisce l'apoptosi contrastando l'accumulo nucleare di AIF e l'attivazione della Caspasi-3

Western blot anti AIF, pro-Caspasi3 e tubulina: lisati proteici frazionati (nuclei, citosol) (40µg) sono stati separati su gel al 10%.

Pannello superiore: WB su Saos-2 e cloni Trap-1 in seguito a trattamento con cisplatino 16ore, 50µM.

Pannello inferiore: WB su Saos-2 e cloni Trap-1 in seguito al trattamento con cisplatino 50µM per i tempi indicati.



Schema mutanti di delezione di Trap-1

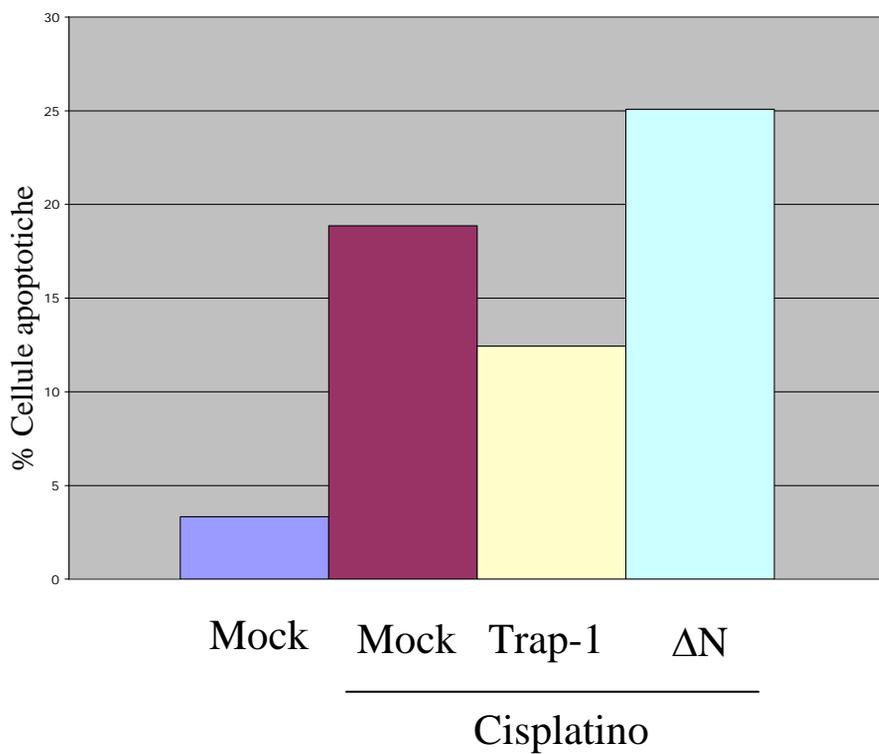
necrosi (positive alla colorazione con ioduro di propidio), o in apoptosi tardiva (doppie positive al propidio e all'annessina).

La trasfezione del mutante ΔN , ovvero il mutante che presenta la delezione del putativo segnale di localizzazione mitocondriale, provoca un notevole aumento della percentuale di cellule in apoptosi tardiva, impedendo a TRAP-1 endogena di proteggere le cellule dall'apoptosi, comportandosi come un dominante negativo della proteina intera (*figura 20*).

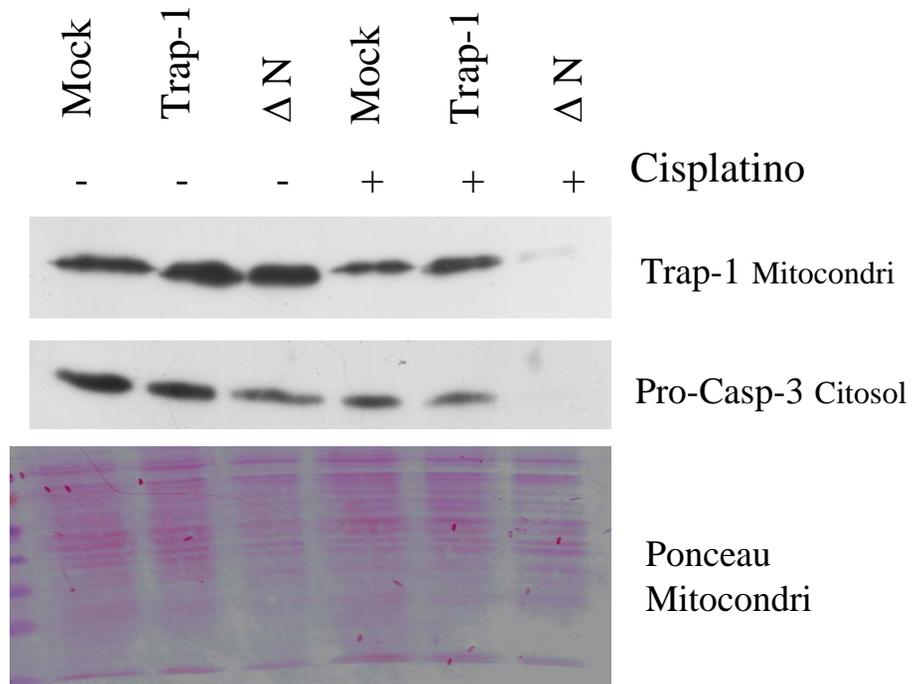
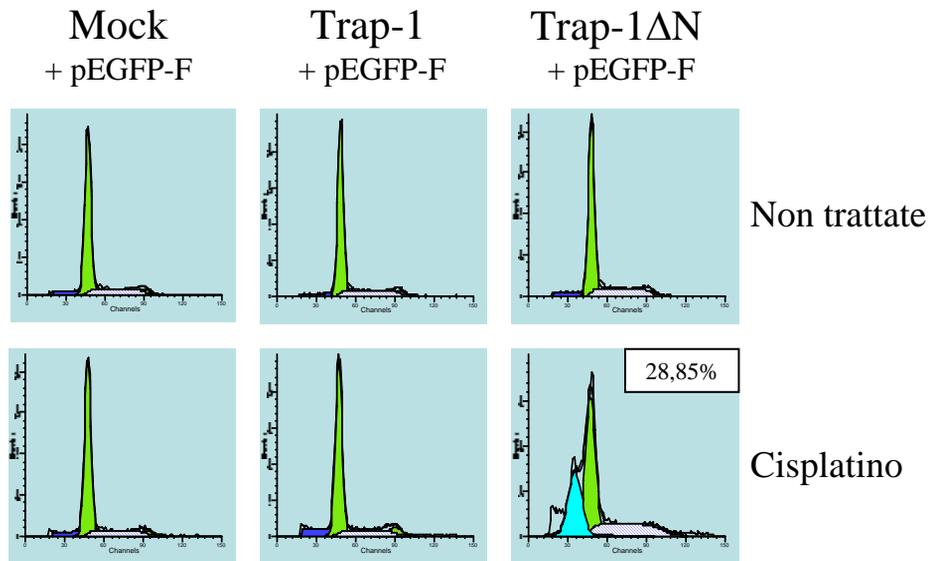
Una dimostrazione ancora più netta della capacità del mutante ΔN di fungere da dominante negativo potevamo averla trasfettandolo nei cloni iperesprimenti Trap-1, estremamente resistenti all'apoptosi (*figura 16 e 17*) e misurando i livelli di apoptosi in seguito a trattamento con cisplatino. Abbiamo cotrasfettato un costrutto codificante la fEGFP (una Green Fluorescent Protein contenente un sito di farnesilazione che la indirizza in membrana plasmatica) con la proteina wild-type e il mutante ΔN nei cloni iperesprimenti Trap-1. La presenza di fEGFP ci ha permesso, al citofluorimetro, di selezionare solo i reali trasfettanti rispetto all'intera popolazione cellulare e di analizzarne la percentuale di cellule apoptotiche. Ancora una volta il mutante ΔN si è dimostrato capace di interferire non solo con la funzionalità della proteina endogena ma anche con quella esogenamente espressa nei cloni, inducendo morte per apoptosi nelle cellule trattate con cisplatino (*figura 21 alto*). Ancora più evidente è l'effetto del ΔN su Trap-1 endogena quando viene analizzato mediante western blot. In seguito al trattamento con Cisplatino, infatti, i livelli di Trap-1 diminuiscono in modo drammatico solo nelle Saos-2 trasfettate con il mutante ΔN , accompagnati da una massiva attivazione della Caspasi-3 (*figura 21 basso*).

Questi risultati pongono dunque l'attenzione sull'importanza dei primi cento amminoacidi della sequenza di TRAP-1; tale porzione potrebbe difatti rappresentare un dominio importante e necessario per l'esercizio del ruolo antiapoptotico svolto da questa proteina. Successive analisi proteomiche potranno chiarire se il mutante ΔN è in grado di sequestrare interattori fondamentali di Trap-1 senza i quali non riesce a svolgere il suo ruolo antiapoptotico, o se la stessa porzione N-terminale è di per sé un dominio fondamentale per la funzionalità di Trap-1.

Analisi citofluorimetrica



Il mutante ΔN interferisce con la funzionalita' di Trap-1 endogena.
Analisi citofluorimetrica di Saos-2 trasfettate con Trap-1 e mutante ΔN per 24h seguite da trattamento con Cisplatino 50 μ M per 24ore.



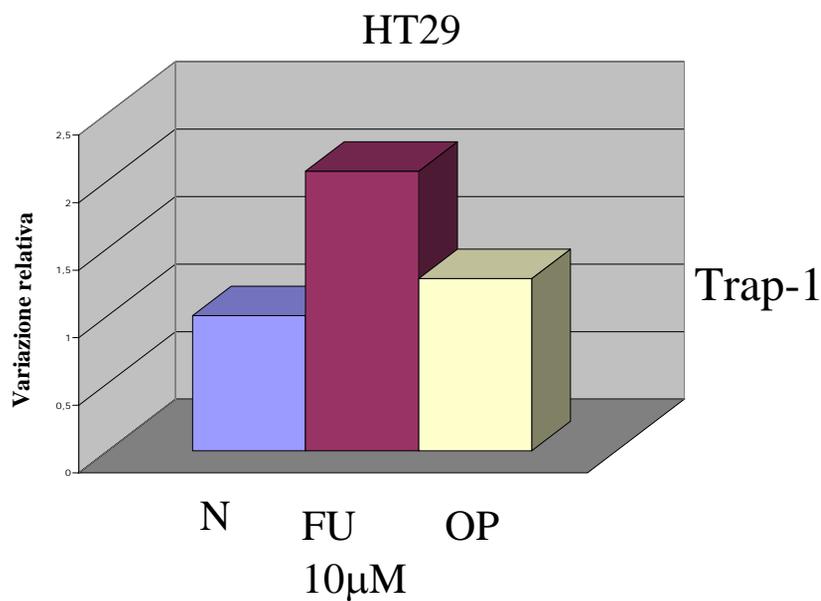
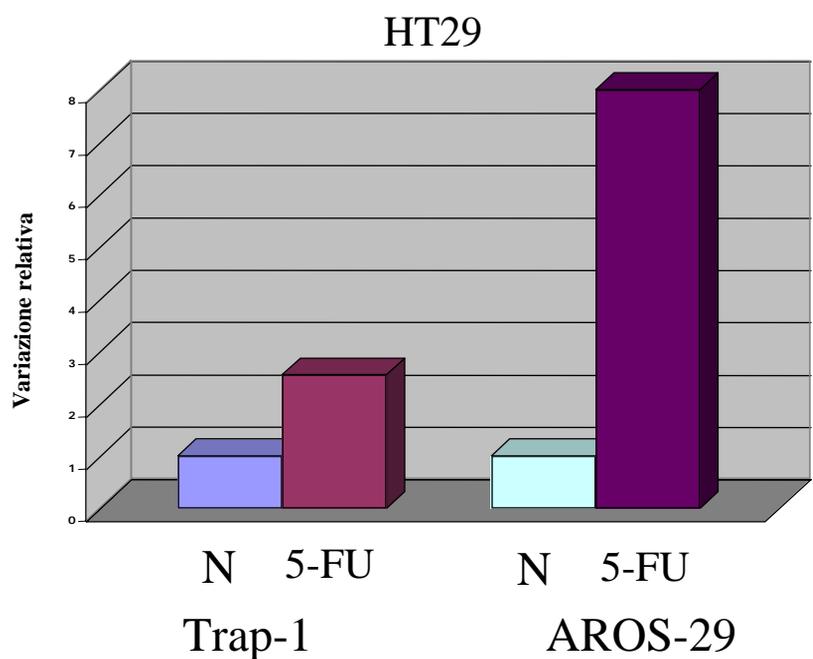
Il mutante Δ N interferisce con la funzionalita' di Trap-1 endogena.

Pannello superiore: Analisi citofluorimetrica di cloni iperesprimenti Trap-1 trasfettate per 24 ore con Trap-1 e mutante Δ N in cotrasfezione con un vettore codificante una GFP farnesilata seguite da trattamento con Cisplatino 50 μ M per ulteriori 24ore. Nel riquadro è indicata la percentuale di cellule apoptotiche.

Pannello inferiore: Western blot anti Trap-1 e pro-Caspasi3: lisati proteici frazionati (mitochondri, citosol) (40 μ g) sono stati separati su gel al 10%. Il filtro dei lisati mitocondriali e' stato colorato con rosso ponceau come normalizzazione del western.

***Correlazioni tra adattamento allo stress ossidativo e chemioresistenza:
ruolo di Trap-1 ed AROS-29***

Come anticipato nell'introduzione, esistono strette correlazioni tra adattamento allo stress ossidativo e chemioresistenza: lo stress ossidativo, infatti, è indotto da numerosi farmaci antineoplastici, come, ad esempio, derivati del platino, antracicline o bleomicine. Le cellule tumorali, tuttavia, spesso riescono ad evitare i danni citotossici ed ossidativi provocati da questi farmaci, potenziando i sistemi di detossificazione e le difese antiossidanti esattamente allo stesso modo in cui le cellule Saos-2 si sono adattate a vivere in presenza di DEM. Per questo motivo abbiamo valutato l'espressione dei trascritti di AROS-29 e Trap-1, mediante Real time PCR, in alcune linee cellulari resistenti a chemioterapici. AROS-29 e Trap-1 risultano maggiormente espressi in linee cellulari di carcinoma del colon HT29 resistenti al 5-Fluorouracile (alle concentrazioni di 10 e 50 μM), e resistenti all'oxaliplatino, derivato del platino di più recente introduzione sul mercato. (*figura22*). Questi dati confermano l'ipotesi che esistono meccanismi comuni di risposta a stress ossidativo e chemioterapici e che in questo ambito un ruolo particolarmente importante lo giocano i geni da noi identificati. Una casistica maggiore potrà in futuro chiarire se ci sono associazioni statistiche valide tra la resistenza ad alcuni chemioterapici e l'iperespressione dei nostri geni o se esistono istotipi tumorali che più velocemente sviluppano resistenza iperesprimendo AROS-29 e Trap-1.



I livelli di messaggero di Trap-1 e AROS-29 aumentano in cellule chemioresistenti.

PCR Real Time di Trap-1 e AROS-29 in cellule resistenti al 5-Fluorouracile 50 μ M (*pannello superiore*) o 10mM e all'oxaliplatino (*pannello inferiore*). Il valore di $\Delta\Delta C_t$ per AROS-29 e Trap-1 delle HT-29 non resistenti è stato posto uguale ad 1.

Discussione

La capacità degli organismi di organizzare risposte adattative agli stimoli ambientali rappresenta uno dei meccanismi fondamentali per la sopravvivenza. Drammatiche variazioni redox cellulari possono causare enormi danni alle macromolecole biologiche; per questo motivo si sono evoluti numerosi meccanismi di difesa che le cellule utilizzano per garantire la sopravvivenza e la crescita cellulare. Abbiamo utilizzato un sistema sperimentale di adattamento ad un blando stress ossidativo poiché rappresenta il modello ideale per capire quali geni sono responsabili del fenomeno. L'adattamento delle cellule Saos-2, infatti, rappresenta un fenomeno di modificazione dell'assetto genico globale della cellula e non è frutto dell'accumulo di singole mutazioni per diverse ragioni: innanzitutto non abbiamo effettuato una selezione clonale delle cellule sopravvissute al trattamento con il DEM ma abbiamo mantenuto in coltura l'intera popolazione di cellule adattate; in secondo luogo, la ploidia delle Saos-2 50 e 75 non risultava modificata, il fenotipo era reversibile e, non ultimo, l'iperespressione dei geni da noi isolati contribuiva all'instaurarsi del fenotipo stesso.

Grazie al differential display siamo riusciti a identificare alcuni trascritti iperespressi nel nostro sistema sperimentale il cui ruolo nei fenomeni adattativi non era mai stato studiato precedentemente. Quest'affermazione è particolarmente esatta per i due geni che sono stati oggetto del nostro studio: AROS-29, su cui nessuno studio era stato pubblicato in precedenza,⁸⁵ e Trap-1. L'iperespressione dei due geni, infatti, contribuisce a ripristinare i fenotipi delle cellule adattate, e, da sola è sufficiente a proteggere le cellule dai danni ossidativi e dall'apoptosi: i meccanismi cellulari che contribuiscono all'iperespressione di questi geni tendono quindi a promuovere la crescita cellulare favorendo la sopravvivenza in condizioni normalmente sfavorevoli per una cellula.

Questo tipo di risposta adattativa è particolarmente evidente in cellule tumorali chemioresistenti, perché molti farmaci chemioterapici inducono la produzione di ROS e creano un ambiente pro-ossidante molto simile a quello da noi riprodotto nelle Saos-2 adattate. Le correlazioni tra sviluppo della chemioresistenza e adattamento allo stress ossidativo sono molteplici, ad esempio, è noto come il pre-trattamento con perossido d'idrogeno contribuisca

all'instaurarsi della resistenza all'adriamicina⁸⁶ o che le condizioni di danno genotossico a carico del più vulnerabile DNA mitocondriale provochino danni alla catena respiratoria generando così uno squilibrio redox in cellule trattate con chemioterapici.⁵²

Aver chiarito il ruolo fondamentale di Trap-1 ed AROS-29 in questi processi di adattamento e resistenza apre la strada a nuovi studi: da un lato di tipo molecolare per chiarire in maniera inequivocabile il funzionamento di questi due geni; dall'altro di tipo statistico per analizzare i profili di espressione e di funzionalità dei due geni in cellule chemioresistenti, allo scopo di individuare due nuovi marker con valore diagnostico/prognostico e successivamente per lo sviluppo di nuovi agenti antineoplastici.

Bibliografia

- ¹ Eulàlia de Nadal, Paula M. Alepuz, and Francesc Posas^a Dealing with osmopressure through MAP kinase activation *EMBO Rep.* 2002 August 15; 3(8): 735–740. Review
- ² <http://www.molecularprobes.com/handbook/tables/1451.html>
- ³ Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T. Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr Top Cell Regul.* 1997;35:123-48. Review.
- ⁴ G.M. Pontieri *Patologia Generale* ed. Piccin
- ⁵ Pratt W. B. Taylor P. *Farmacologia* ed. Zanichelli
- ⁶ <http://www.h2o2.com/applications/industrialwastewater/fentonsreagent.html>
- ⁷ Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1430-42. Review.
- ⁸ Dolara *Tossicologia generale e ambientale* ed. Piccin
- ⁹ Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1969s-1975s. Review.
- ¹⁰ Tan CM, Xenoyannis S, Feldman RD. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res.* 1995 Oct;77(4):710-7.
- ¹¹ Schrammel A, Pfeiffer S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinopyridone involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol.* 1998 Jul;54(1):207-12.
- ¹² Devlin, *Biochimica con aspetti clinici*, ed. Gnocchi
- ¹³ Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 2000 Jun 30;476(1-2):52-4. Review.
- ¹⁴ Engelhardt JF. Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxid Redox Signal.* 1999 Spring;1(1):5-27. Review.
- ¹⁵ Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S. Review.
- ¹⁶ Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 2000 Nov-Dec;7(6):444-58. Review
- ¹⁷ Wang S, Li H. Radical scavenging activity of ribonuclease inhibitor from cow placenta. *Biochemistry (Mosc).* 2006 May;71(5):520-4.
- ¹⁸ Cui XY, Fu PF, Pan DN, Zhao Y, Zhao J, Zhao BC. The antioxidant effects of ribonuclease inhibitor. *Free Radic Res.* 2003 Oct;37(10):1079-85.
- ¹⁹ E.R. Stadtman, Oliver C.N (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266, 2005-2008
- ²⁰ D.H. Flint, J.F. Tuminello, M.H. Emptage (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268, 22369-22376
- ²¹ W.F. Beyer, I. Fridovich (1987) Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 1251-1257
- ²² K. Asada, M. Takahashi (1987) *Photoinhibition* (ed. D.J. Kyle et al) 227-228 Elsevier, Amsterdam
- ²³ Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994 Jan;74(1):139-62
- ²⁴ Jyothi MD, Khar A. Induction of nitric oxide production by natural killer cells: its role in tumor cell death. *Nitric Oxide.* 1999 Oct;3(5):409-18.
- ²⁵ Davis Dulbecco *Microbiologia* ed. Zanichelli.
- ²⁶ Rosner JL, Storz G. Regulation of bacterial responses to oxidative stress. *Curr Top Cell Regul.* 1997;35:163-77. Review.
- ²⁷ Shirasu K, Dixon RA, Lamb C. Signal transduction in plant immunity. *Curr Opin Immunol.* 1996 Feb;8(1):3-7. Review.
- ²⁸ Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):248-53. Review.
- ²⁹ Toledano MB, Leonard WJ. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 15;88(10):4328-32.
- ³⁰ Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 1999 Jan;11(1):1-14. Review.
- ³¹ Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:351-69. Review.
- ³² Yao KS, Clayton M, O'Dwyer PJ. Apoptosis in human adenocarcinoma HT29 cells induced by exposure to hypoxia. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jan 18;87(2):117-22.

- ³³ Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E, Hirata H. Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):33018-25.
- ³⁴ Hecht D, Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Oct 30;188(2):773-9.
- ³⁵ Chiarugi P, Fiaschi T, Taddei ML, Talini D, Giannoni E, Raugei G, Ramponi G. Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33478-87. Epub 2001 Jun 27.
- ³⁶ Schieven GL, Mittler RS, Nadler SG, Kirihara JM, Bolen JB, Kanner SB, Ledbetter JA. ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H₂O₂-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem*. 1994 Aug 12;269(32):20718-26.
- ³⁷ Preston TJ, Muller WJ, Singh G. Scavenging of extracellular H₂O₂ by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):9558-64. Epub 2000 Dec 27.
- ³⁸ Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. 1998 May 1;17(9):2596-606.
- ³⁹ Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Stadtman ER. A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors*. 1999;10(2-3):207-9. Review.
- ⁴⁰ Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):34543-6.
- ⁴¹ Thannickal VJ, Fanburg BL. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem*. 1995 Dec 22;270(51):30334-8.
- ⁴² Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem*. 1995 May 19;270(20):11727-30.
- ⁴³ Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. 1997 Mar 14;275(5306):1649-52.
- ⁴⁴ Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995 Oct 13;270(5234):296-9.
- ⁴⁵ Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):217-21.
- ⁴⁶ Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Murphy TM, Chitano P, Hoidal JR. Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):20017-26.
- ⁴⁷ Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J*. 1996 Sep 1;318 (Pt 2):379-82.
- ⁴⁸ Esposito F, Chirico G, Montesano Gesualdi N, Posadas I, Ammendola R, Russo T, Cirino G, Cimino F. Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires SRC activity. *J Biol Chem*. 2003 Jun 6;278(23):20828-34. Epub 2003 Apr 7.
- ⁴⁹ A.G. Wiese, R.E. Pacifici, K.J.A. Davies: Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Archives of Biochem. and Biophys*. 1995; 318:231-240
- ⁵⁰ D.R. Spitz, M.A. Mackey, G.C. Li et al.: Relationship between changes in ploidy and stable cellular resistance to hydrogen peroxide. *Journal of Cellular Physiology* 1989; 139:592-598
- ⁵¹ D.R. Spitz, M.T. Kinter, R.J. Roberts: Contribution of increased glutathione content to mechanisms of oxidative stress resistance in hydrogen peroxide resistant Hamster fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 1995; 165:600-609
- ⁵² Copeland W.C., Wachsmann J, Johnson F.M, Penta J.S : Mitochondrial DNA alteration in cancer.2002 *Cancer Invest*.20, 557-565
- ⁵³ Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeier P, Mann K. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol*. 1995 Jul;15(7):3892-903.
- ⁵⁴ Huang HL, Fang LW, Lu SP, Chou CK, Luh TY, Lai MZ. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene*. 2003 Nov 6;22(50):8168-77.

-
- ⁵⁵ Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci.* 2004 Aug;95(8):644-50.
- ⁵⁶ Schweyer S, Soruri A, Heintze A, Radzun HJ, Fayyazi A. The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines. *Int J Oncol.* 2004 Dec;25(6):1671-6.
- ⁵⁷ Perez R.P: cellular and molecular determinants of cis-platin resistance. 1999 *Eur.J.Cancer* 34,1535-1542.
- ⁵⁸ Fokkema E., Groen H.T., Helder M.N: JM-216, JM-118 and cis platin induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumor cell lines with different sensitivities to cis-platinum. 2002 *Biochem.Pharmacol.*
- ⁵⁹ Kelly S.L, Bausa, teicherba, Hacker M.P., Hamerdh: overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drug. 1988 *science* 241,1813-1815
- ⁶⁰ Miyajima A., Nakashima J, Yoshioka K, Tachibana M, Murai M: role of ROS in cis-platinum induced cytotoxicity on bladder cancer cells. 1997 *Br.J.Cancer* 76,2006-2010
- ⁶¹ Goodman and Gilman: *Le Basi Farmacologiche della Terapia.* Mc Graw Hill
- ⁶² Esposito F, Russo T, Cimino F. Generation of prooxidant conditions in intact cells to induce modifications of cell cycle regulatory proteins. *Methods Enzymol.* 2002;352:258-68.
- ⁶³ Boyland E, Chasseaud LF. Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem J.* 1967 Jul;104(1):95-102.
- ⁶⁴ Esposito F, Cuccovillo F, Morra F, Russo T, Cimino F. DNA binding activity of the glucocorticoid receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Feb 21;1260(3):308-14.
- ⁶⁵ Esposito F, Agosti V, Morrone G, Morra F, Cuomo C, Russo T, Venuta S, Cimino F. Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced through glutathione depletion. *Biochem J.* 1994 Aug 1;301 (Pt 3):649-53.
- ⁶⁶ Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, O'Connor PM, Anderson CW, Appella E. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29386-91.
- ⁶⁷ Esposito F, Cuccovillo F, Vanoni M, Cimino F, Anderson CW, Appella E, Russo T. Redox-mediated regulation of p21(waf1/cip1) expression involves a post-transcriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem.* 1997 May 1;245(3):730-7.
- ⁶⁸ Esposito F, Cuccovillo F, Russo L, Casella F, Russo T, Cimino F. A new p21waf1/cip1 isoform is an early event of cell response to oxidative stress. *Cell Death Differ.* 1998 Nov;5(11):940-5.
- ⁶⁹ Esposito F, Russo L, Russo T, Cimino F. Retinoblastoma protein dephosphorylation is an early event of cellular response to prooxidant conditions. *FEBS Lett.* 2000 Mar 24;470(2):211-5.
- ⁷⁰ IK Smith, TL Vierheller, CA. Thorne: Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Anal.Biochem.* 1988;175(2):408-413
- ⁷¹ P.Liang, AB. Pardee: differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;14;257 (5072):967-71
- ⁷² Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal. *Pharmacol Ther* 1991;51:155-194.
- ⁷³ Esposito F, Russo T, Cimino F. Generation of pro-oxidant conditions in intact cells to induce modifications of cell cycle regulatory proteins. *Meth Enzymol* 2002;352:258-268.
- ⁷⁴ Poupon V, Begue B, Gagnon J, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N, Benmerah A. Molecular cloning and characterization of MT-ACT48, a novel mitochondrial acyl-CoA thioesterase. *J Biol Chem* 1999;274:19188-19194.
- ⁷⁵ Kauppi M, Wohlfahrt G, Olkkonen VM. Analysis of the Munc18b-synthaxin binding interface. *J Biol Chem* 2002;277:43973-43979.
- ⁷⁶ Sun TQ, Lu B, Feng JJ, Rehinard C, Jan YN, Fanti WJ, William LT. PAR-1 is a disheveled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signaling. *Nat Cell Biol* 2001; 3:628-636.
- ⁷⁷ Morales MC, Perez-Yarza G, Nieto-Rementeria N, Boxano MD, Jangi M, Atencia R, Asumendi A, et al. Intracellular glutathione levels determine cell sensitivity to apoptosis induced by the antineoplastic agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Anticancer Res* May-Jun 2005;25(3B): 1945-1951.
- ⁷⁸ Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, Purgato S, Fronza R, Bianucci F, Guerra F, Pession A, Ferreri AM. p21waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC

-
- inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep* Jun 2005;13(6):1139–1144.
- ⁷⁹ Wu Y, Zhang WY, Bardag-Gorce F, Aguilo J, Zeng Y, Hwang K, French SW, Lu SC, Wan YJ. Retinoid X receptor alpha regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. *Mol Pharmacol* 2004; 65:550–557.
- ⁸⁰ Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*. 2006 Jun 17;7:156.
- ⁸¹ Sara J. Felts, Barbara A. L. Owen, PhuongMai Nguyen, Jane Trepel, David B. Donneri, and David O. Toft. The hsp90-related Protein TRAP1 Is a Mitochondrial Protein with Distinct Functional Properties. *J Biol Chem*. 2000 Feb 4;275(5): 3305–12.
- ⁸² Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, Horie M, Hori K, Nakajo S, Kajimoto S, Shibayama-Imazu T, Nakaya K. Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42503-15. Epub 2004 Jul 28.
- ⁸³ Yan LJ, Rajasekaran NS, Sathyanarayanan S, Benjamin IJ. Mouse HSF1 disruption perturbs redox state and increases mitochondrial oxidative stress in kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Mar-Apr;7(3-4):465-71.
- ⁸⁴ Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol*. 3: 839-843, 2001.
- ⁸⁵ Montesano Gesualdi N, Chirico G, Catanese MT, Pirozzi G, Esposito F. AROS-29 is involved in adaptive response to oxidative stress. *Free Radic Res*. 2006 May;40(5):467-76.
- ⁸⁶ Anuszevska EL, Gruber BM, Koziorowska JH. Studies on adaptation to adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1997;54:597–603.