



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dottorato in

BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

TESI DI DOTTORATO

*DANNEGGIAMENTO PER VIA RADICALICA DI
PROTEINE CONTENENTI RESIDUI SOLFORATI E
FORMAZIONE DI LIPIDI TRANS IN SISTEMI MODELLO*

DOTTORANDA: Dr.ssa Immacolata Manco
RELATORE: Prof.ssa M.R. Faraone Mennella
CORRELATORE: Dr.ssa Carla Ferreri
COORDINATORE: Prof. Giuseppe D'Alessio

ANNO ACCADEMICO 2004-2005

*Alla mia famiglia
che mi ha sostenuta e
incoraggiata in ogni momento.*

RINGRAZIAMENTI

A conclusione del mio corso di Dottorato desidero esprimere la più profonda gratitudine alla Prof.ssa Maria Rosaria Faraone Mennella mio docente guida, che ha sostenuto il mio percorso scientifico con estrema disponibilità fornendomi il supporto necessario per proseguire nella ricerca.

La mia gratitudine è rivolta al Dr. Chryssostomos Chatgialoglu e alla Dr.ssa Carla Ferreri che ospitandomi nei loro laboratori e mettendomi a disposizione la loro esperienza, hanno reso possibile il raggiungimento di importanti risultati. Al mio grazie associo un sincero riconoscimento di stima ed affetto.

Ringrazio la Prof.ssa Benedetta Farina, che mi ha sempre dimostrato disponibilità ed affetto.

Ringrazio la Prof.ssa Franca Esposito mio controrelatore, che con i suoi consigli e suggerimenti, ha permesso di migliorare il contenuto della tesi.

Con immenso piacere ringrazio la Dott.ssa Anna De Maio, la Dott.ssa Angela Ferone e la Dott.ssa Armida Torreggiani alle quali mi lega un sentimento di affetto e di amicizia.

Desidero, inoltre, ringraziare tutte le persone che ho conosciuto e con cui ho collaborato nel corso di questi quattro anni, le quali hanno rappresentato un importante punto di riferimento per la mia formazione umana e professionale.

INDICE

SOMMARIO	1
SUMMARY	2
INTRODUZIONE GENERALE	3
1. Proprietà delle membrane cellulari	3
2. Influenza della geometria dei lipidi sulle proprietà di membrana	8
3. Isomerismo geometrico come naturale sistema di adattamento nei procarioti	10
4. Acidi grassi <i>trans</i> nelle cellule eucariotiche: origine esogena ed effetti biologici	12
5. Tiil radicali come intermedi in biochimica	14
6. Isomerizzazione geometrica degli acidi grassi insaturi catalizzata da tiil radicali	17
7. Sistemi organizzati: isomerizzazione <i>cis-trans</i> di acidi grassi insaturi in membrane modello	19
SCOPO DELLA TESI E FASI DELLA RICERCA	22
MATERIALI E METODI	24
1. γ- Radiolisi delle proteine in soluzione acquosa	24
<i>1.1 Formazione di radicali NO_2^{\bullet} e $CO_3^{\bullet-}$ mediante γ-radiolisi</i>	25
2. Reazione dell'Aβ(1-40) con perossinitrito	25
3. Determinazione dell'attività della RNasi A	25
4. Determinazione dell'attività enzimatica del lisozima	26
5. Elettroforesi	26
6. RP-HPLC della RNasi A	26
7. RP-HPLC della Aβ(1-40)	26
8. Digestione con tripsina della Aβ(1-40)	27
9. MALDI-TOF delle proteine	27
10. Analisi delle proteine mediante Spettroscopia Raman	27
11. Preparazione delle vescicole di DOPC contenenti proteine	27
12. Preparazione delle vescicole di POPC contenenti metionina	28
13. γ-Radiolisi della sospensione di LUVET contenente proteine	28

14. Estrazione dei lipidi	28
15. Analisi mediante gas cromatografia	29
16. Formazione di radicali •H mediante γ-radiolisi	29
17. Analisi RP-HPLC della Met in soluzione acquosa	30
18. Analisi NMR della metionina in soluzione acquosa	30
RISULTATI E DISCUSSIONE	31
DANNO RADICALICO DELLA RIBONUCLEASI A IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA	31
1. γ-Radiolisi della RNasi A in soluzione acquose	32
2. Attività enzimatica e analisi mediante SDS-PAGE	32
3. Analisi RP-HPLC e di Spettrometria di Massa	34
4. Analisi della RNasi A mediante Spettroscopia Raman	34
5. γ-Radiolisi di una sospensione DOPC-LUVET contenete RNasi A	36
DANNO RADICALICO DEL LISOZIMA IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA	39
1. Attività enzimatica e analisi mediante SDS-PAGE	39
2. Analisi del lisozima mediante Spettroscopia Raman	41
3. γ-Radiolisi di una sospensione DOPC-LUVET contenente lisozima	42
DANNO RADICALICO DELLA METIONINA IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA	44
1. γ-Radiolisi di una sospensione POPC-LUVET contenete metionina	44
DANNO RADICALICO DELLA β-AMILOIDE MEDIANTE γ-RADIOLISI E PEROSSINITRITO	47
1. γ-Radiolisi di Aβ(1-40)	49
2. Reazione della Aβ(1-40) con il perossinitrito	50
3. Digestione triptica di Aβ(1-40)	50
CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA	

ABBREVIAZIONI

RS• = tiil radicale

CLAs = acido linoleico coniugato

EFA = acidi grassi essenziali

MLV = liposomi multilamellari

SUV = piccoli liposomi unilamellari

LUVET = grandi liposomi unilamellari

FAME = metilesteri degli acidi grassi

MUFA = acidi grassi monoinsaturi

PUFA = acidi grassi poliinsaturi

SFA = acidi grassi saturi

PCs = fosfatidilcolina

DOPC = dioleoilfosfatidilcolina

POPC = palmitoilfosfatidilcolina

RNasi A = ribonucleasi pancreatica bovina

t-BuOH = tert-Butanolo

RP-HPLC = cromatografia liquida ad alta risoluzione

GC = gas cromatografia

NMR = risonanza magnetica nucleare

AD = malattia di Alzheimer

A β = β -amiloide

NO $_2$ • = radicale diossido di azoto

CO $_3$ •⁻ = radicale carbonato

SOMMARIO

Nel presente lavoro di tesi sono stati studiati sia i cambiamenti strutturali di proteine solforate esposte a radiazioni γ , sia i danni indotti dai radicali tiilici ($RS\bullet$) da esse generati, sui lipidi insaturi in vescicole unilamellari (LUVET).

In particolare, l'inattivazione di queste proteine mediante reazione con $l'\bullet H$, in condizioni di stress riduttivo, è stata connessa al danno di specifici residui solforati e alla formazione di tioli a basso peso molecolare.

Inoltre, lo studio dei cambiamenti strutturali di un'altra proteina, la β -amiloide ($A\beta$), mediante reazione con i radicali $NO_2\bullet$ e $CO_3^{\bullet-}$ ha dimostrato che nelle condizioni di analisi, la modificazione più importante è l'ossidazione della Met35, a conferma della suscettibilità di questo amminoacido all'attacco da parte di radicali, anche di natura diversa.

La γ -radiolisi di sospensioni di vescicole lipidiche (DOPC, POPC) contenenti proteine solforate (RNasi A, lisozima) e amminonoacidi solforati (Met), è stata poi utilizzata per simulare condizioni di stress radicalico e analizzare il danneggiamento dei lipidi.

I modelli biomimetici hanno dimostrato che, quando i tiil radicali sono generati in compartimenti acquosi, possono diffondere nel doppio strato lipidico e, interagendo con il doppio legame degli acidi grassi insaturi, ne catalizzano la conversione da *cis* a *trans*.

La metionina potrebbe essere, pertanto, la principale fonte di radicali tiilici; in minor misura altri residui solforati.

Questo risultato è confermato da una ridotta isomerizzazione *cis-trans* nei sistemi modello contenenti proteine prive di Met (RNasi T1) o di residui solforati in genere (istone H1).

La formazione di tiil radicali per degradazione dei residui solforati può dunque dare inizio ad un danno radicalico *tandem* che coinvolge contemporaneamente lipidi e proteine.

SUMMARY

The present thesis deals with structural changes of sulfur-containing proteins exposed to γ -radiation and the damage induced by thiyl radicals ($RS\bullet$) generated from these proteins to unsaturated lipids in large unilamellar vesicles (LUVET).

In particular, the production of $H\bullet$ atoms under reductive stress conditions was correlated to the specific damage of sulphur moieties of analyzed proteins with release of low-molecular-weight thiols.

In parallel, it was demonstrated that structural changes of β -amyloid ($A\beta$) induced by $NO_2\bullet$ and $CO_3^{\bullet-}$ radicals, involved mainly the oxidation of the Met35.

γ -Radiolysis was the source of oxidative damage in lipid vesicle suspensions (DOPC, POPC), in the presence of sulphur-containing either proteins (RNase A, lysozyme) or an amino acid (Met) that were used as source of thiyl radical damage occurring *in vivo*.

Biomimetic models of thiyl radical-catalyzed isomerization of *cis* phospholipids, were used to demonstrate that when thiyl radicals are generated in the aqueous compartment and are able to diffuse in the lipid bilayer, then their interaction with unsaturated fatty acyl chains efficiently produces *trans* double bonds. Methionine could be the main source of thiyl radicals.

Control experiments in the absence of sulphur-containing proteins (RNase T1) or by replacing sulphur-containing proteins with a protein lacking sulphur-containing amino acids, (histone H1), did not show any isomerization.

The formation of thiyl radicals by degradation of sulphur-containing amino acids could produce a *tandem* radical damage involving both protein and lipid domains.

INTRODUZIONE GENERALE

1. Proprietà delle membrane cellulari

La membrana cellulare delimita esternamente la cellula, separando il compartimento intracellulare da quello extracellulare. E' costituita da un doppio strato lipidico di circa 5 nm di spessore contenente una grande quantità di proteine e una piccola percentuale di glucidi, in forma di glicoproteine e glicolipidi (fig. 1).

Secondo il “modello a mosaico fluido”, proposto nel 1972 da Singer e Nicolson, il doppio strato lipidico è allo stato liquido-cristallino ed in esso sono immerse numerose proteine, che grazie alla fluidità della componente lipidica presentano un notevole grado di mobilità; ad esse spetta lo svolgimento della gran parte delle funzioni di membrana. Il doppio strato lipidico non ha carattere omogeneo, ma piuttosto all'interno del mosaico fluido sono presenti microdomini lipidici meno fluidi formati principalmente da sfingolipidi e colesterolo allo stato liquido-ordinato, che funzionerebbero sia da zattere di trasporto di componenti di membrana, sia da piattaforme per la genesi di segnali intracellulari, per cui in essi sono concentrate specifiche proteine.

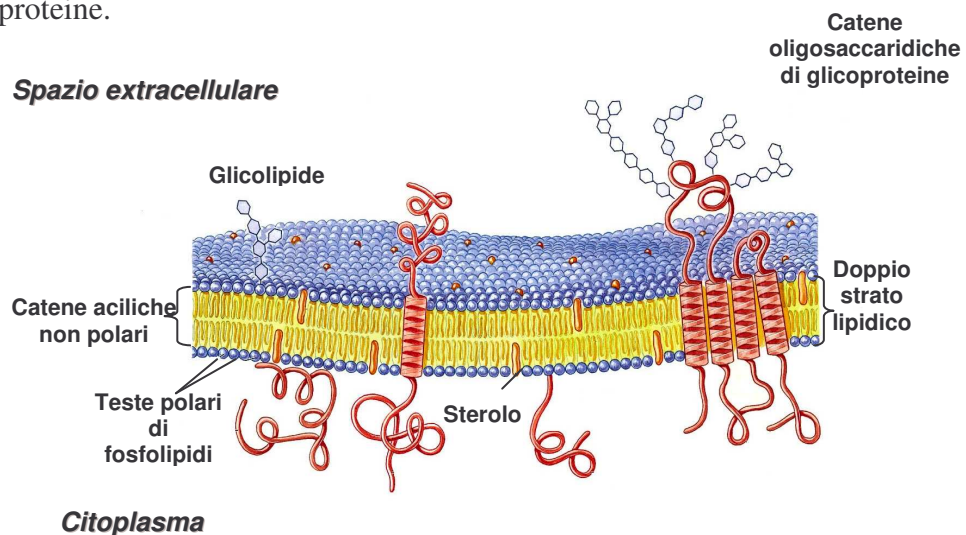
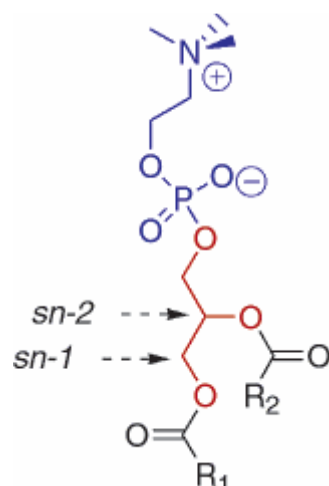


Figura 1- Organizzazione della membrana cellulare

Quindi, il concetto iniziale del modello a mosaico fluido, che prevedeva una distribuzione casuale delle proteine con ampia libertà di movimento laterale e di rotazione, è adesso rivisto a favore di un modello di

membrana in cui all'interno del doppio strato lipidico fluido esistono domini lipidici e aggregati proteici a carattere dinamico, la cui mobilità è ristretta sia dai legami lipidi-lipidi, proteina-proteina o proteina-lipidi, sia dalle interazioni delle proteine con il citoscheletro, con la matrice cellulare o con cellule adiacenti.

I lipidi costituiscono circa il 50% della massa della membrana plasmatica, e possono essere distinti in tre classi principali: fosfolipidi (70% del peso lipidico totale), colesterolo (20%) e glicolipidi (5%). I principali fosfolipidi di membrana sono: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e sfingomieline; complessivamente queste quattro specie lipidiche costituiscono oltre il 50% dei lipidi di membrana. Altri fosfolipidi, come il fosfatidilinositolo, pur presenti in piccole quantità, svolgono un ruolo cruciale nella genesi dei segnali intracellulari. I plasmalogeni, principalmente plasmalogenilcolina e plasmalogeniletanolamina, costituiscono circa il 18% dei fosfolipidi delle membrane, con preferenza per le cellule eccitabili: cellule miocardiche, muscolari striate e cellule nervose. I fosfolipidi svolgono una funzione strutturale, costituendo l'impalcatura fondamentale della membrana plasmatica; una funzione di barriera semipermeabile, che si lascia attraversare liberamente dalle molecole liposolubili, ma risulta impenetrabile da quelle idrosolubili; una funzione metabolica, in quanto rappresentano una fonte di mediatori lipidici, che possono essere mobilizzati in risposta a specifici stimoli¹. I fosfolipidi sono molecole anfipatiche, cioè manifestano proprietà sia idrofobiche che idrofiliche. La natura anfipatica è dovuta alla presenza di un'estremità polare idrofila (testa), formata da un gruppo fosfato legato mediante un legame estereo, ad un alcol e ad un'estremità apolare (coda) costituita dalle catene carboniose degli acidi grassi saturi e insaturi. In figura 2 è mostrata la struttura generale della L- α -fosfatidilcolina (PCs). Lo scheletro formato da L-glicerolo presenta quindi, i due acidi grassi R¹ ed R² nelle posizioni 1 e 2, rispettivamente, mentre la posizione 3 è occupata dal gruppo polare. Nella PCs le due code di acidi grassi possono essere differenti; in natura, spesso, le lecitine possono contenere residui saturi o insaturi in percentuali differenti come mostrato nella tabella di figura 2.



Lecitina di tuorlo d'uovo

Palmitoil	32.0 %
Stearoil	14.1 %
Oleoil	21.0 %
Vaccenoil	1.2 %
Linoleoil	20.0 %
Arachidonoil	4.8 %

Figura 2 - Struttura del L- α -fosfatidilcolina (PCs) e la composizione in residui di acidi grassi della lecitina di tuorli d'uovo.

La composizione in acidi grassi è tipica di ogni specie, ogni tessuto ed ogni organello all'interno di un dato tipo cellulare ed influenza notevolmente la struttura, la funzione e le proprietà della membrana. In tabella A sono riportati i più comuni acidi grassi presenti nei fosfolipidi di membrana insieme alla numerazione che consente di individuare la lunghezza della catena carboniosa ed il numero e la posizione delle insaturazioni.

Tabella A - Nomenclatura e numerazione degli acidi grassi più comuni

Nome	Lunghezza:insaturazione
Laurico	12:0
Miristico	14:0
Palmitico	16:0
Palmitoleico	16:1 (<i>cis</i> Δ -9)
Stearico	18:0
Oleico	18:1 (<i>cis</i> Δ -9)
Vaccenico	18:1 (<i>cis</i> Δ -11)
Linoleico	18:2 (<i>cis</i> Δ -9,12)
γ -Linolenico	18:3 (<i>cis</i> Δ -6,9,12)
α -Linolenico	18:3 (<i>cis</i> Δ -9,12,15)
Arachidico	20:0

Nelle membrane biologiche delle cellule eucariotiche, i fosfolipidi sono costituiti da acidi grassi insaturi, in particolare: acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e poliinsaturi (PUFA) con i doppi legami nella configurazione *cis*, ovvero in quella configurazione che porta i sostituenti agli atomi di carbonio insaturi dallo stesso lato rispetto al doppio legame. Più modernamente e per maggiore chiarezza, la nomenclatura *cis* e *trans* è stata sostituita da quella Z ed E, ma nel caso dei lipidi è più comune ritrovare la dicitura classica. Un esempio è riportato in figura 3 dove la struttura **a)** rappresenta l'acido grasso saturo, mentre la struttura **c)** rappresenta l'isomero *cis* dell'acido octadecenoico, noto con il nome comune di acido oleico (C18:1). La geometria dell'insaturazione è di grande importanza per la struttura dell'acido grasso. Infatti, la geometria *cis* induce un angolo di 30° nella disposizione spaziale della catena idrocarburica dell'acido grasso. Tale ripiegamento limita l'impaccamento dei fosfolipidi nel formare il doppio strato, riducendo lo stato ordinato e conferendo una caratteristica fluidità alla membrana stessa^{2,3}.

In particolari condizioni, i doppi legami possono assumere la configurazione *trans*, non comune in natura, nella quale i sostituenti all'atomo di carbonio sono posizionati da parti opposte sugli atomi di carbonio dell'insaturazione (fig. 3**b**). Negli acidi grassi *trans* l'angolo di legame è più ampio rispetto a quello dei doppi legami *cis*. Questo risulta in una forma lineare della catena carboniosa, più simile a quella degli acidi grassi saturi piuttosto che agli acidi grassi insaturi con doppi legami *cis*. La configurazione *trans* permette una maggiore interazione tra catene adiacenti, producendo l'effetto di irrigidimento delle membrane con aumento del parametro di temperatura di transizione di fase (T_m), così come descritto nel prossimo paragrafo.

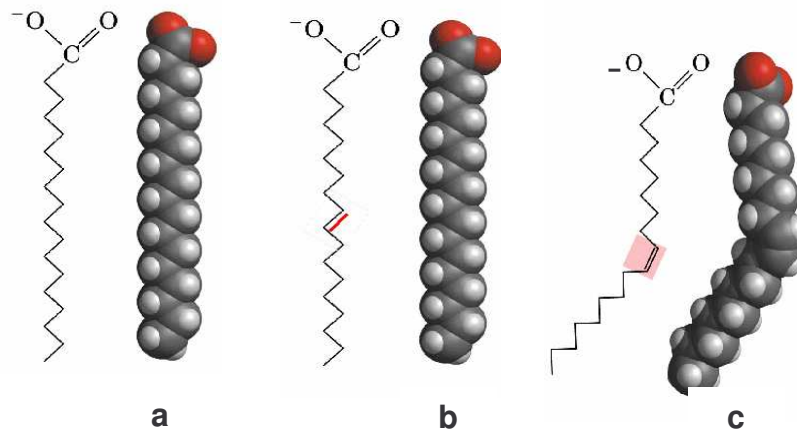


Figura 3 - a) acido stearico, **b)** acido elaidico ed il corrispondente acido grasso saturo **c)** acido oleico.

E' importante notare, che la geometria del doppio legame negli acidi grassi ha importanza biologica in quanto il tipo e la posizione del doppio legame è fondamentale per le interazioni enzimatiche. Pertanto esso è formato, nella biosintesi lipidica, dall'attività regiospecifica e stereoselettiva delle desaturasi⁴ che formano il doppio legame esclusivamente in posizioni prestabilite e nella geometria *cis*. Le desaturasi agiscono insieme agli enzimi elongasi nella biosintesi lipidica. L'alternarsi di attività di elongasi e desaturasi rappresenta la via biosintetica di trasformazione degli acidi grassi essenziali (EFA, essential fatty acids), acido linolenico e linoleico.

Essi devono essere assunti con la dieta e sono i precursori della serie degli acidi grassi omega-3 (o n-6) ed omega-6 (o n-6), rispettivamente, presentano i doppi legami in configurazione *cis*.

La generalità della geometria *cis* degli acidi grassi presenta alcune eccezioni, per esempio, nel caso degli acidi grassi coniugati, quali gli acidi linoleici coniugati (CLAs); vi sono diversi isomeri (ad esempio, il *9cis,11trans*, *9trans,11trans*, *10trans,12cis*) che sono ritrovati nei cibi derivanti da animali ruminanti.

2. Influenza della geometria dei lipidi sulle proprietà di membrana

Come detto in precedenza, un'evidente differenza tra la geometria *cis* e quella *trans* è che nel primo caso la struttura presenta un ripiegamento nella catena carboniosa del lipide, mentre nel secondo caso la catena acilica è distesa rendendo il lipide insaturo più simile ad un acido grasso saturo. Poiché i fosfolipidi sono i principali componenti della membrana, la loro struttura regola l'organizzazione sopramolecolare e le proprietà del doppio strato¹.

Escludendo il contributo delle teste polari e della lunghezza delle catene degli acidi grassi e considerando esclusivamente il ruolo dell'insaturazione; una regola generale sull'assemblaggio dei lipidi prevede che più basso è il numero dei doppi legami più alto è l'ordine di impaccamento dei lipidi. Quindi, la rigidità con cui i lipidi si assemblano segue l'ordine: saturi > *trans*-insaturi > *cis*-insaturi, mentre l'ordine delle proprietà di membrana, permeabilità e fluidità, è invertito, quindi i residui *cis*-insaturi danno un rilevante contributo a mantenere il valore "ideale". Tra le proprietà fisiche che meglio rappresentano le differenze strutturali vi è la temperatura di transizione di fase (T_m), che è la temperatura a cui avviene il passaggio dalla fase di gel a quella liquido-cristallina. Per esempio, nel caso della PCs (fig. 2, pag. 5) fissando l'acido grasso R^1 come C16:0 (acido palmitico), la variazione di R^2 attraverso la serie C18:0 (acido stearico), 9*trans*-C18:1 (acido elaidico), 9*cis*-C18:1 (acido oleico), porta i valori di T_m a 41,5, 35 e -3°C rispettivamente¹. Quindi, a temperatura fisiologica, i residui *cis*-insaturi garantiscono una maggiore fluidità del doppio strato lipidico. I lipidi poliinsaturi possono produrre effetti ancora più rilevanti sull'abbassamento della temperatura della fase di transizione da gel a liquido cristallino nelle membrane naturali, garantendo così il movimento delle catene lipidiche dovuto all'arrangiamento del loro doppio legame⁵. Recentemente, l'alterazione delle proprietà fisiche delle membrane dovute alla presenza di residui di acidi grassi *trans* è stata studiata in connessione ad alcuni effetti biologici. Infatti, è stata ipotizzata una possibile azione "antiossidante" degli isomeri *trans* in quanto è stato provato che le vescicole di PCs, contenenti gli isomeri *trans* dei PUFA, vengono ossidate meno efficientemente dei corrispondenti lipidi *cis*⁶.

Le differenti proprietà, in termini di dinamica molecolare, comportamento termotropico di fase, “fluidità”, mobilità laterale e permeabilità sono state valutate studiando vescicole di PCs contenenti residui saturi (C18:0) ed isomeri *cis* e *trans* di C18:1 e C18:2⁷. Nuovamente, tutti gli esperimenti hanno dimostrato che gli acidi grassi *trans* conferiscono alle membrane proprietà più simili a quelle degli acidi grassi saturi indicando che il doppio legame *trans* induce un impacchettamento più rigido di quello dei residui *cis*. Recentemente è stato dimostrato che la geometria *cis* e *trans* è rilevante per le dimensioni del compartimento delimitato dal doppio strato lipidico. Infatti, fosfolipidi contenenti isomeri *trans* portano ad una riduzione di circa il 30% delle dimensioni, rispetto al compartimento delimitato da un analogo fosfolipide avente geometria *cis*⁸. Inoltre, ricerche condotte su modelli di membrana contenenti differenti acidi grassi *trans*-monoinsaturi (C14:1, C16:1 e C18:1), hanno dimostrato che i *trans* isomeri mostrano per il colesterolo un’affinità maggiore (40-80%) rispetto ai loro analoghi *cis*, probabilmente dovuta alla migliore interazione tra la catena acilica *trans* distesa, e le molecole di colesterolo⁹. Allo stesso modo, il comportamento della rodopsina, proteina appartenente alla famiglia dei recettori leganti la proteina G, è influenzato dalla geometria *trans*. Infatti, è stato osservato, in modelli di membrana, che i livelli di attività della rodopsina diminuiscono particolarmente a temperature basse (5°C) dove i *trans* isomeri sono nella fase di gel mentre gli isomeri *cis* sono allo stato fluido.

Ulteriori informazioni degli effetti funzionali dei *trans* vengono da studi sull’attività di proteine e di trasporto ionico¹⁰⁻¹⁴.

Tutti questi dati indicano che, quando in una membrana cellulare costituita da lipidi *cis* vengono incorporati isomeri *trans*, l’assemblaggio lipidico può sopravvivere anche se vengono introdotte delle modificazioni permanenti. Il minimo contenuto di isomeri *trans*, nelle cellule eucariotiche, al quale avvengono cambiamenti delle proprietà chimico-fisiche delle membrane o perturbazioni nei sistemi biologici, è attualmente oggetto di ricerca.

3. Isomerismo geometrico come naturale sistema di adattamento nei procarioti

Nelle cellule eucariotiche, durante i processi di biosintesi, gli acidi grassi insaturi vengono sintetizzati come isomeri *cis*. Pochi anni fa è stato scoperto che alcuni microrganismi sono formati, oltre che da lipidi *cis*, anche dai corrispondenti isomeri *trans*¹⁵.

Gli isomeri *trans*, non derivano da sintesi *de novo*, sono presenti anche in cellule non in crescita ed incrementano quando le colture batteriche sono esposte ad agenti chimici ed ambientali. Analisi microbiologiche, di determinazione della struttura degli isomeri *trans* presenti nei lipidi batterici, hanno stabilito che nei microrganismi delle specie *Pseudomonans* e *Vibrio*, sono presenti isomeri geometrici e non posizionali ottenuti mediante una specifica reazione enzimatica catalizzata dalla *cis-trans* isomerasi (cti)¹⁶⁻¹⁹. Esperimenti di clonaggio e di sequenziamento genico hanno mostrato, che la cti, in *Pseudomonans putida P8* e *P. putida DOT-T1E* presenta una sequenza segnale nella regione idrofobica N-terminale che viene rimossa proteoliticamente quando l'enzima migra nello spazio periplasmatico¹⁶⁻¹⁹.

Il confronto tra le sequenze amminoacidiche delle diverse cti identificate, ha permesso di classificarle come proteine eminiche, tipo citocromo C²⁰. Recentemente è stato stabilito che la struttura del doppio legame *cis* è coinvolta nel raggiungimento dello stato di transizione nel meccanismo di formazione dell'isomero *trans* nella reazione catalizzata dalla cti.

Il meccanismo proposto prevede il coinvolgimento del gruppo eme nella transizione sp^2-sp^3 in presenza dello ione ferro (Fe^{3+}) che rimuoverebbe un elettrone dal doppio legame^{16,17}. La trasformazione avviene direttamente sul fosfolipide ed inoltre, la cti è indipendente dalla presenza di fattori addizionali, come ATP, NADPH e O_2 ¹⁹. La distruzione dei motivi leganti l'eme e le mutagenesi sito-dirette, hanno dimostrato la perdita dell'attività isomerasica in cti²⁰.

La conversione enzimatica che avviene nelle membrane di alcuni batteri è un importante meccanismo di adattamento che si attiva in condizioni

ambientali sfavorevoli: in presenza di composti tossici, di alte temperature e di shock osmotico²⁰⁻²².

Al ristabilirsi delle normali condizioni, lo stesso enzima, può lavorare in senso opposto rigenerando la geometria *cis* dei lipidi di membrana. Infatti, quella descritta è una risposta di adattamento a breve termine, che nei batteri ha un immediato effetto sulla permeabilità e sulla fluidità della membrana ed è basata sulla conversione delle strutture *cis*, naturalmente presente negli acidi grassi, nei corrispondenti isomeri *trans* e viceversa.

E' importante notare, che cti è il solo sistema enzimatico noto capace di cambiare la geometria dei doppi legami dei fosfolipidi, mentre un tale sistema enzimatico non e' stato individuato negli eucarioti in cui vengono sintetizzati solo acidi grassi con doppi legami *cis*.

Ricerche nutrizionali suggeriscono che la presenza di acidi grassi *trans* negli organismi superiori, in particolare nell'uomo, può essere di natura esogena, mediante l'assunzione di cibo, come descritto nel paragrafo successivo. Tuttavia, recentemente, studi chimici e biochimici, sostengono l'ipotesi di un meccanismo endogeno di formazione di lipidi *trans* che coinvolge specie radicaliche.

La distinzione tra formazione endogena di *trans* lipidi dovuta all'attacco di radicali liberi e la supplementazione mediante la dieta è un argomento ancora aperto che coinvolge il nuovo campo della lipidomica, che ha lo scopo di fornire un'analisi comprensiva dei lipidi di membrana, di tutto il *pattern* lipidico e delle sue modificazioni negli organismi viventi²³.

4. Acidi grassi *trans* nelle cellule eucariotiche: origine esogena ed effetti biologici

Negli ultimi anni, ha suscitato grande interesse il fatto che gli acidi grassi *trans* possono essere contenuti nel cibo. Per esempio, la percentuale di lipidi *trans* nel tessuto adiposo umano, è compresa tra 0,5-3,8% e ne sono state determinate le correlazioni con gli indici dietetici in differenti paesi²⁴. Poiché nelle cellule eucariotiche non sono noti meccanismi in grado di formare *trans* lipidi mediante vie metaboliche enzimatiche, è stato assunto che, questi composti potrebbero essere forniti da fonti esogene.

Infatti, la carne, il latte e i suoi derivati contengono ~2-8% di residui di acidi grassi *trans*^{25,26} dovuti alla biodegradazione microbica dei lipidi che avviene nel primo stomaco dei ruminanti^{25,27}.

Ulteriori fonti di acidi grassi *trans* sono state individuate, in particolare, nei paesi industrializzati che fanno un elevato consumo di cibi contenenti grassi e oli manipolati mediante processi di parziale idrogenazione o deodorizzazione²⁷ e di cibi rapidamente essiccati ad alte temperature²⁸.

Molti grassi vegetali e oli consumati negli Stati Uniti, in Europa e in alcuni paesi dell'America Latina sono lievemente o moderatamente idrogenati. Per esempio, gli americani e i cittadini dei paesi del Nord Europa consumano quotidianamente più di 12g di questi grassi.

Allo stesso tempo, in diversi paesi sono stati accettati gli effetti dannosi attribuibili agli isomeri *trans* sulla salute. Tali effetti spaziano dall'inibizione metabolica della biosintesi lipidica ad un coinvolgimento in malattie cardiovascolari fino all'influenza sullo sviluppo fetale e neonatale²⁹.

A seguito di tali studi negli USA è stata promulgata una nuova legge, la quale stabilisce che dal 2006 sulle confezioni di cibo dovrà essere indicato il contenuto di *trans* nei fattori nutrizionali³⁰.

Le regolamentazioni europee non tengono ancora in conto tale questione, sebbene i produttori europei siano stati i primi a immettere sul mercato margarina priva di isomeri *trans*.

Dati recenti dimostrano che i lipidi *trans* durante il metabolismo cellulare possono seguire due vie:

1) Interazione con specifici enzimi, analogamente a quanto accade per gli isomeri naturali, in modo che essi possano essere incorporati nelle membrane, prendere parte alle reazioni a cascata dei lipidi e dare origine a molecole differenti capaci di influenzare le proprietà e le funzioni cellulari³¹⁻³³. A tal proposito, gli acidi *trans* monoenoici sono riconosciuti come una classe distinta, con proprietà intermedie tra gli acidi saturi e *cis*-monoinsaturi e sono particolarmente specifici per l'esterificazione a fosfolipidi³⁴. Altri esempi, sono i substrati poliinsaturi, così come il mono-14*trans*, isomero dell'acido arachidonico, che è stato trovato reagire con il citocromo P450 epossigenasi, enzima monoossigenasi localizzato nei microsomi di fegato di ratto; ciò mostra che il naturale *pathway* può lavorare e produrre un composto non naturale³⁵.

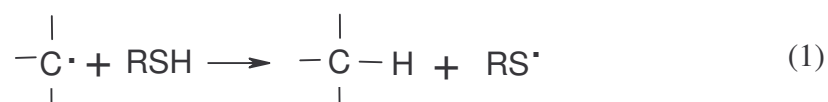
2) Inibizione dei *pathways* enzimatici dei lipidi. L'isomero mono-14*trans* dell'acido arachidonico può anche inibire la sintesi del tromboxano B₂ e quindi prevenire l'aggregazione piastrinica nel ratto³⁶.

Saggi *in vitro* di desaturazione e di allungamento degli isomeri mono-*trans* dell'acido linoleico sui microsomi di fegato di ratto hanno dimostrato che gli isomeri 9*cis*, 12*trans* sono meglio desaturati, mentre gli isomeri 9*trans*, 12*cis* sono meglio allungati³⁷. Un recente studio sull'attività degli isomeri *tutto-trans* dell'acido arachidonico (5*trans*, 8*trans*, 11*trans*, 14*trans*-C20:4) del coniglio, mostra che questo isomero non naturale può specificamente inibire la risposta indotta dai fattori di aggregazione piastrinica³⁸.

5. Tioli radicali come intermedi in biochimica

Negli organismi viventi, le funzioni tioliche sono presenti in considerevoli quantità. I livelli intracellulari di tioli non proteici, per esempio il glutatione, (GSH), sono circa 5-10mM, mentre il livello totale di proteine contenenti SH può essere uguale o eccedere quello del GSH³⁹. Per esempio, le metallotioneine (MTs), famiglia di proteine a basso peso molecolare (6000-7000Da) localizzate nel citosol delle cellule eucariotiche, formano una porzione significativa del totale delle proteine contenenti tioli all'interno delle cellule. Nelle MTs le cisteine costituiscono circa 23%-38% degli amminoacidi⁴⁰. Il gruppo tiolico del principale amminoacido solforato, cisteina, in condizioni fisiologiche è presente in forma non ionizzata essendo il pKa del tiolo compreso tra 8-9. Nelle proteine il valore di pKa può cambiare molto, come nel caso delle tioredoxine⁴¹. Tali variazioni possono alterare lo stato di ionizzazione delle molecole e quindi le reazioni che coinvolgono i tioli. Uno dei gruppi funzionali più reattivi trovato nelle proteine è l'anione tiolato (RS^-). RS^- può reagire come nucleofilo ed attaccare i ponti disolfurici, $R_1-S-S-R_2$, spostando un atomo di zolfo e formando un nuovo disolfuro, $R-S-S-R_1$ o $R-S-S-R_2$. Questa reazione è uno scambio di equivalenti redox tra differenti tioli/disolfuri in quanto serve ad ossidare un tiolo (RSH), riducendo un altro disolfuro ($R_1-S-S-R_2$)^{42,43}.

La rigenerazione ossidativa dei ponti disolfurici è implicata in molti processi biologici tra cui: catalisi enzimatica, protezione contro danni ossidativi, stabilizzazione di proteine, regolazione di attività biologica e nel processo di *folding* delle proteine catalizzato dalla disolfuro isomerasi (PDI) ^{44,45}. Recentemente, è stato dimostrato che la stessa reazione è coinvolta nella trasduzione del segnale e nella regolazione dei fattori di trascrizione redox⁴⁶. Inoltre, a causa del loro elevato potere riducente, i tioli, partecipano a numerosi processi redox cellulari agendo da elettroni-donatori. Essi trasferiscono facilmente un atomo di idrogeno ad un radicale centrato all'atomo di carbonio generato dalla scissione emolitica del legame C-H, che può essere indotto da enzimi, radiazioni e agenti tossici⁴⁷, così come mostrato nella seguente equazione:

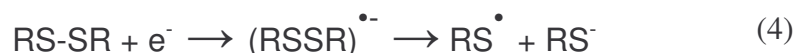


Tale reazione ($K= 10^6\text{-}10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) conosciuta in radiobiologia come “repair reaction”, interviene nella riparazione del DNA secondo l’equazione 2:



Tuttavia, solo agli inizi degli anni novanta è stato dimostrato che, in determinate circostanze, la reazione 2 può essere reversibile e che quindi i tiil radicali ($\text{RS}\cdot$), possono indurre danni ad altre biomolecole, come amminoacidi, carboidrati e molecole lipidiche mediante estrazione di un atomo di idrogeno dai legami C-H attivati^{48,49}. Tale processo è stato definito “damaging reaction” e nel caso degli acidi grassi poliinsaturi può essere considerato lo stadio iniziale della ben nota perossidazione lipidica. Quanto detto, evidenzia come i tioli RSH, se da un lato esercitano un effetto radio-protettivo e inibiscono la propagazione di reazioni radicaliche a catena, dall’altro generano, nel processo di riparazione, altre specie radicaliche, i tiil radicali ($\text{RS}\cdot$), potenzialmente dannose per importanti biomolecole.

D’altra parte, i tiil radicali sono coinvolti in diversi meccanismi biologici e sono fondamentali per l’attività di alcuni enzimi quali la ribonucleotide reduttasi e la piruvato liasi⁵⁰. Nei sistemi biologici, gli $\text{RS}\cdot$, possono essere generati mediante diversi meccanismi a partire dalle funzioni tioliche normalmente presenti nelle biomolecole. Gli $\text{RS}\cdot$ possono essere generati dai ponti disolfurici secondo le reazioni 3, 4.

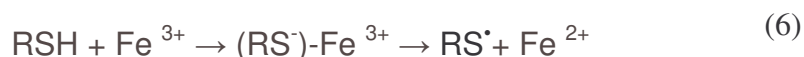


Nel primo caso il legame S-S può essere direttamente rotto dall’attacco di un radicale libero. Nel secondo caso il processo di riduzione da parte di un singolo e^- genera un radicale anione che generalmente decade immediatamente in tiolato e tiil radicale⁵¹. I tiil radicali possono essere prodotti da tutte le

funzioni tioliche, inclusi i gruppi tioeteri e tioesteri, mediante fotolisi che causa omolisi diretta del legame C-S come mostrato per i tioeteri nell'equazione 5.



Inoltre, il Fe^{3+} e il Cu^{2+} possono ossidare i tioli secondo l'equazione 6 e produrre tiil radical⁵²⁻⁵⁴.



I RS^\bullet sono considerati specie poco reattive a causa della loro inattivazione indotta dalla dimerizzazione a disolfuro (reazione 7).



Tuttavia, *in vivo* i livelli attesi di RS^\bullet sono bassi e la probabilità dei radicali di incontrarsi è scarsa. Nei sistemi biologici, gli RS^\bullet sono, efficientemente bloccati in fase acquosa, dall'anione ascorbato (AscH^-) che rigenera i composti tiolici e forma la specie ascorbato radicale anione ($\text{Asc}^{\bullet-}$)⁵¹ come mostrato nella seguente equazione 8.



Le specie radicaliche all'atomo di S, la cui reattività è ben nota in chimica organica, possono condurre efficientemente due processi: l'addizione reversibile al doppio legame e l'H estrazione da posizioni attivate come l'H bisallilico⁵⁵⁻⁵⁷. Solo recentemente queste due reazioni sono state prese in considerazione per spiegare importanti processi biologici. In questo contesto, i lipidi sono importanti bersagli delle trasformazioni mediate da tiil radicali, poiché la loro struttura ha siti attivi reattivi come il doppio legame C=C e le posizioni *bis* alliliche.

6. Isomerizzazione geometrica degli acidi grassi insaturi catalizzata da tiil radicali

E' ben noto che l'isomerizzazione *cis-trans* del doppio legame è catalizzata da radicali liberi del tipo RS^\bullet , RSe^\bullet , RSO_2^\bullet , NO_2^\bullet , R_3Sn^\bullet , e $(Me_3Si)_3Si^\bullet$ e atomi (Br^\bullet o I^\bullet)^{58,59}.

In particolare, l'aggiunta di una specie radicalica ad un olefina *cis* o *trans* è accompagnata da isomerizzazione secondo il meccanismo generale riportato nella figura 4.

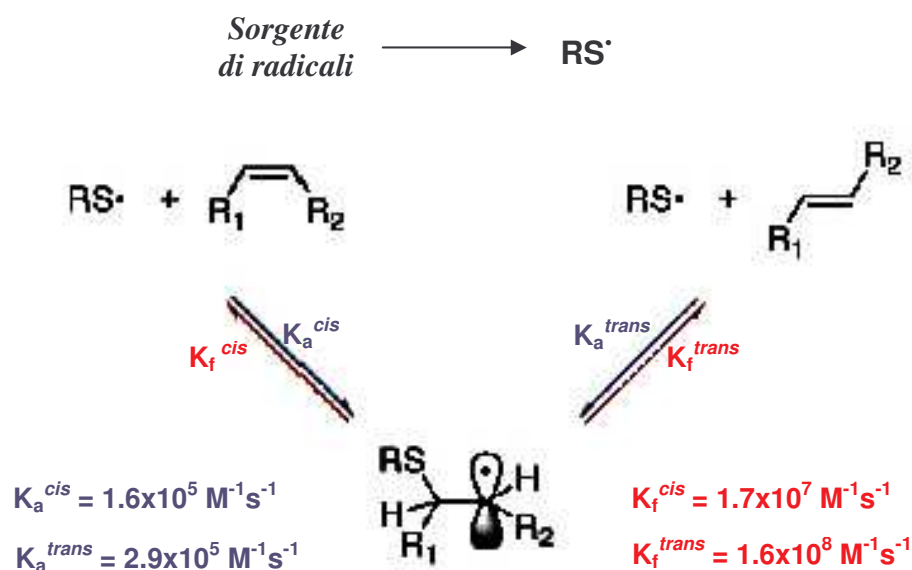


Figura 4 - Meccanismo di reazione di *cis-trans* isomerizzazione catalizzato da radicali liberi centrati all'atomo di zolfo.

Il radicale RS^\bullet si addiziona reversibilmente al doppio legame del composto monoinsaturo formando un addotto radicalico, il cui legame carbonio-carbonio può ruotare liberamente. Da tale addotto si può ottenere una frammentazione in beta del gruppo solforato ovvero si può rigenerare il doppio legame. Nella frammentazione possono essere formati sia l'isomero *cis* che *trans*. L'isomero *trans* è termodinamicamente più stabile di $\sim 0,6-1 \text{ kcal mol}^{-1}$ di quello *cis*, quindi la composizione finale, nel caso degli acidi grassi monoinsaturi, è circa 80:20 indipendentemente dall'isomero di partenza⁶⁰.

E' importante notare che: **1)** Il radicale RS^\bullet agisce come catalizzatore per l'isomerizzazione *cis-trans*; **2)** gli isomeri posizionali non possono essere formati come prodotti di reazione, perché il meccanismo non consente lo

spostamento del doppio legame. A tal riguardo, il significato biologico di questa trasformazione è evidente se si considerano le specie radicaliche del tipo tiil radicali (RS^\bullet) e il diossido di azoto (NO_2^\bullet). Entrambe possono catalizzare l'isomerizzazione *cis-trans* dei lipidi insaturi in varie condizioni sperimentali, soprattutto in condizioni biomimetiche. Quando si considerano substrati poliinsaturi, il meccanismo di isomerizzazione avviene mediante un processo multi-stadio, così come descritto nella figura 6 per il linoleato⁶¹.

E' interessante notare, che l'isomerizzazione *cis-trans* dei doppi legami degli acidi grassi insaturi catalizzata da tiil radicali è efficiente anche in presenza di una concentrazione di ossigeno superiore a 0,3mM, che è poco più alta di quella trovata nei tessuti ben ossigenati. Come riportato nella figura 5, l'equilibrio della ben nota reazione del tiil radicale con l'ossigeno, è spostato verso sinistra, mentre la reazione dell'addotto radicalico con le molecole di ossigeno è poco importante data la velocità di β -eliminazione del tiil radicale dall'addotto, che è, $K_f^{trans} \gg K_f^{cis} \gg K_{ossigeno} [O_2]$ ⁵¹.

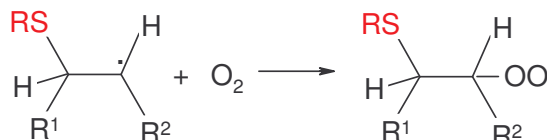


Figura 5- Reazione dell'ossigeno con l'intermedio radicalico generato nel processo di isomerizzazione

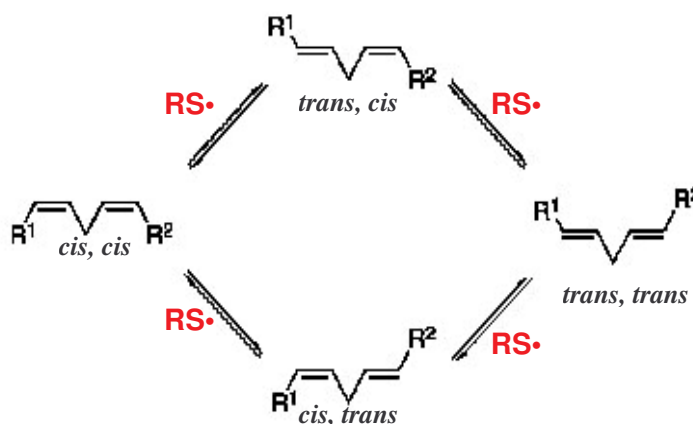


Figura 6- Isomerizzazione *cis-trans* del linoleato catalizzata da tiil radicali.

7. Sistemi organizzati: isomerizzazione *cis-trans* di acidi grassi insaturi in membrane modello

I liposomi, sono universalmente accettati come modelli per la membrana cellulare (fig. 7). Essi sono formati da fosfolipidi che si aggregano ad una determinata concentrazione, detta CAC, concentrazione di aggregazione critica. Si tratta di un'aggregazione sferoidale chiusa, con all'interno una cavità che include l'ambiente acquoso, presente anche all'esterno.

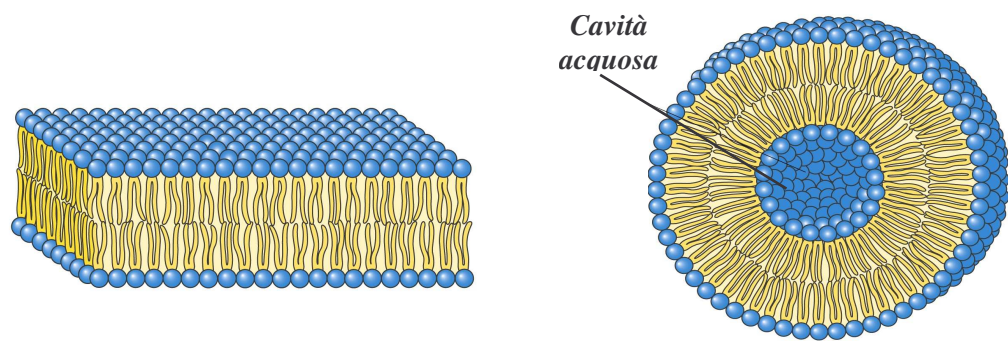


Figura 7 – Struttura del liposoma

I liposomi vengono formati da uno strato secco di fosfolipidi che, messi a contatto con l'acqua, spontaneamente si organizzano nella forma di liposomi multilamellari (MLV), costituiti da doppi strati concentrici separati da un compartimento acquoso; a seconda del numero di strati il diametro di questi liposomi varia da 0,4 a 3,5 μm , quello della cavità acquosa da 0,10 a 0,15 μm . Variando la metodologia di preparazione si possono ottenere:

- ◆ Piccole o larghe vescicole unilamellari (SUV), piccoli liposomi unilamellari, formati da un unico doppio strato fosfolipidico e da una sola cavità acquosa. Il loro diametro medio è compreso tra 20 e 50nm.

- ◆ Larghe vescicole unilamellari (LUV), liposomi unilamellari formati da un unico doppio strato lipidico, di dimensioni maggiori rispetto a quello che caratterizza le SUV. Il loro diametro è compreso tra 0,1 e 1 μm .

- ◆ Vescicole di evaporazione a fase inversa (REV), grandi vescicole unilamellari o oligolamellari con dimensioni simili alle LUV.

In particolare, le LUV e le SUV sono frequentemente utilizzate, come modello per l'analisi delle reazioni che coinvolgono lipidi, come la

perossidazione lipidica e gli effetti degli antiossidanti contro processi radicalici a catena^{62,63}.

Nel *core* idrofobico di queste membrane modello, i doppi legami delle catene aciliche dei fosfolipidi hanno una precisa disposizione, che è regolata dall'arrangiamento sopramolecolare delle teste polari e delle code apolari. Nella figura 8 è rappresentata una parte di vescicola formata da differenti tipi di acidi grassi insaturi.

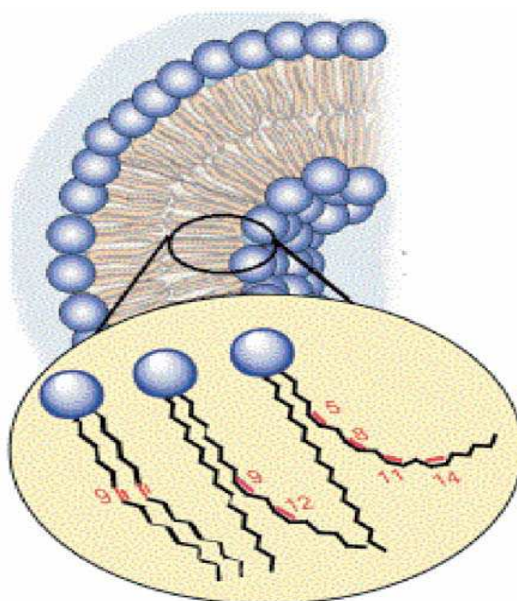


Figura 8 - Membrana modello con differenti residui di acidi grassi

Gli acidi grassi insaturi sono collocati nel doppio strato lipidico in modo che il doppio legame, con il più alto numero di atomi di carbonio, sia posizionato più in profondità rispetto al bordo del doppio strato. Questo significa, che i doppi legami non sono equivalenti e che quando la specie radicalica diffonde dalla fase acquosa al doppio strato, essi sono attaccati con una sequenza specifica; a partire dai doppi legami a numero di carbonio più basso. In questo scenario, bisogna considerare tre aspetti per esaminare la reattività di questo sistema non omogeneo verso i radicali liberi:

- ◆ le proprietà dei tioli che influenzano la distribuzione tra il compartimento acquoso e quello lipidico all'interno della vescicola: composti idrofilici, lipofilici e amfilici possono, quindi, esibire comportamenti differenti. In particolare, molecole biologiche come cisteine, glutatione, acidi

lipoico e diidrolipoico, metionina e le proteine solforate sono molto importanti per lo studio dei processi radicalici nei sistemi cellulari^{61,64, 65}.

◆ Il coefficiente di partizione del composto tiolico aggiunto al sistema, che influenza la distribuzione delle specie reattive nei due compartimenti, acquoso e lipidico.

◆ La localizzazione della fase di iniziazione, ovvero il punto in cui avviene la formazione della specie radicalica iniziale capace di estrarre un atomo di idrogeno dal gruppo tiolico.

Riguardo all'ultimo punto, la formazione del radicale iniziatore che avviene esclusivamente nel compartimento acquoso può essere ottenuta mediante tre metodologie: **1)** decomposizione termica di un azocomposto idrofilico^{62,63} che può avere anche un importante significato biologico simulando la reazione di riparazione dell'idrogeno che viene donato dai tioli, così come la cisteina e il glutathione, verso i radicali centrati all'atomo di carbonio⁶⁶; **2)** fotolisi diretta dei composti tiolici sciolti nel compartimento acquoso; **3)** la γ - radiolisi di sistemi acquosi⁶⁷ che è la metodologia da noi usata per generare radicali e di cui sarà discusso nei paragrafi successivi. L'irradiamento con radiazioni γ è una metodologia ben nota per generare radicali in un compartimento acquoso⁶⁷.

SCOPO DELLA TESI E FASI DELLA RICERCA

L'importanza del processo di isomerizzazione *cis-trans* dei lipidi in campo biologico è stata per la prima volta sottolineata dal gruppo del Dott. Chatgililoglu nel 1999, presso il CNR di Bologna. Il meccanismo di questa trasformazione è stato studiato mediante l'impiego di diversi tipi di fosfolipidi e in sistemi modello. Inoltre, tutte le ricerche svolte su questo argomento hanno dimostrato che i più efficienti agenti isomerizzanti sono i tiil radicali.

Nel presente lavoro di tesi è stato studiato un modello biomimetico in cui si ha la formazione di radicali tiilici (RS•) in soluzione acquosa, in seguito al danneggiamento di proteine contenenti amminoacidi solforati. Questi radicali sono in grado di diffondere nel doppio strato lipidico e di interagire con le catene aciliche degli acidi grassi insaturi producendo un'efficiente conversione dei doppi legami da *cis* a *trans*. Tale modello dimostra, per la prima volta, che un danno radicalico può coinvolgere contemporaneamente il dominio proteico e quello lipidico. Inoltre, la presenza di lipidi *trans* può essere considerata un *marker* del danneggiamento proteico.

Come fonte di radicali tiilici sono state scelte due proteine ben note e, per alcuni aspetti, simili: la ribonucleasi A e il lisozima, oltre alla Met la cui degradazione è stata studiata in correlazione al danneggiamento delle due proteine in esame.

Nella fase iniziale, il lavoro di tesi ha riguardato la messa a punto di un protocollo di analisi per valutare la capacità delle singole proteine, in condizioni di stress radicalico, di indurre *cis-trans* isomerizzazione in membrane modello. Le due proteine, esposte a radiazioni γ , sono state sottoposte ad analisi biochimiche e cinetiche e sono stati condotti studi strutturali mediante tecniche spettroscopiche. Delle due proteine sono state messe in evidenza le principali differenze ed analogie di comportamento.

La ricerca è proseguita con l'analisi e l'identificazione dei principali siti di danneggiamento all'interno delle proteine in esame e alla descrizione del probabile meccanismo di degradazione che porta alla formazione di tiil radicali e alla conseguente isomerizzazione *cis-trans* dei lipidi insaturi.

Nella fase finale del lavoro di tesi, presso il laboratorio della Dott.ssa Houée-Levin (Orsay, Francia) sono state studiate le modificazioni indotte dai radicali diossido di azoto (NO_2^\bullet) e carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) sulla β -amiloide, la proteina coinvolta nella patologia nota come malattia di Alzheimer. Questi radicali sono stati generati mediante sia γ -radiolisi che reazione con perossinitrito.

MATERIALI E METODI

La 1,2-dioloil-L- α -fosfatidilcolina (DOPC), la palmitoilfosfatidilcolina (POPC) e l'acido oleico metilestere, il metilestere dell'acido elaidico, la ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A; EC. 3.1.27.5), la ribonucleasi T1 da *Aspergillus oryzae* (RNasi T1; EC. 3.1.27.3), il lisozima da bianco d'uovo (EC. 3.2.17) l'istone tipo IIA da *calf thymus*, la metionina, la tripsina, l'RNA di lievito (type VI), e 5'-UTP agarosio sono stati forniti dalla SigmaCo. La A β (1-40) è stata ottenuta dalla Bachem. La sintesi del perossinitrito è stata condotta secondo UPPU e Pryor⁶⁸. Metanolo, cloroformio e *n*-esano (per analisi HPLC), ultrapuri, sono stati forniti da Aldrich. L'acetonitrile e l'acido trifluoracetico (TFA) sono rispettivamente della Baker (Deventer, Olanda) e della Carlo Erba (Milano, Italia).

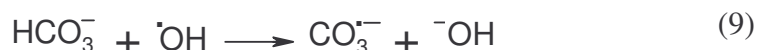
1. γ -Radiolisi delle proteine in soluzione acquosa - La soluzione proteica è stata preparata sciogliendo 0,6mg di proteina in 1mL di acqua tridistillata (concentrazione finale 43 μ M), in una provetta munita di tappo a vite con setto di teflon. La soluzione proteica (pH 6,5) è stata prima flussata con N₂O per 15min e poi irradiata a diverse dosi (da 33 a 1000Gy).

Nel corso dell'irradiamento non sono state osservate variazioni di pH e sono state prelevate aliquote di 100 μ L a tempi diversi. Ciascuna aliquota è stata trasferita in eppendorf, congelata con azoto liquido e liofilizzata.

La proteina irradiata è stata usata per i saggi enzimatici, per l'analisi elettroforetica, per analisi HPLC e per misure spettroscopiche.

Per la β -amiloide sono state introdotte delle modifiche sperimentali, per generare ulteriori tipi di radicali (NO₂[•] e CO₃^{•-}), vedi sottoparagrafo seguente. La γ -radiolisi della A β (1-40) è stata condotta sciogliendo la proteina in tampone fosfato 20mM, pH 7,4 (concentrazione finale 100 μ M), in presenza di di NaNO₃ e NaHCO₃ 20mM. A questi valori di concentrazione la fibrillogenesi richiede approssimativamente 2 giorni⁶⁹. La soluzione proteica è stata saturata con N₂O e poi irradiata a diverse dosi (50, 100, 200Gy). La proteina irradiata è stata analizzata mediante RP-HPLC e MALDI-TOF MS.

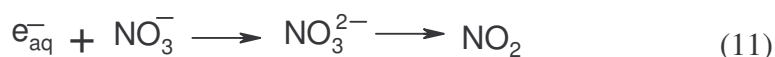
1.1 *Formazione di radicali NO₂[•] e CO₃^{•-} mediante γ radiolisi* - La γ radiolisi di soluzioni acquose, in presenza di carbonato (NaHCO₃) genera radicali CO₃^{•-} secondo l'equazione 9.



I radicali CO₃^{•-} possono ossidare le Met oppure estrarre un atomo di idrogeno dalle Tyr generando il tirosil radicale (TyrO[•]) come mostrato nell'equazione 10.



In presenza di nitrato (NaNO₃) si forma la specie reattiva dell'azoto, NO₂[•] (eq. 11).



Il radicale NO₂[•] può reagire con il tirosil radicale (TyrO[•]) generando nitrotirosina.

2. Reazione della A β (1-40) con perossinitrito – Ad una soluzione A β (1-40) 100 μ M è stato addizionato NaHCO₃ 60mM, dopo 5min e sotto forte agitazione è stato aggiunto il perossinitrito a concentrazione finale 500 μ M. Il perossinitrito è stato conservato a -20°C e la sua concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente a 302nm (ϵ_{302} = 1670 M⁻¹cm⁻¹), mediante diluizione in NaOH 0,01N. I prodotti di reazione sono stati analizzati mediante RP-HPLC e MALDI-TOF MS.

3. Determinazione dell'attività della RNasi A – La concentrazione proteica è stata determinata in base al coefficiente di estinzione della RNasi A ($E_{278}^{1\%} = 7,1$). L'attività della RNasi A irradiata e non irradiata è stata saggiata secondo il metodo di Kunitz⁷⁰, misurando il decremento di assorbanza a 300nm. La miscela di reazione (1mL) è composta dall'enzima (1 a 10 μ g) in ammonio acetato 100mM (pH 5,0), e da RNA di lievito (0,5mg/mL), purificato secondo il metodo di Shortman⁷¹.

L'attività è stata calcolata dalla pendenza della velocità iniziale ed è espressa in unità Kunitz. Un'unità Kunitz corrisponde a $\Delta A_{300}=0,01$ per minuto in condizioni standard a 25°C e a pH 5,0. I risultati riportati corrispondono alla media di quattro serie differenti di determinazioni.

4. Determinazione dell'attività enzimatica del lisozima - Il saggio di attività del lisozima irradiato e non irradiato è stato condotto misurando la diminuzione dell'assorbanza a 450nm di una sospensione di cellule di *Micrococcus lysodeikticus* (2,9mL, 0,3mg/mL) in potassio fosfato 0,1M (pH 7,0)⁷². L'assorbimento è stato misurato con uno spettrofotometro Cary 1 (Varian), corredato di un sistema Peltier di controllo della temperatura. La reazione è stata seguita per 5min e l'attività specifica è stata calcolata come di seguito riportato:

$$\text{Unità/mg} = \frac{\Delta A_{450} / \text{minuti} \times 1,000}{\text{mg enzima/saggio}}$$

5. Elettroforesi - L'SDS-PAGE della proteina nativa ed irradiata è stato condotto su un gel di poliacrilammide (12%) in accordo con il metodo descritto da Faraone-Mennella *et al.*⁷³

6. RP-HPLC della RNasi A - L'analisi cromatografica della proteina irradiata è stata condotta utilizzando una colonna C₄ a fase inversa (25x0,21cm, 5µm; Vydac, Hesperia, CA, USA) con un sistema Hewlett-Packard 1100 (Agilent, Palo Alto, Ca, USA), munito di un sistema di rivelazione UV. L'assorbanza è stata misurata a 220nm. L'eluizione è stata condotta con TFA 0,1% (v/v) in acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B). Il gradiente di eluizione è stato 25-50% B in 30min al flusso di 1mL/min.

7. RP-HPLC della Aβ(1-40) - L'analisi cromatografica del peptide modificato è stata condotta utilizzando una colonna C18 a fase inversa (250x4,6mm, 5µm; Vydac, Hesperia, CA, USA), collegata ad un sistema Waters 600E munito di un autocampionatore Waters 717 plus e di rivelatore Waters 2487 a lunghezza d'onda variabile, selezionata a 215 e a 320nm.

L'eluizione è stata condotta con TFA 0,1% (v/v) in acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B). Il gradiente di eluizione è stato 40-80% B in 40min al flusso di 1mL/min.

8. Digestione con tripsina della A β (1-40) - I prodotti isolati mediante HPLC sono stati liofilizzati e poi disciolti in 50 μ L di tampone (NH₄)CO₃/(NH₄)HCO₃ 50mM, pH 8,4. A questa soluzione è stata aggiunta di tripsina (1 μ L; 1mg/mL) e la miscela è stata incubata per 60min a temperatura ambiente. La reazione è stata interrotta aggiungendo TFA 5% fino a concentrazione finale 0,5% (v/v).

9. MALDI-TOF delle proteine – Gli spettri MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) delle proteina modificate sono stati registrati con un apparecchio Voyager-DE STR device da PerSeptive Biosystems, munito di un laser (337nm). I campioni per MALDI-TOF sono stati preparati aggiungendo 1 μ l di analita ad 1 μ l della soluzione di matrice, sinapinico per l'analisi delle proteine intere ed acido α -ciano-4-idrossicinnamico (16mg/ml in TFA 0.1% e acetonitrile 2:1 v/v) per l'analisi dei prodotti di digestione con tripsina. 1 μ l totale di questa miscela è stata depositata su una piastra metallica, gli spettri sono stati registrati dopo evaporazione.

10. Analisi delle proteine mediante Spettroscopia Raman - I campioni liofilizzati sono stati analizzati mediante Spettroscopia Raman.

Gli spettri Raman (200-1800cm⁻¹) sono stati ottenuti mediante un spettrometro Bruker IFS 66 equipaggiato con un FRA-106 modulo Raman e un detector Ge-diode. La sorgente di eccitazione è un Nd³⁺ YAG laser (1064nm) nella configurazione “backscattering”. La risoluzione spettrale è stata di 4cm⁻¹ e il numero totale delle scansioni di 6000. La potenza del laser utilizzata è stata di 100mW.

11. Preparazione delle vescicole di DOPC contenenti proteine – 1,9 mg di DOPC sono stati disciolti in cloroformio, successivamente evaporato

con argon fino ad ottenere un film sottile sulle pareti della provetta che è stata poi messa sottovuoto per 30min. Al film sono stati aggiunti 950 μ L di acqua e le MLV sono state ottenute mediante forte agitazione su vortex per 7min⁷⁴

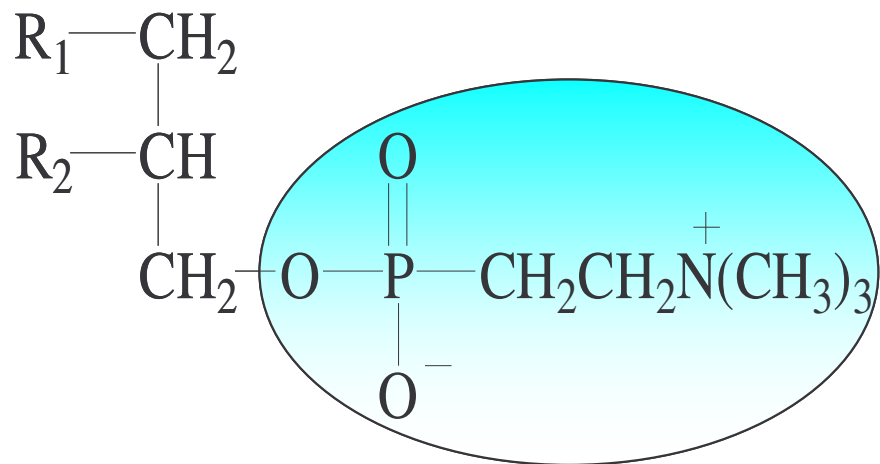
Le MLV sono state poi estruse attraverso un filtro di policarbonato (100nm) per 19 volte, utilizzando un apparato Liposofast⁷⁵, in modo da ottenere le vescicole unilamellari (LUVET) (fig. 9).

Alla sospensione di LUVET è stata aggiunta la soluzione proteica disciolta in acqua (0,6mg/50 μ L) in modo da ottenere lipidi e proteina in concentrazione finale rispettivamente di 2,5mM e 43 μ M.

12. Preparazione delle vescicole di POPC contenenti metionina- Le vescicole di POPC (fig. 9) sono state preparate nelle stesse condizioni descritte per la ribonucleasi e per il lisozima considerando, in questo caso, differenti rapporti lipide/Met : 29/1, 58/1, 116/1.

13. γ -Radiolisi della sospensione di LUVET contenente proteine - La sospensione di LUVET e' stata saturata con N₂O per 15 min e poi irradiata a differenti dosi (da 33 a 1000Gy). Gli esperimenti di radiolisi continua sono stati condotti a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) utilizzando una ⁶⁰Co-Gammacell (Atomic Energy of Canada Ltd) alla dose di 14,5Gy/min. L'esatta radiazione assorbita è stata determinata con il dosimetro chimico di Fricke, considerando $G(\text{Fe}^{3+}) = 1,61 \mu\text{mol J}^{-1}$

14. Estrazione dei lipidi - I lipidi irradiati alle diverse dosi sono stati estratti con una miscela cloroformio : metanolo 2:1 e con una soluzione satura di NaCl, recuperando la fase organica, che è stata anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed evaporando il solvente sotto vuoto a temperatura ambiente. I lipidi sono stati transesterificati per reazione con 1mL di KOH 0,5M in MeOH a temperatura ambiente e sotto agitazione⁷⁴. Al termine della reazione, i metil esteri ottenuti dagli acidi grassi (FAME = fatty acids methyl ester)⁷⁴ sono stati estratti con *n*-esano e lavati con una soluzione satura di NaCl. La fase organica contenente i FAME è stata anidrificata ed evaporata fino a piccolo volume per eseguire successivamente l'analisi gas cromatografica (GC).



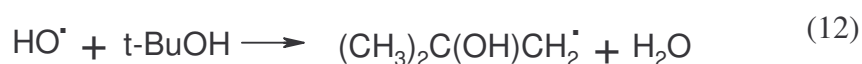
DOPC = $R_1 = R_2 =$ acido oleico (*9cis*, 18:1)
POPC = $R_1 =$ acido oleico (*9cis*, 18:1)
 $R_2 =$ acido palmitico

Figura 9 - Struttura della dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e della palmitoilfosfatidilcolina (POPC).

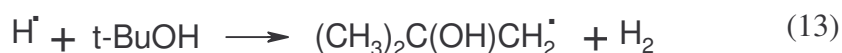
15. Analisi mediante gas cromatografia – Le analisi di gas cromatografia, e la determinazione del rapporto *cis-trans* degli acidi grassi monoinsaturi, sono state eseguite mediante iniezioni (1µL) in gas cromatografo Varian CP-3800, equipaggiato con un rivelatore a ionizzazione di fiamma e una colonna capillare Rtx-2330 (90% biscianopropil-10% fenilcianopropil polisilossano colonna capillare; 60m, 0,25mm i. d., 0,20µm). Il gradiente di temperatura del forno, a partire da 160 °C per 25min, è stato seguito da un incremento di temperatura di 10°C/min fino a 250°C. La pressione costante del gas carrier (elio) è di 29psi. I picchi relativi ai FAME in configurazione *cis* e *trans* sono stati identificati mediante il confronto dei tempi di ritenzione ottenuti con i metilesteri degli acidi oleico ed elaidico commercialmente disponibili (standard).

16. Formazione di radicali •H mediante γ-radiolisi – Le condizioni sperimentali sono state modificate rispetto a quelle utilizzate per la RNasi A e per il lisozima. Infatti, la metionina è stata sospesa in tampone fosfato 10mM, pH 6-7, aggiungendo tert-butanolo (t-BuOH) 0,2M. Inoltre le sospensioni sono state gorgogliate con N₂O oppure con argon prima dell'irradiamento (84, 138, 328, 535Gy).

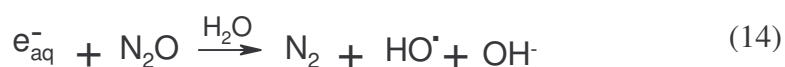
La presenza di t-BuOH è necessaria a bloccare gli •OH radicali secondo l'equazione 12,



gli atomi di •H reagiscono molto lentamente con il t-BuOH, quindi restano disponibili per l'attacco sulla metionina (eq. 13)

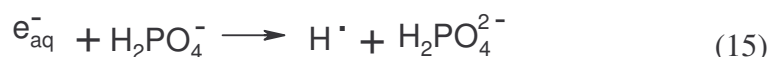


In presenza di N₂O, gli e⁻_{aq} vengono convertiti in radicali •OH secondo l'equazione 14



in tampone fosfato 10mM, a pH 6-7, sono presenti ioni H₂PO₄⁻. In presenza di argon, gli elettroni idratati e⁻_{aq} ancora presenti nel mezzo possono reagire con

l'anione e contribuire ad aumentare la resa chimica (quantum chemical yield) delle specie $\bullet\text{H}$ secondo l'equazione 15.



Le costanti di velocità della reazione degli e_{aq}^- , $\bullet\text{OH}$ e $\bullet\text{H}$ con la Met sono di $4,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, rispettivamente.

Nelle condizioni su descritte sono irradiate le vescicole contenenti Met e le soluzioni acquose di Met (2,5 mg/mL).

17. Analisi RP-HPLC della metionina in soluzione acquosa –

L'analisi cromatografica della Met irradiata a differenti dosi è stata condotta utilizzando una colonna C_{18} a fase inversa (25 x 0,21cm, 5 μm ; Vydac, Hesperia, CA, USA), con un sistema Hewlett-Packard 1100 (Agilent, Palo Alto, Ca, USA) munito di un sistema UV di rivelazione. L'assorbanza è stata misurata a 220nm. L'eluizione è stata condotta con TFA 0.1% (v/v) in acqua (solvente A) e acetonitrile (solvente B). Il gradiente di eluizione è stato 0-30% di B in 40 min al flusso di 1mL/min.

18. Analisi NMR della Met in soluzione acquosa – Gli spettri

^1H NMR sono stati registrati con un apparecchio Varian VXR 400-MHz. I campioni sono stati diluiti in D_2O . È stata utilizzata una soluzione CH_3OD 37mM (metanolo deuterato) come standard interno.

RISULTATI E DISCUSSIONE

DANNO RADICALICO DELLA RIBONUCLEASI A IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA

Nelle cellule viventi, i radicali liberi sono parte integrante dei processi biochimici e giocano un ruolo importante nello sviluppo di una varietà di effetti biologici, alcuni dei quali associati a condizioni patologiche. Tuttavia in certe condizioni, la generazione di radicali liberi nelle cellule è dannosa e causa danni a tessuti come ad esempio, in seguito ad esposizione ad elevate concentrazioni di ossigeno durante la riperfusione seguita da ischemia e negli stati infiammatori^{76,77}.

Inoltre, a seguito della deplezione di sistemi antiossidanti enzimatici e molecolari, i radicali non vengono intrappolati e possono procedere nel danneggiamento delle biomolecole.

Il danno radicalico alle proteine comporta modificazioni strutturali, che sono riconosciute come la causa di malattie degenerative quali cancro, artrite reumatoide e disordini neurodegenerativi, es. la malattia di Alzheimer⁷⁸. L'esposizione delle proteine ai radicali liberi può causare alterazioni nella sequenza amminoacidica, in particolare a livello delle posizioni C α -H, dei residui aromatici (Tyr, Phe), di quelli solforati e indurre frammentazione e formazione di aggregati proteici mediante reazioni di *cross-linking* proteina-proteina⁷⁹.

Interesse crescente è rivolto al trasferimento del danno radicalico delle proteine ad altri domini cellulari, come ad esempio la membrana. In questo lavoro è stato descritto il danneggiamento dei lipidi di membrana, monitorato mediante un modello lipide/proteina esposto a γ -radiolisi. Un primo caso esaminato è stato quello della ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A) in quanto ne sono ben note la struttura caratterizzata da 9 β -sheet antiparalleli (residui 43-47, 61-63, 72-74, 79-86, 97-104, 106-111, 116-123) e tre α -eliche (3-13, 24-34 e 50-60)⁸⁰ (fig. 10) e la funzione.

Inoltre, la sua inattivazione è già stata specificamente connessa ad un danno dei gruppi solforati con formazione di tioli a basso peso molecolare^{81,82}.

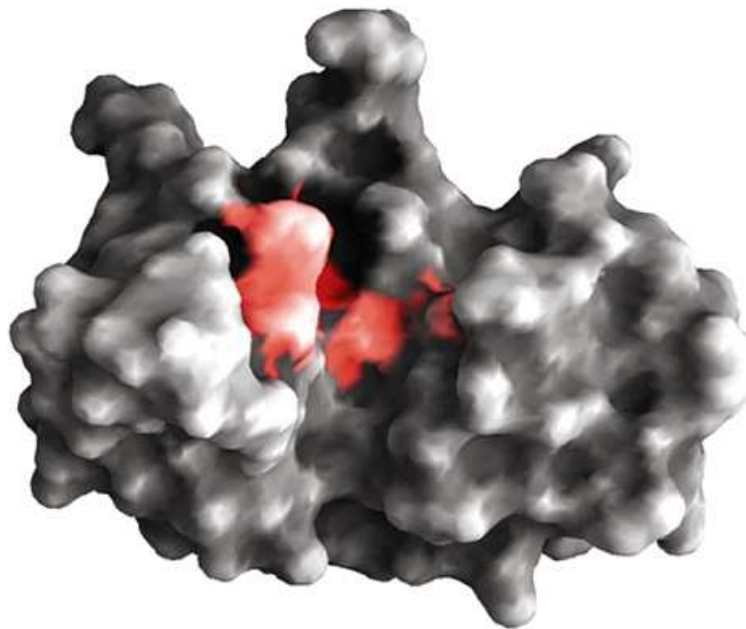
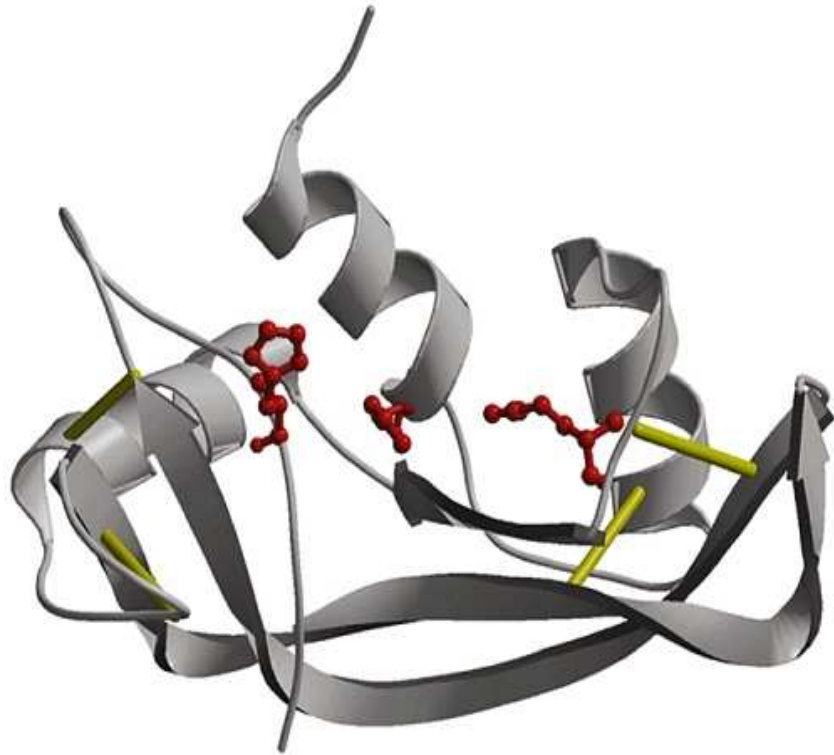


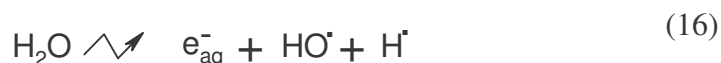
Figura 10 - Struttura tridimensionale della RNasi A. In rosso sono mostrate le catene laterali amminoacidiche presenti nel sito attivo. I ponti disolfurici sono in giallo.

Infatti, la RNasi A contiene quattro ponti disolfurici e 4 Met, di cui tre parzialmente esposte in superficie.

Lo studio delle alterazioni della RNasi A indotte dall'attacco di radicali è stato effettuato mediante saggi enzimatici, elettroforesi, analisi HPLC e Spettroscopia Raman. Parallelamente, è stata presa in esame la possibilità della migrazione di specie radicaliche tioliche generate da tioli, verso il doppio strato lipidico con formazione di lipidi *trans*, in modo da correlare il danneggiamento della RNasi A all'isomerizzazione dei lipidi di membrana.

1. γ -Radiolisi della RNasi A in soluzioni acquose

La γ -radiolisi di soluzioni acquose induce la formazione di tre specie radicaliche primarie (eq. 16): elettroni idratati (e_{aq}^-), radicali idrossilici ($\bullet OH$) e atomi di idrogeno ($\bullet H$). Questa reazione viene frequentemente impiegata per studiare i danni ossidativi alle biomolecole e, recentemente, nello studio delle correlazioni biochimiche in alcune malattie umane e nell'invecchiamento^{83,84,85}. Saturando le soluzioni acquose (eq.17) prima dell'irradiazione con protossido di azoto (N_2O) è possibile ottenere la conversione degli e_{aq}^- in $\bullet OH$; quindi, le specie radicaliche presenti nel mezzo acquoso sono $\bullet OH$ (90%) e $\bullet H$ (10%)⁸⁶.



E' importante notare che gli atomi di $\bullet H$ e gli $\bullet OH$ radicali sono specie molto reattive, capaci di reagire non solo con i legami S-H ma anche di fare idrogeno estrazione dalle molecole organiche ($R'H$), formando radicali centrati all'atomo di carbonio.

2. Attività enzimatica e analisi mediante SDS-PAGE

La tabella B (pag. 33) mostra i risultati del saggio di attività della RNasi A nativa ed irradiata. A basse dosi di irradiazione (33Gy) l'attività enzimatica diminuisce fino al 67% e raggiunge il 50% a dosi di 500Gy. Un

ulteriore incremento della dose di irradiazione causa una completa inattivazione dell'enzima (5% dopo 1000Gy).

Tabella B - Attività enzimatica residua di soluzioni di RNasi A a differenti dosi di irradiazione e percentuale di isomeri *trans* dopo irradiazione in vescicole di DOPC-RNasi A.

DOSE (Gy)	DOPC/ RNasi A % <i>trans</i>	RNasi A % attività residua
0	0	100
33	n.d.	67
84	1,2	65
165	2,0	n.d.
328	4,0	n.d.
500	n.d.	50
1000	5,5	5

E' ben noto che l'irradiazione delle proteine globulari induce aggregazione⁸⁷. A tale scopo le RNasi A nativa ed irradiata, nelle condizioni precedentemente descritte, sono state analizzate mediante analisi elettroforetica. La figura 11 mostra che già a basse dosi di radiazioni, oltre alla banda corrispondente alla RNasi nativa (PM \approx 13.7kDa), si osserva una banda con peso molecolare superiore a 39.2kDa, corrispondente ad un aggregato trimerico.

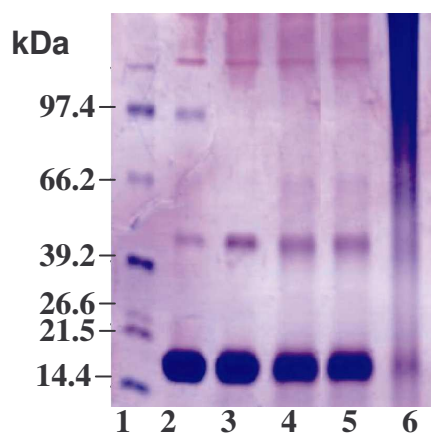


Figura 11 - Valutazione degli effetti dell'irradiazione della RNasi A mediante SDS-PAGE. Standard di peso molecolare (1); RNasi A non irradiata (2); irradiata a 33Gy (3); irradiata a 84Gy (4); irradiata a 500Gy (5); irradiata a 1000Gy (6).

Inoltre, mediante analisi elettroforetica in presenza dell'agente riducente β -mercaptoetanolo 5mM è stato valutato il coinvolgimento dei ponti disolfurici nella formazione degli aggregati. Il profilo elettroforetico ottenuto in presenza ed in assenza di β -mercaptoetanolo non mostra significative differenze, indicando che gli aggregati proteici indotti mediante γ -irradiamento sono principalmente dovuti a legami differenti dai ponti disolfurici. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati in letteratura, i quali mostrano che i ponti disolfurici nella RNasi A non partecipano significativamente alle reazioni di *cross-linking* come descritto per altre proteine solforate^{88,89,90}.

3. Analisi HPLC e di Spettrometria di massa

La presenza degli aggregati formati dopo irradiazione è stata evidenziata mediante analisi HPLC della RNasi A nativa ed irradiata (fig. 12). Il profilo cromatografico relativo alla proteina non irradiata mostra un unico picco simmetrico ($t_r = 11,8\text{min}$), indice della presenza della sola frazione attiva (fig. 12a). Dopo esposizione ad una dose di 84Gy il profilo cromatografico mostra un nuovo picco ($t_r = 13,3\text{min}$) corrispondente a forme più idrofobiche della RNasi A (fig. 12b). Raddoppiando la dose di irradiazione (166Gy) questo picco incrementa ulteriormente (fig. 12c). Da quest'ultimo campione sono state raccolte le singole frazioni che sono state sottoposte ad analisi elettroforetiche (fig. 13).

Nella frazione 1, è presente solo la proteina nativa (fig. 13B), mentre le frazioni più ritardate (2-4) sono più ricche in aggregati con differenti pesi molecolari. L'analisi mediante MALDI-TOF della frazione 4 (fig. 14b) ottenuta dalla proteina irradiata a 1000Gy, mostra la presenza di due principali tipi di aggregati: dimeri (27362 Da) e trimeri (41046 Da).

E' importante notare che una piccola quantità di dimeri possono formarsi spontaneamente anche nella proteina nativa (fig. 14a).

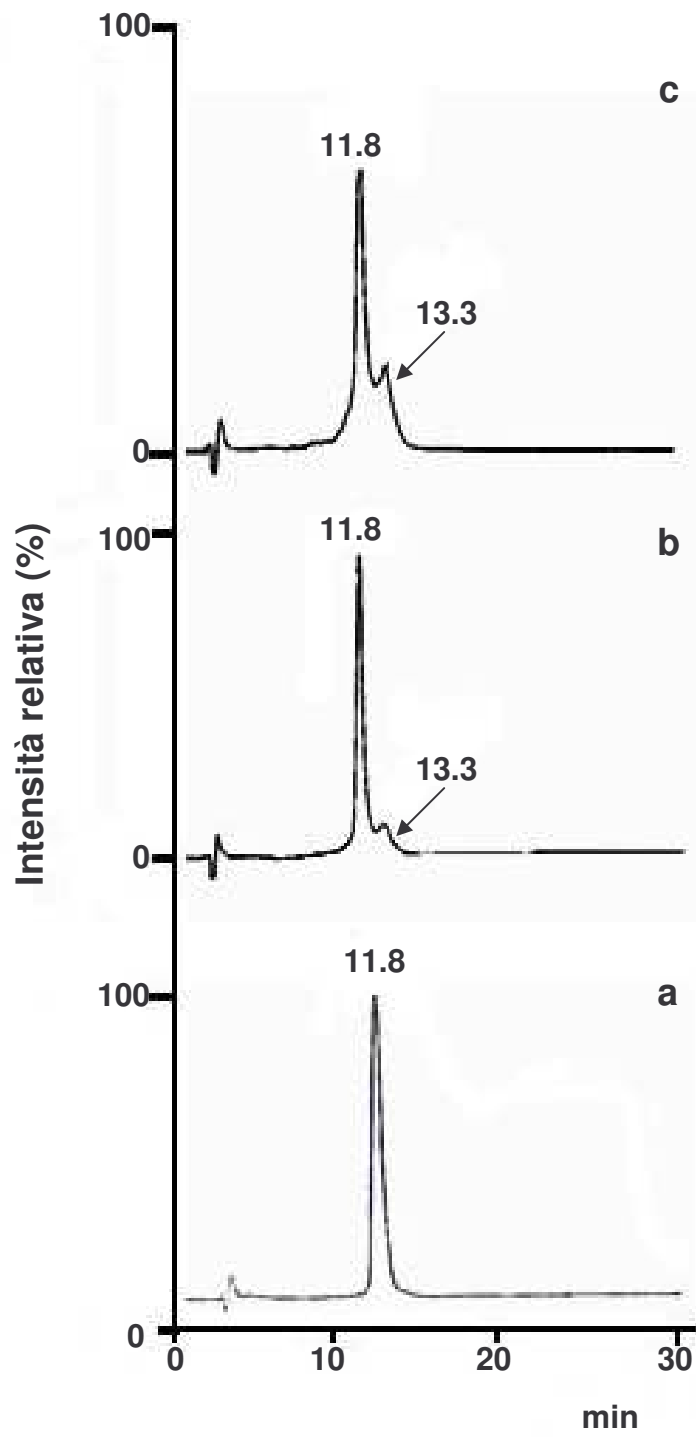


Figura 12 - Analisi HPLC della RNasi A nativa (a) e irradiata alle dosi: 84Gy (b), e 165Gy (c). Tutte le soluzioni sono state saturate con N₂O.

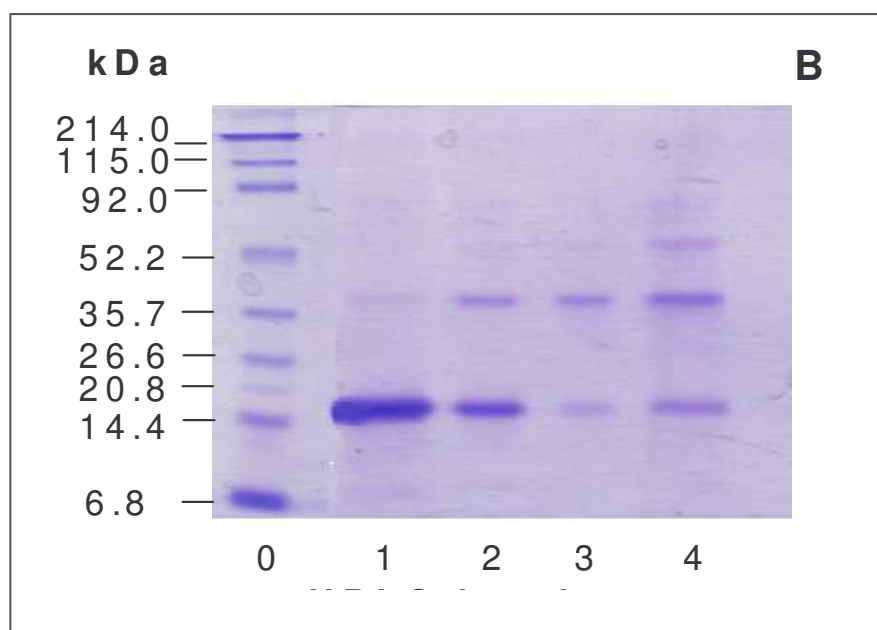
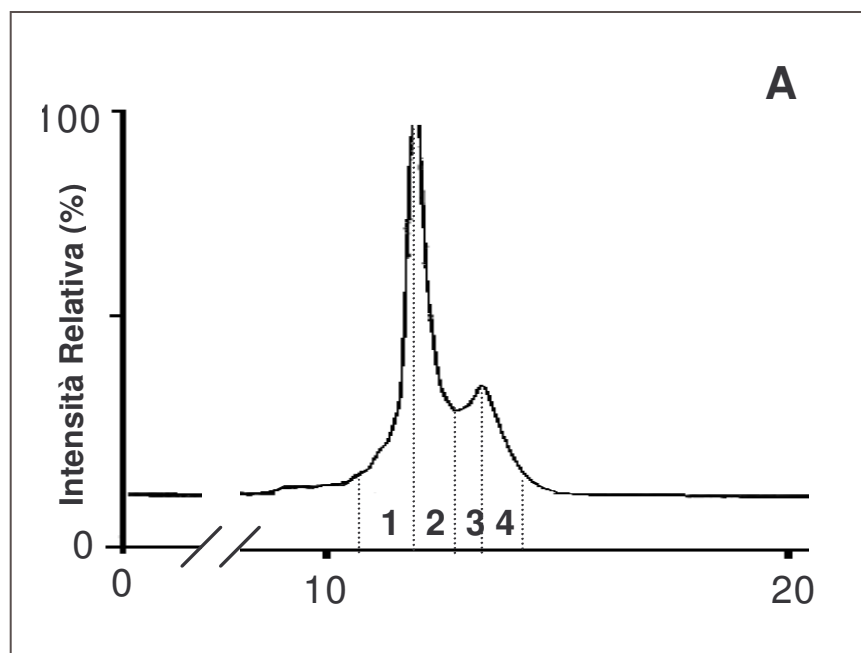


Figura 13 - Effetti dell'esposizione a 165Gy sull'aggregazione dell'RNasi A seguita mediante HPLC (A) e SDS-PAGE (B). Le frazioni HPLC (1-4) della proteina irradiata sono state separatamente raccolte ed analizzate mediante SDS-PAGE. In SDS-PAGE i campioni corrispondono: 0) standard di peso molecolare; 1-4) frazioni ottenute da RP-HPLC.

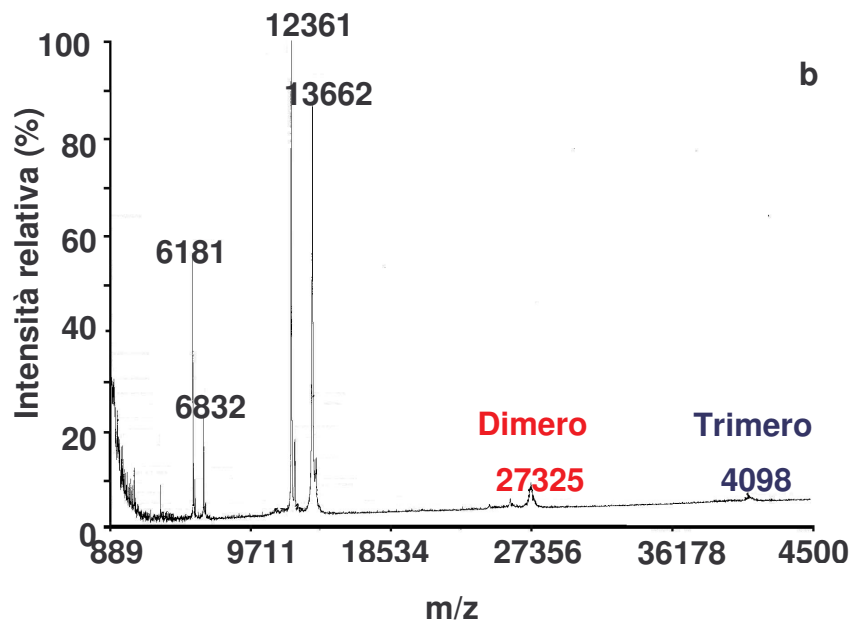
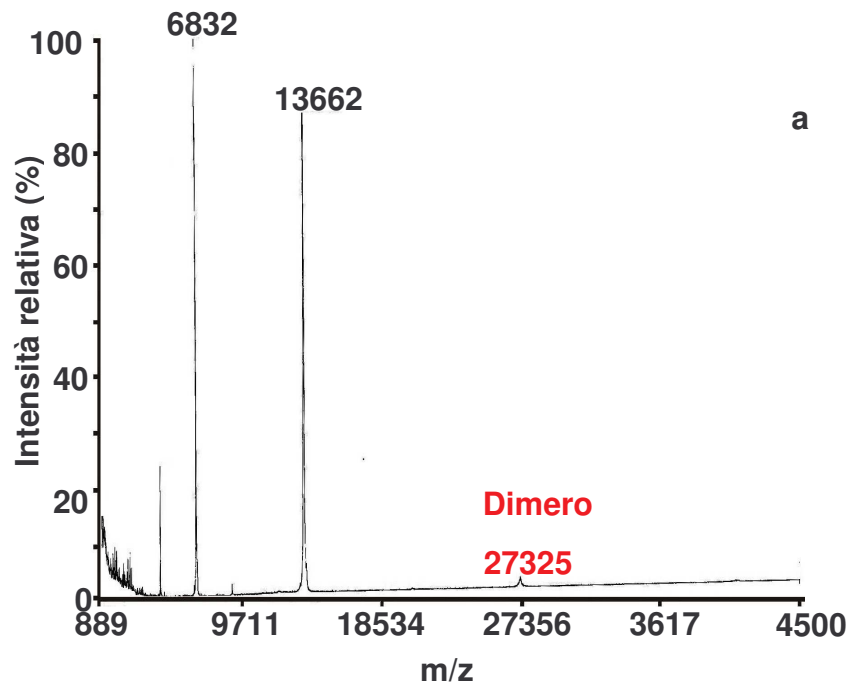


Figura 14 – MALDI-TOF MS delle frazioni 1e 4 ottenute da HPLC e corrispondenti alla RNasi A nativa (a) ed irradiata a 165Gy (b)

4. Analisi della RNasi A mediante Spettroscopia Raman

Allo scopo di determinare i cambiamenti strutturali della proteina ed il microambiente dei residui amminoacidici, risultanti dall'esposizione ad $\bullet\text{H}$ ed $\bullet\text{OH}$ radicali, sono stati registrati gli spettri Raman della proteina prima e dopo irradiazione.

Da un'analisi qualitativa degli spettri, sono stati osservati significativi cambiamenti spettrali in particolare nelle bande corrispondenti alle Tyr e alle Met (fig. 15). RNasi A contiene sei residui di Tyr che danno origine a molte bande vibrazionali; tra queste, il rapporto di intensità fra le componenti a 830 e 850cm^{-1} fornisce informazioni utili per determinare l'ambiente della catena laterale della Tyr. Il rapporto d'intensità del doppietto a 830 e 850cm^{-1} , diminuisce con l'irradiazione, suggerendo che le Tyr più esposte in superficie, probabilmente bersaglio delle radiazioni, trasformandosi in $\text{TyrO}\bullet$ non contribuiscono più all'intensità del doppietto. Particolarmente interessanti sono state le informazioni relative ai gruppi solforati nella proteina; l'assenza di Trp nella sequenza amminoacidica della proteina rende possibile la formazione della regione spettrale ($500\text{-}750\text{cm}^{-1}$) in cui si trovano le bande relative ai modi vibrazionali dei legami C-S e S-S. La RNasi A presenta quattro ponti disolfurici che danno origine a due bande Raman a 514 e 530cm^{-1} , attribuibili alle conformazioni *gauche-gauche-gauche* (*ggg*) e *trans-gauche-trans* (*tgt*) dell'unità C-C-S-S-C-C- (fig. 15A), mentre le vibrazioni dei quattro residui di Met presenti nella RNasi A^{91,92} originano una banda a 727cm^{-1} . L'esposizione della proteina a basse dosi di irradiazione (23 e 61Gy) produce piccole modificazioni delle bande di stiramento dei legami disolfurici ($\nu\text{S-S}$) (fig. 15A (b e c)). Inoltre, radiazioni di 23Gy causano cambiamenti significativi nel legame C-S dei residui di Met, come indicato dallo sdoppiamento della banda a 727cm^{-1} in due componenti a 718 e 729cm^{-1} , suggerendo che questi residui solforati sono preferenzialmente attaccati dai radicali liberi. A dosi di irradiazione più alte, sono visibili maggiori modificazioni in entrambe le bande $\nu\text{S-S}$, indicando variazioni nella conformazione dei ponti disolfurici (fig. 15Ac). Sono ancora visibili cambiamenti significativi nelle bande $\nu\text{C-S}$ della Met indicando una rilevante modificazione molecolare in questi residui.

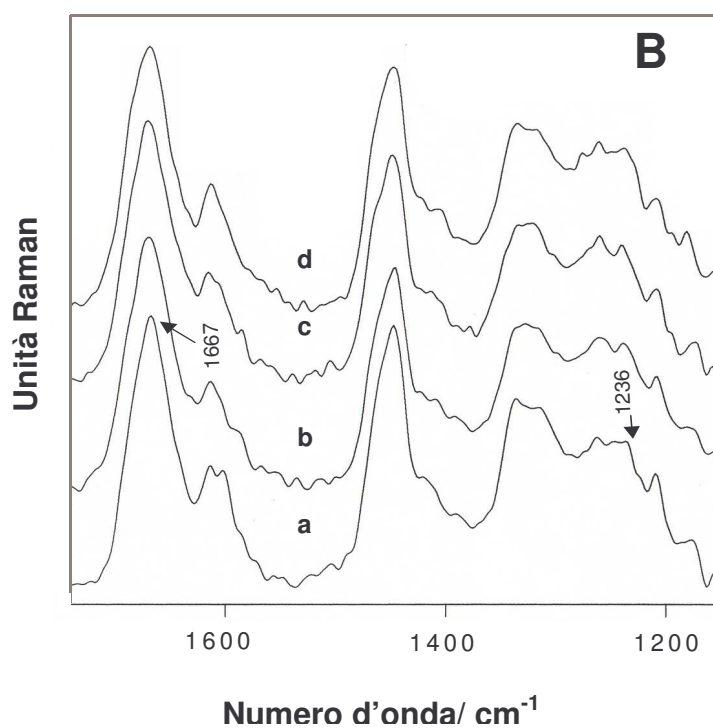
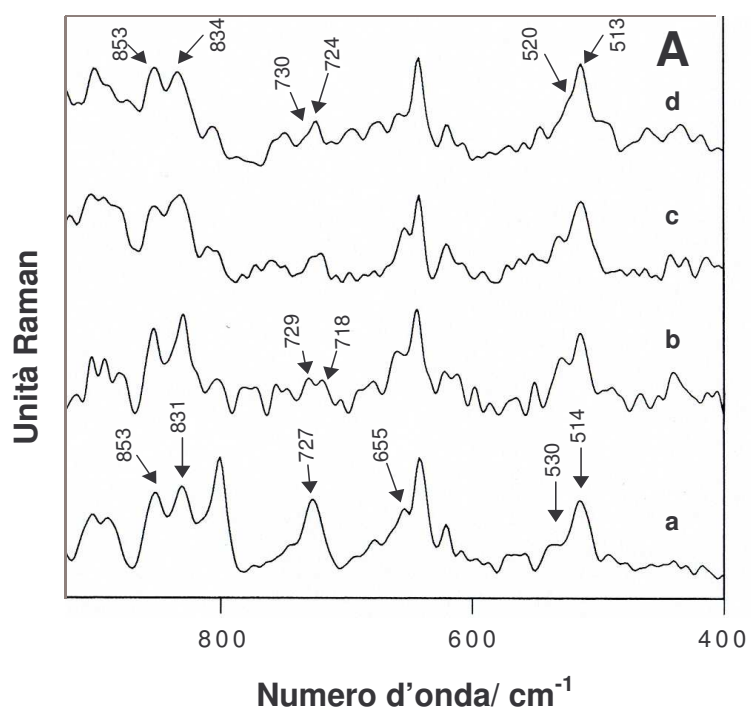


Figura 15 - A) Spettri Raman della RNasi A nativa (a) e della RNasi A γ -irradiata a differenti dosi: 23Gy (b), 61Gy (c) e 84Gy (d). **B)** Spettri Raman dell'amide I e II della RNasi A nativa (a) ed irradiata a differenti dosi 23Gy (b), 61Gy (c) e 84Gy (d).

I dati relativi al danno radicalico sono in accordo con il decremento dell'attività enzimatica della RNasi A nativa ed irradiata e con i risultati di *cis-trans* isomerizzazione. Dalle variazioni del profilo delle bande Raman che appaiono nelle regioni spettrali 1620-1230 cm^{-1} e 1230-1280 cm^{-1} (fig. 15B) è possibile determinare la variazione della percentuale di struttura secondaria della RNasi A a differenti dosi di radiazioni (tab. C). Dopo radiazioni di 23Gy, la percentuale di β -sheet aumenta dal 48% al 58% mentre quella dell' α -elica diminuisce dal 18% al 12 %. Aumentando la dose fino a 61Gy non si osservano ulteriori cambiamenti conformazionali. Le differenti percentuali di α -elica potrebbero essere connesse con le variazioni spettrali osservate nelle due bande, dovute ai residui di Tyr e Met. Infatti, è noto che una Tyr (-25) e due delle quattro Met (-29 e -30) sono localizzate in un tratto di α -elica; di conseguenza, un decremento della quantità di α -elica potrebbe determinare una maggiore esposizione di questi amminoacidi, rendendoli più facilmente soggetti all'attacco da parte di radicali.

Tabella C- Percentuale di struttura secondaria della RNasi A nativa ed irradiata ottenuta mediante analisi Raman.

Dose (Gy)	α-elica (%)	β-Sheet (%)	Random (%)
0	18	48	34
23	12	54	35
61	12	54	35
84	12	54	35

5. γ -Radiolisi di una sospensione DOPC-LUVET contenente RNasi A

La tabella B (pag. 33) riporta le percentuali di isomeri *trans*, formati nelle vescicole di DOPC in presenza di RNasi A, irradiata con differenti dosi. L'isomerizzazione lipidica avviene già alle basse dosi di radiazioni γ , con concomitante riduzione dell'attività enzimatica. Gli esperimenti di controllo, condotti in assenza di RNasi A o sostituendo l'RNasi A con una proteina priva di residui solforati, come l'istone H1 (tipo IIA) da timo di vitello, non mostrano alcuna isomerizzazione sostenendo l'ipotesi del coinvolgimento dei

residui solforati della proteina nel danno radicalico ai lipidi insaturi⁹³. E' ben noto che l'attacco dell' $\cdot\text{OH}$ sulla RNasi A può coinvolgere differenti siti, in particolare gli amminoacidi aromatici (Tyr e Phe) e quelli solforati (Cys e Met), contribuendo così all'inattivazione enzimatica⁷⁹.

D'altro canto, in letteratura, è stata riportata l'efficienza dell'atomo di $\cdot\text{H}$ ad attaccare in modo selettivo i residui di cisteina e metionina con formazione di alanina e α -amminobutirrico^{81,82}.

Sulla base di queste conoscenze e dei risultati ottenuti con la proteina di controllo (istone H1) l'ipotesi proposta è che il danneggiamento della RNasi A è probabilmente dovuto all'iniziale attacco dell'atomo di $\cdot\text{H}$ ai residui di Met e/o dei ponti disolfurici, con conseguente formazione di $\text{RS}\cdot$ diffusibili nel compartimento acquoso. Pertanto, con la RNasi A è stata presa in esame anche la RNasi T1, priva di residui di Met e caratterizzata da 2 ponti disolfurici.

In figura 16 è riportato il grafico con le percentuali di formazione dei lipidi *trans* (elaidato) in DOPC-LUVET contenenti RNasi A e T1, in funzione della dose di radiazioni. La curva ha un andamento sigmoide, che indica l'esistenza di un periodo di latenza iniziale. Nell'ipotesi proposta questa fase corrisponderebbe alla formazione di radicali tiilici a seguito dell'irradiamento della proteina. Gli $\text{RS}\cdot$ così formati diffonderebbero nello strato lipidico inducendo isomerizzazione *cis-trans*.

A parità di dose di radiazione, nel sistema contenente RNasi T1, la formazione di *trans* isomeri è solo dello 0,6% ad 1000Gy rispetto alla RNasi A che produce 5,5% di isomeri *trans* (fig. 16)⁹³. Il differente comportamento delle due proteine può essere spiegato ipotizzando che i residui di Met presenti solo nella RNasi A sono la principale fonte di tiil radicali diffusibili. Infatti è noto che tre delle quattro Met della proteina sono parzialmente esposte in superficie. Il basso livello di isomerizzazione misurato in presenza della RNasi T1 irradiata potrebbe derivare dalla formazione di radicali non diffusibili sui ponti disolfurici.

Sulla base di questi risultati è stato proposto il seguente meccanismo di degradazione della Met e di formazione di tiil radicali diffusibili (fig.17).

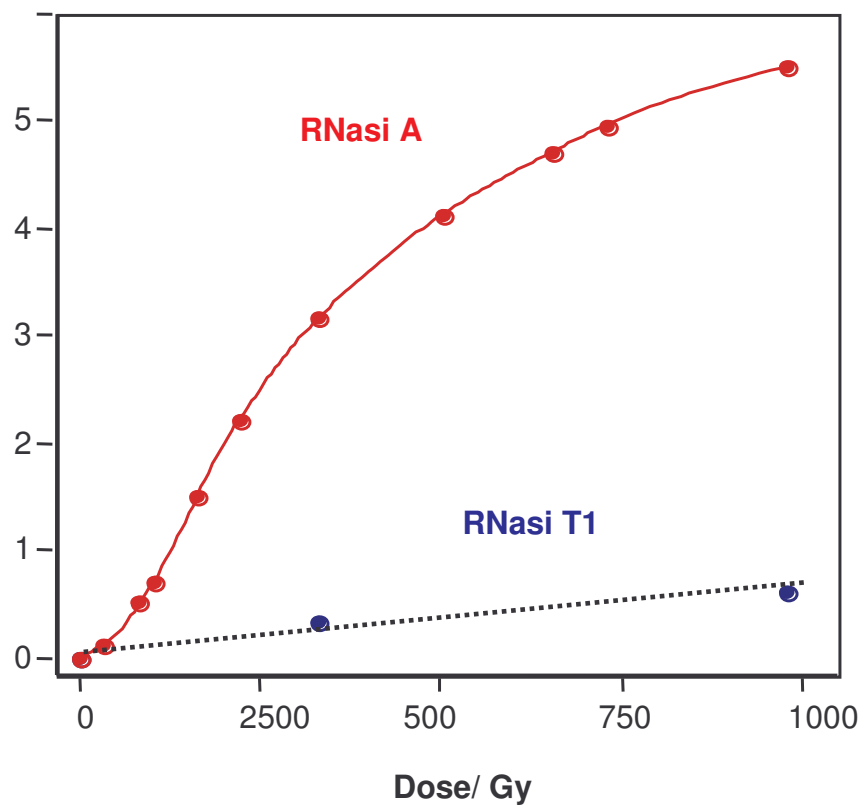


Figura 16 – Formazione dose-dipendente di elaidato in vescicole di DOPC-LUVET contenenti RNasi A o RNasi T1 mediante γ -radiolisi.

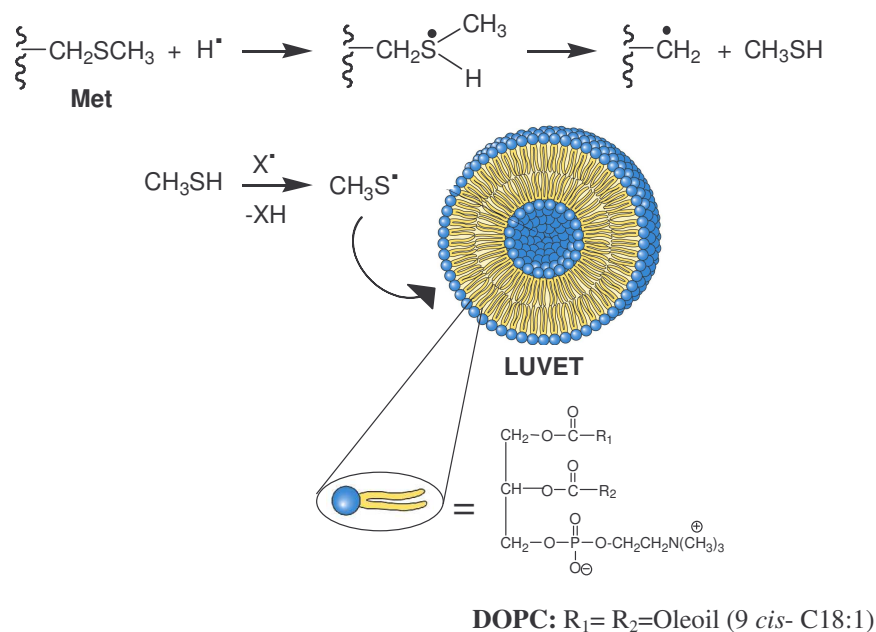


Figura 17 – Meccanismo proposto per la formazione di tiil radicali da residui di metionina contenuti nella RNasi A mediante γ -radiolisi.

Il processo prevede l'attacco iniziale dell'atomo di $\bullet\text{H}$ al gruppo tioetere della Met, con formazione di un sulfuranil radicale da cui, per frammentazione, viene rilasciato il metantiolo, un tiolo a basso peso molecolare. Nelle stesse condizioni, il tiolo può dare luogo al corrispondente tiil radicale che è l'agente isomerizzante in grado di migrare nel doppio strato lipidico e convertire il doppio legame della DOPC.

In conclusione, il sistema modello di vescicole di DOPC contenenti RNasi A fornisce l'evidenza di un danno radicalico che dalle proteine viene trasferito ai lipidi. E' importante notare che il modello della degradazione di amminoacidi contenenti gruppi solforati sostiene l'ipotesi che, in condizioni di stress cellulare, la formazione di RS^\bullet da questi amminoacidi consenta la conversione endogena di lipidi *cis* in *trans*. Tale processo è complementare al contributo della dieta che è stato evidenziato durante gli studi nutrizionali⁹⁴.

DANNO RADICALICO DEL LISOZIMA IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA

Allo scopo di comprendere come la composizione amminoacidica e la struttura globale di una proteina possano influenzare l'attacco dei radicali liberi e quindi il conseguente danneggiamento della proteina, è stato studiato un altro modello biomimetico lipide/proteina esposto a radiazioni γ . È stato scelto il lisozima in quanto questo enzima presenta alcune caratteristiche simili a quelle della RNasi A. Come la RNasi A, il lisozima è una proteina globulare, possiede attività enzimatica, ha un peso molecolare simile a quello della RNasi A (14388 Da), contiene lo stesso numero di ponti disolfurici (6-127, 30-115, 64-80, 76-94), mentre non contiene gruppi tiolici (-SH). Le due proteine differiscono nel contenuto di Trp (6) e nel minor numero di Met (2 anziché 4) (fig. 18). Anche del lisozima è ben nota la struttura: l'analisi di cristallografia a raggi X ha dimostrato che la catena polipeptidica si organizza a formare tre tratti ad α -elica (5-15, 24-34 e 88-96) ed un β -sheet antiparallelo, mentre la restante parte della proteina ha un organizzazione *random*^{95,96}.

1. Attività enzimatica e analisi mediante SDS-PAGE

La tabella D (pag. 40) mostra i risultati del saggio di attività del lisozima nativo e di quello irradiato. A basse dosi di irradiazione il lisozima non presenta un significativo decremento dell'attività enzimatica residua. A 1000Gy l'attività enzimatica residua diminuisce fino al 70%. Questo indica che il lisozima, a differenza della RNasi A, ha una maggiore resistenza alle radiazioni e che il danneggiamento della proteina non avviene con cambiamenti sostanziali del sito attivo.

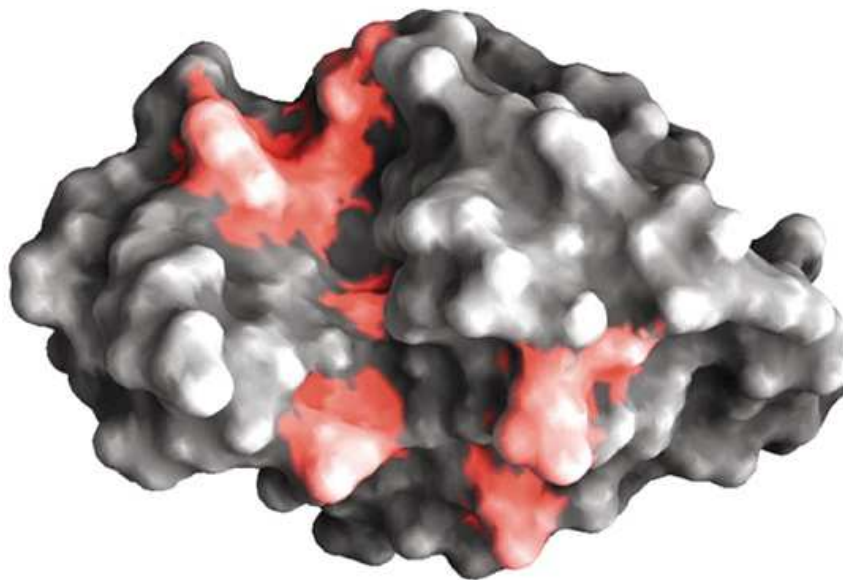
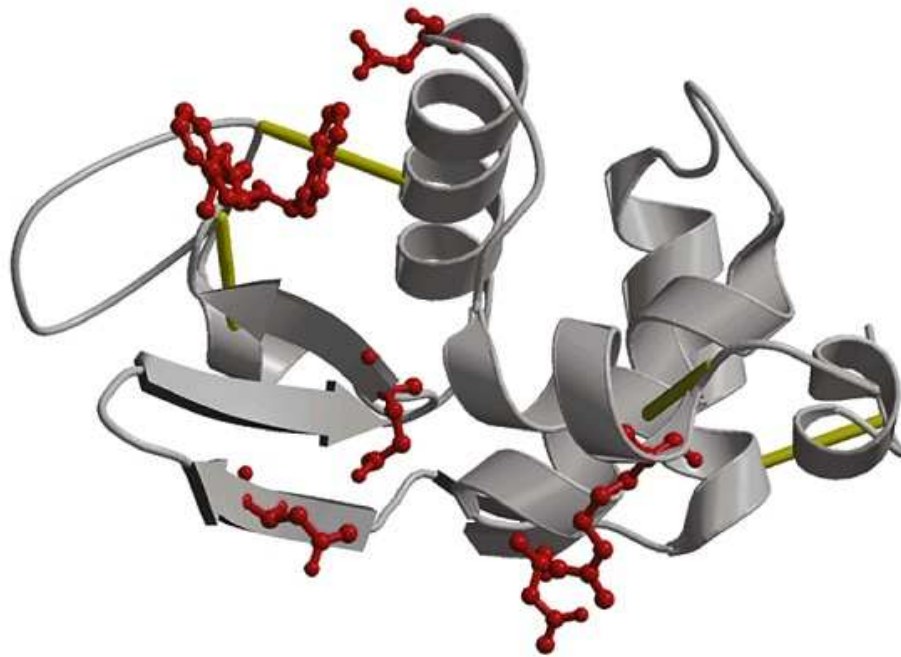


Figura 18 - Struttura tridimensionale del lisozima. In rosso sono mostrate le catene laterali amminoacidiche presenti nel sito attivo. I ponti disolfurici sono in giallo.

Tabella D - Percentuale attività enzimatica residua di lisozima irradiato a diverse dosi e di lipidi *trans* trovati dopo γ -irradiamento di vescicole DOPC-lisozima.

DOSE (Gy)	DOPC/ lisozima % <i>trans</i>	lisozima % attività residua
0	0	100
33	0	98
84	0,1	95
167	0,2	nd
334	0,3	nd
500	0,4	80
668	0,5	nd
1000	0,6	70

Allo scopo di valutare la formazioni di aggregati, il lisozima nativo e quello irradiato sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica.

La figura 19 mostra che il lisozima irradiato, come la RNasi A, già a basse dosi di radiazioni, forma prevalentemente aggregati trimerici con peso molecolare di ~39,2kDa. Ad alte dosi di irradiamento (1000Gy) il lisozima forma aggregati ad alto peso molecolare. Tuttavia, a differenza della RNasi A, che ad alte dosi è completamente aggregata, è possibile ancora osservare la banda corrispondente al lisozima nativo, in accordo con i risultati ottenuti con il saggio di attività enzimatica.

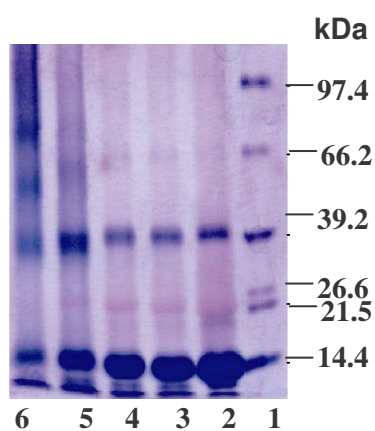


Figura 19 – Determinazione degli effetti dell'irradiamento mediante SDS-PAGE. Standard di peso molecolare (1); lisozima non irradiato (2); irradiato a 33Gy (3); 84Gy (4); 500Gy (5); 1000Gy (6).

2. Analisi del lisozima mediante Spettroscopia Raman

Per monitorare i cambiamenti nella struttura proteica e il microambiente delle catene laterali, in seguito ad esposizione a radicali liberi, la proteina prima e dopo irradiazione, è stata analizzata mediante spettroscopia Raman (fig. 20).

L'analisi qualitativa degli spettri Raman del lisozima ha mostrato variazioni significative solo dopo esposizione alle dosi di radiazioni più alte.

In tabella E sono riportati i valori relativi ai cambiamenti di struttura secondaria del lisozima in seguito ad irradiazione. I risultati mostrano che incrementando le dosi di radiazioni, il contenuto di α -elica diminuisce mentre quello di β -sheet aumenta. Questi cambiamenti sono probabilmente correlati alle modificazioni che si osservano, ad alte dosi, nella banda vibrazionale del Trp (1553cm^{-1}).

Infatti, ad 1000Gy , la banda vibrazionale del Trp diminuisce di intensità ($\sim 50\%$) e si separa in due componenti a 1552 e 1542cm^{-1} . Poiché questa banda è un *marker* dell'orientamento dell'anello indolico rispetto allo scheletro peptidico, la comparsa di una nuova componente, a più basso numero d'onda e con un'intensità simile alla banda 1552cm^{-1} indica probabilmente il cambiamento dell'orientamento di alcuni residui di Trp⁹⁷.

E' noto che Trp-62 e Trp-63 sono maggiormente esposti sulla superficie della proteina e quindi più facilmente attaccabili dai radicali. Inoltre, l'esposizione a basse dosi sembra non indurre nessun cambiamento significativo nei residui di Trp.

Queste alterazioni non influenzano l'attività dell'enzima dal momento che i residui di Trp sono assenti nel sito attivo. A basse dosi, contrariamente al Trp ($33\text{-}84\text{Gy}$) si osservano variazioni della Tyr (830 e 850cm^{-1}). Questo risultato conferma che le Tyr sono sito preferenziale dell'attacco radicalico, come già evidenziato per la RNasi A.

Interessanti sono le informazioni ottenute per i gruppi solforati. Nel lisozima i quattro ponti disolfurici danno origine a due bande Raman ($\nu\text{S-S}$) a 508 e a 504cm^{-1} (fig. 20A) dovute alle conformazioni *ggg* e *ggt*, mentre i due residui di Met generano una banda a $\approx 720\text{cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-S}$)⁹⁸.

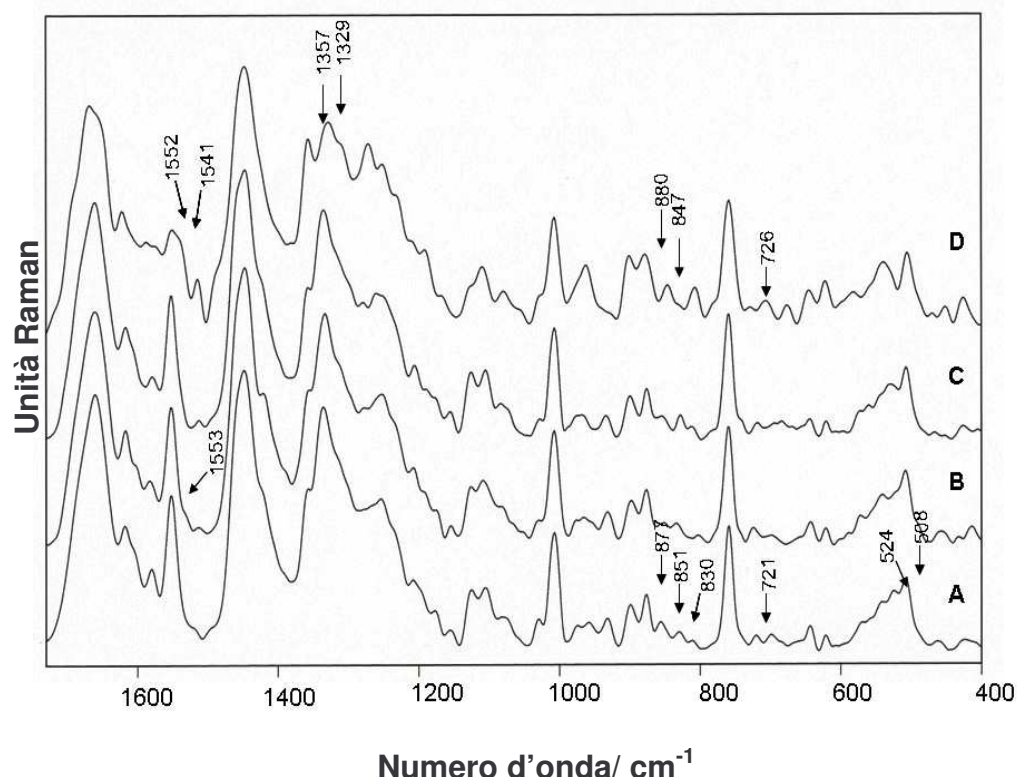


Figura 20 - Spettri Raman del lisozima nativo (A) e γ -irradiato a dosi di 33 Gy (B), 84 Gy (C) e 1000 Gy (D)

Tabella E - Percentuale di struttura secondaria del lisozima prima e dopo irradiazione a differenti dosi

Dose (Gy)	α -elica (%)	β -Sheet (%)	Random coil (%)
0	40	29	31
33	39	30	31
84	38	31	31
1000	24	42	34

A basse dosi di irradiazione non sembrano coinvolti né ponti disolfurici né residui di Met; infatti, le bande vibrazionali ν S-S e ν C-S non mostrano nessun cambiamento significativo. Solo al di sopra di 1000Gy l'intensità della banda a $\approx 510 \text{ cm}^{-1}$ si riduce, suggerendo un piccolo cambiamento nella quantità di ponti disolfurici *ggg*. La possibile rottura dei ponti disolfurici *ggg* potrebbe essere associata ai cambiamenti osservati nella banda del Trp. Infatti, in letteratura è riportata una correlazione tra il ponte disolfurico Cys64-Cys80, uno dei tre disolfuri con conformazione *ggg*, e il Trp62 e Trp63^{95,96,99}. Quindi, eventuali alterazioni o la rottura di questo ponte disolfurico indurranno dei cambiamenti nell'ambiente delle catene laterali dei residui amminoacidici, in particolare del Trp62 e Trp63.

Analogamente, si osservano variazioni anche nella banda della Met (fig. 20D). Questo risultato potrebbe essere spiegato considerando che nel lisozima i due residui di Met (Met-12 e Met-105) sono localizzati all'interno della struttura¹⁰⁰. Quindi, l'attacco dei radicali potrebbe risultare parzialmente schermato dall'organizzazione strutturale della proteina. Infatti la Met12 è localizzata in uno dei tratti ad α -elica del lisozima^{95,96}.

La riduzione dell' α -elica, che avviene alle più alte dosi di radiazioni, potrebbe consentire l'esposizione della Met, rendendola più suscettibile all'attacco radicalico.

3. γ -Radiolisi di una sospensione DOPC-LUVET contenente lisozima

Nella tabella D (pag. 40) sono riportate le percentuali di isomeri *trans* formati nelle vescicole di DOPC dopo irradiazione a differenti dosi e in presenza di lisozima.

Gli esperimenti di controllo, condotti in assenza di lisozima, non mostrano isomerizzazione, confermando il coinvolgimento della proteina nel danno radicalico ai lipidi insaturi.

I risultati riportati in tabella mostrano che la formazione di lipidi *trans* nel sistema contenente lisozima inizia a dosi più alte (84Gy) rispetto a quella della RNasi A.

Probabilmente il processo di generazione di radicali tiilici (RS•), formati dall'attacco dei residui solforati della proteina secondo il meccanismo

descritto in figura 17 (pag. 38), è un processo molto più lento, rispetto al precedente caso della RNasi A. In termini di isomerizzazione lipidica, si può dire che il lisozima raggiunge lo stesso risultato precedentemente osservato nella RNasi T1 (fig. 16). I primi residui ad essere esposti all'attacco dei radicali liberi possono essere quelli aromatici; successivamente i probabili cambiamenti strutturali della proteina potrebbero rendere i residui solforati più facilmente esposti all'attacco dei radicali.

DANNO RADICALICO DELLA METIONINA IN SOLUZIONE ACQUOSA E IN SOSPENSIONE LIPIDICA

Metionine e cisteine sono i due residui amminoacidici solforati comunemente presenti in peptidi e proteine. Nella degradazione per via radicalica della Met è ben noto che essa subisca un processo di ossidazione da parte dei radicali $\bullet\text{OH}$ dando origine a metionina solfossido. Tale degradazione è stata associata all'eziologia di alcune malattie, per esempio l'Alzheimer. I residui di Met presenti nelle sequenze proteiche possono mostrare una diversa facilità di ossidazione che è correlabile all'esposizione sulla superficie di questi residui. Negli anni '70 era stato studiato il processo di degradazione radicalica per via riduttiva, ovvero dovuta agli atomi di $\bullet\text{H}$ generati in condizioni acide⁸².

Già negli anni '60 Stein aveva riportato, per la RNasi A, che la metionina è bersaglio specifico dei radicali $\bullet\text{H}$ con formazione di acido α -amminobutirrico⁸¹.

Tali studi, tuttavia, non avevano trovato seguito, dal momento che essendo la percentuale di $\bullet\text{H}$ che si forma molto bassa rispetto agli $\bullet\text{OH}$, questi radicali erano considerati di minore importanza. Pertanto ad oggi, mancano informazioni sulla eventuale correlazione tra il danneggiamento della Met e la parallela formazione di lipidi *trans* nelle membrane.

Sulla base di queste considerazioni e dei risultati illustrati in precedenza sulla ribonucleasi A e sul lisozima, è sembrato interessante studiare se il sistema liposomi/metionina possa rappresentare un modello semplice per evidenziare lo stress radicalico in condizioni riduttive. Pertanto, nel presente paragrafo vengono descritti i risultati ottenuti utilizzando questo sistema in condizioni sperimentali che differiscono per pH, tampone e rapporti lipide metionina.

1. γ -Radiolisi di una sospensione POPC-LUVET contenente metionina

La figura 21 mostra la percentuale di elaidato in funzione della dose di irradiazione, in presenza della stessa concentrazione di Met e di diverse concentrazioni di lipidi. In tutti i casi, i radicali $\bullet\text{OH}$ sono stati bloccati con t-BuOH, mentre circa il 60% di $\bullet\text{H}$ reagiscono con la Met. La presenza di acido

palmitico come standard interno indica che gli isomeri *trans* si formano in modo quantitativo e senza nessuna reazione secondaria.

All'aumentare della concentrazione di lipidi l'isomerizzazione procede più lentamente e l'equilibrio tra isomeri *cis-trans* è più veloce quando gli e^-_{aq} sono bloccati con $H_2PO_4^-$ a basse concentrazioni di lipidi.

Infatti, l'isomerizzazione procede molto lentamente in presenza di N_2O che converte gli e^-_{aq} in radicali $\bullet OH$ e senza aumentare la resa di atomi di $\bullet H$.

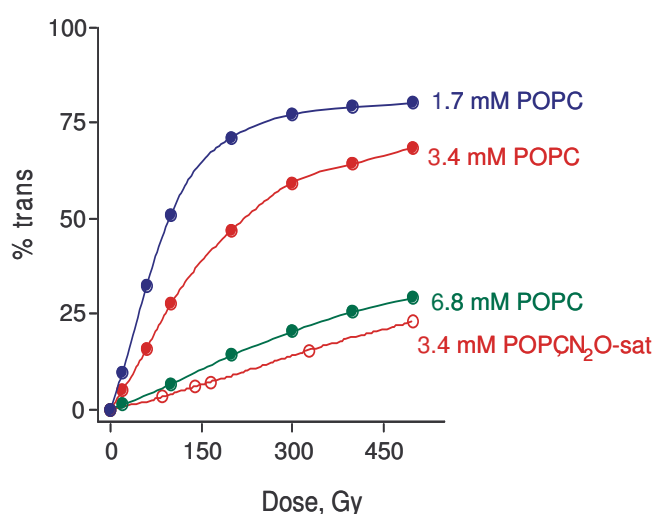


Figura 21 – Formazione di elaidato, in funzione della dose di radiazione, nell'isomerizzazione delle vescicole POPC mediante irradiazione di una sospensione di LUVET contenente Met ($60\mu M$) e $t\text{-BuOH}$ ($0,2M$).

Precedenti studi sulla reazione della degradazione della Met con l'atomo di $\bullet H$ hanno mostrato che il principale prodotto della degradazione della Met è l'acido α -amminobutirrico (ABA)⁸². Quindi, sulla base di questi dati la degradazione della metionina è stata studiata mediante analisi con HPLC e 1H NMR.

L'analisi mediante HPLC della Met irradiata mostra un consumo di Met che, alle dosi più alte, corrisponde a ~10% (tab. F, pag. 46). Ciò è in perfetto accordo con i risultati ottenuti mediante 1HNMR .

Tabella F – Consumo della metionina a diverse dosi di irradiazione

Dose	Consumo metionina
Gy	%
138	0.5
328	4.5
652	10.5

Infatti, lo spettro $^1\text{HNMR}$ mostra, a 535Gy, la formazione di un segnale di tripletto centrato a 0,86 ppm, corrispondente al gruppo metilico dell'ABA. Il gruppo metilico del CH_3OD è stato usato come riferimento per calcolare la quantità di ABA formatosi, che è esattamente corrispondente alla quantità di Met trasformata (~10%) (fig. 22).

Queste osservazioni, pertanto, confermano il meccanismo già descritto per la RNasi A. In figura 23 è schematizzato il meccanismo di degradazione ipotizzato per la metionina.

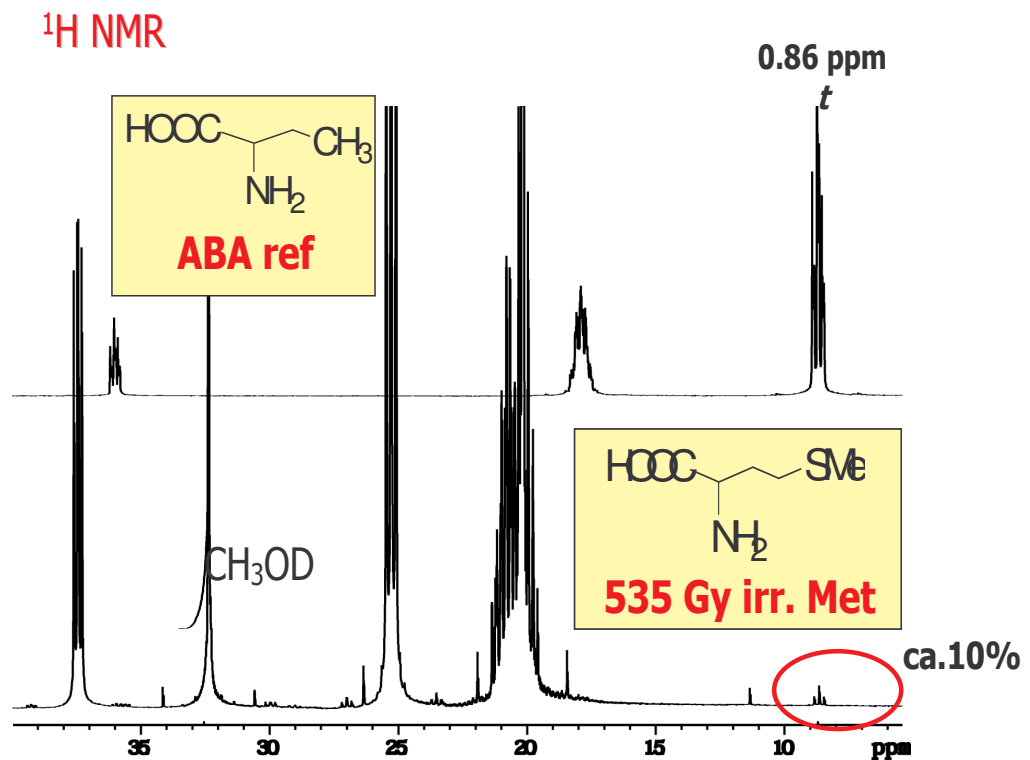


Figura 22 - Spettro ^1H NMR della conversione della metionina in acido α -aminobutirrico (ABA).

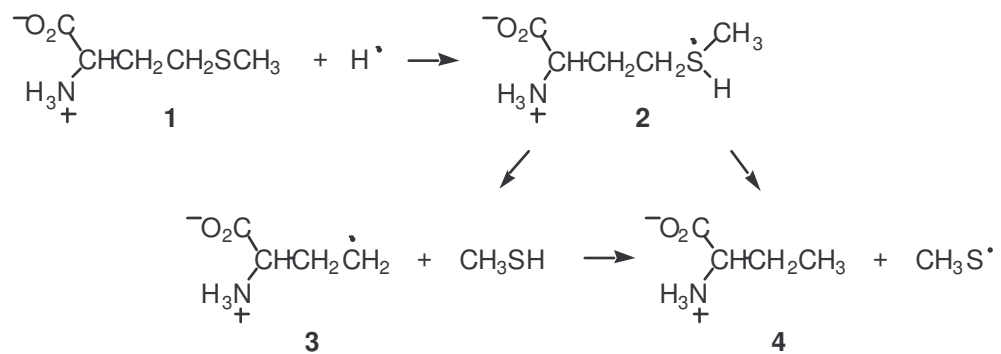


Figura 23 - Meccanismo proposto per la formazione di tiil radicali dalla metionina dopo γ -irradiamento. **1)** Metionina; **2)** sulfuranil radicale; **3)** formazione del metantiolo; **4)** formazione del tiil radicale.

DANNO RADICALICO DELLA β -AMILOIDE MEDIANTE γ -RADIOLISI E PEROSSINITRITO

Per l'elevato consumo di ossigeno, l'alto contenuto di lipidi e il basso livello di antiossidanti, il sistema nervoso centrale (CNS) è più vulnerabile ai danni indotti da specie radicaliche, di altri tessuti¹⁰¹.

Negli ultimi anni, ha suscitato grande interesse il ruolo dello stress ossidativo nell'invecchiamento e in alcune patologie neurodegenerative come l'Alzheimer (AD). Il cervello di persone affette dall'Alzheimer è caratterizzato da un incremento dei fenomeni di perossidazione lipidica, di ossidazione proteica e da un'alterazione nel contenuto di enzimi ad azione antiossidante¹⁰².

Le principali alterazioni microscopiche nell'AD sono le placche senili (SP), le neurofibrille tangenziali (NFT), la perdita di neuroni e di sinapsi.

Le NFT e le SP sono costituite da aggregati proteici filamentosi che si accumulano nelle regioni intraneuronali ed extracellulari. In particolare, le proteine tau iperfosforilate sono le principali costituenti delle NFT, mentre le catene di β -amiloide ($A\beta$) aggregano a formare le SP¹⁰³.

La β -amiloide è un piccolo polipeptide (4-4.5kDa) prodotto per proteolisi da un precursore (APP), una proteina transmembrana di notevoli dimensioni¹⁰³. In figura 24 è schematizzato il meccanismo di formazione della β -amiloide dall'APP. I principali tipi di β -amiloide presenti nelle SP sono $A\beta(1-40)$, formata da 40 residui amminoacidici e $A\beta(1-42)$ contenente 42 amminoacidi. Entrambi i peptidi sono presenti nel plasma e nel liquido cerebrospinale e differiscono per l'assenza in $A\beta(1-40)$ dei residui Ile41 e di Ala42 (fig. 25). il rapporto di concentrazione di $A\beta(1-40)$ e $A\beta(1-42)$ è di ~10:1.

1 10 20 30 40
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

Figura 25 –Sequenza amminoacidica di $A\beta(1-40)$

Entrambi i peptidi sono capaci di formare fibrille, sebbene questo processo sia più veloce per $A\beta(1-42)$ che, quindi, è la principale componente delle SP¹⁰⁴.

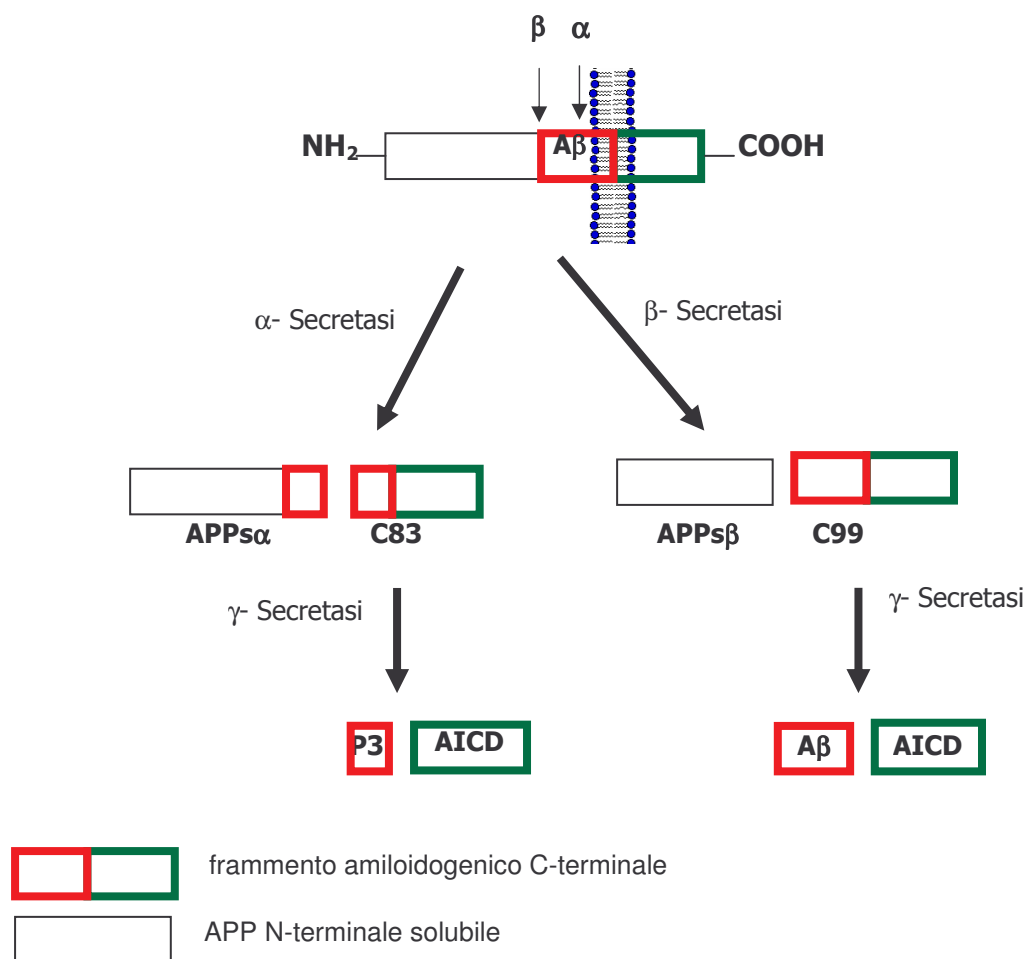


Figura 24 – Meccanismo di formazione della β-amiloide dalla porzione C-terminale del precursore APP. Il processo è catalizzato da due metallo proteasi: β e γ-secretasi. La β-secretasi taglia l'APP nella regione N-terminale della sequenza della β-amiloide generando il frammento C-terminale (C99). Il taglio di C99, catalizzato dalla γ-secretasi, genera la β-amiloide e il dominio intracellulare (AICD) di APP. Le α-secretasi catalizzano la formazione di una porzione N-terminale extracellulare solubile ed un frammento C-terminale (C83) che, per azione di una γ-secretasi, può generare un peptide non amiloidogenico (P3).

Recentemente sono stati proposti nuovi meccanismi di tossicità da parte della β -amiloide. Infatti, è stato suggerito che questo peptide potrebbe formare canali per il calcio nel doppio strato lipidico^{105,106}.

Inoltre, lo studio dell'interazione della β -amiloide con il doppio strato lipidico ha mostrato che diversi tipi di membrana possono essere stabilizzate o distrutte¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Parallelamente, è stato suggerito che la β -amiloide può generare spontaneamente perossido di idrogeno attraverso la riduzione del Fe^{3+} e del Cu^{2+} e che nel caso Cu^{2+} , l'His13 e His14 sono i bersagli iniziali¹¹⁰⁻¹¹².

Importanti *markers* dell'AD sono la nitratura e l'ossidazione delle proteine. La nitratura riguarda i residui di tirosina, mentre l'ossidazione interessa le metionina. La nitratura delle tirosine e l'ossidazione delle metionina sono modificazioni post-traduzionali con importanti implicazioni biologiche¹¹³.

In vivo, un limitato numero di proteine sono bersagli della nitratura e dell'ossidazione e nell'ambito di tali proteine, solo pochi e specifici residui di Tyr e Met possono essere modificati¹¹⁴. Queste modificazioni possono indurre nelle proteine perdita o guadagno di alcune funzioni¹¹⁵. Uno dei principali agenti responsabile della nitratura e dell'ossidazione è il perossinitrito (ONOO^-).

E' stato ipotizzato che nei sistemi biologici la formazione del ONOO^- procede attraverso la reazione riportata in figura 26.

La formazione del ONOO^- a partire dal $\text{NO}\cdot$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ è vicina al limite di diffusione controllata, con una costante di velocità media di $10^{10}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A pH 7,4, circa il 20% di perossinitrito è protonato ad acido perossinitroso (HOONO)^{116,117}. Le due specie, hanno differenti reattività e proprietà diffusionali. Una delle reazioni del ONOO^- , biologicamente più importante, è quella con il diossido di carbonio (CO_2), che è presente nei sistemi biologici a concentrazioni relativamente alte 1,3-1,5mM (fig. 26). La CO_2 reagisce velocemente con il perossinitrito ($k_R=4,6\times 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7,4) formando l'addotto ONOOCO_2^- ¹¹⁸.

L' ONOOCO_2^- genera due tipi di radicali: il diossido di azoto ($\text{NO}_2\cdot$) e l'anione carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). La quantità di radicali generata nel corso di questo processo non è nota. I radicali $\text{NO}_2\cdot$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ sono capaci di ossidare.

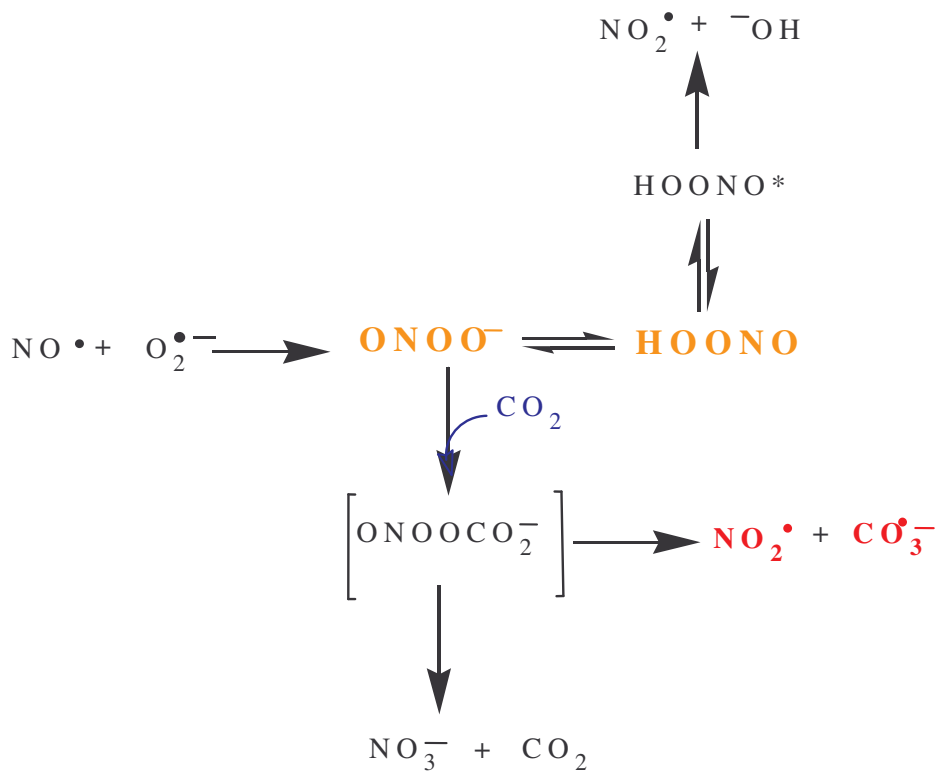


Figura 26 – Meccanismo di formazione del perossinitrito (ONOO^-) e dei radicali NO_2^\bullet e $\text{CO}_3^{\bullet-}$ mediante reazione dell' ONOO^- con il diossido di carbonio (CO_2)

direttamente un ampio *range* di biomolecole inducendo dimerizzazione, O^- transfer e più specificamente per NO_2^\bullet , nitratura dei residui di Trp e Tyr.

In vivo, il perossinitrito si forma in seguito ad un'eccessiva produzione di ossido nitrico (NO^\bullet), mediante la NO-sintasi, e di superossido ($O_2^{\bullet-}$), mediante la NADPH ossidasi, xantina ossidasi o in condizioni di carenza di superossido dismutasi (SOD)¹¹⁹. È stato proposto, che nei sistemi biologici, la nitratura della Tyr procede attraverso un meccanismo radicalico (fig. 27) con formazione di 3-nitrotirosina (3-NT) e 3,3-dinitrotirosina, mentre l'ossidazione della metionina può avvenire mediante due meccanismi: **1**) attraverso un'ossidazione bimolecolare diretta che forma metionina solfossido; **2**) mediante una forma attivata dell'acido perossinitroso ($ONOOH^*$), che può indurre la formazione di etilene attraverso l'ossidazione di un elettrone (fig. 28)¹²⁰.

1. γ -Radiolisi di $A\beta(1-40)$

Il peptide $A\beta(1-40)$ è stato irradiato in presenza di $NaNO_3$ e $NaHCO_3$ allo scopo di produrre i radicali NO_2^\bullet e $CO_3^{\bullet-}$ e sottoposto ad analisi mediante HPLC. Il profilo cromatografico mostra la comparsa a $\lambda=215nm$ di due nuovi picchi a $t_R=29,8min$ e a $t_R=37,4min$ (fig. 29b), assenti nel controllo (fig. 29a). Questi picchi, meglio visibili a $\lambda=320nm$, corrispondono all' ~8,5%, e al ~2,4%, rispettivamente (fig. 29c).

L'analisi mediante MALDI-TOF MS ha dimostrato che il picco a $t_R=35,6min$ è $A\beta(1-40)$ non modificata, con massa monoisotopica di 4328 Da (fig. 30a), mentre i picchi a $t_R=29,8 min$ e $t_R=37,4min$ sono caratterizzati, rispettivamente, da due prodotti di ossidazione (incremento di massa di 16 e 32Da) (fig. 30b). Il prodotto nitrato con massa monoisotopica 4375 Da, mostra un incremento di 45Da rispetto alla massa del peptide non modificato (4328 Da) (fig. 30c).

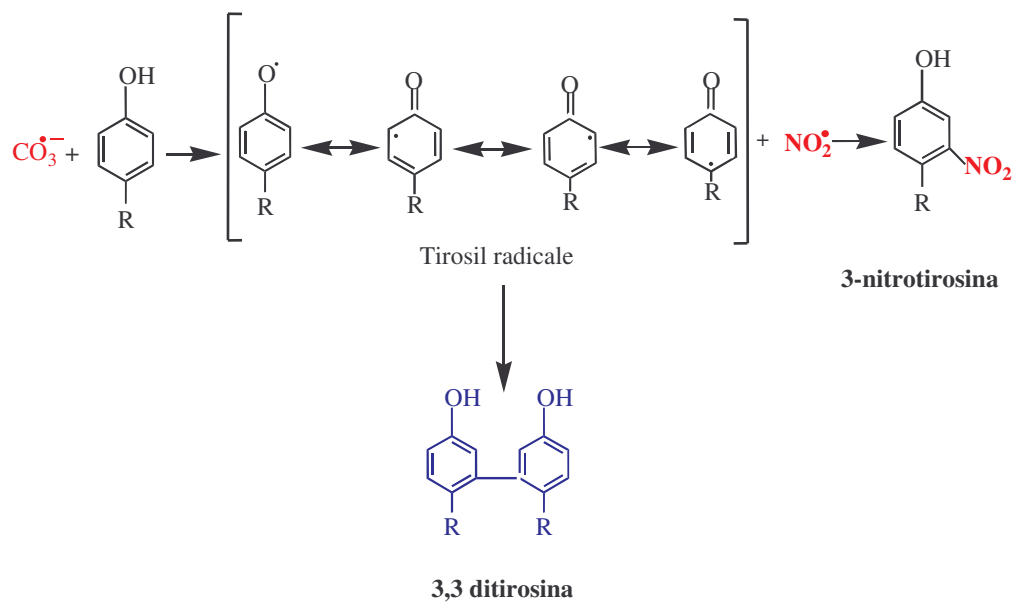


Figura 27- Meccanismo di formazione della 3-nitrotirosina (3-NT) e del dimero 3,3 ditirosina.

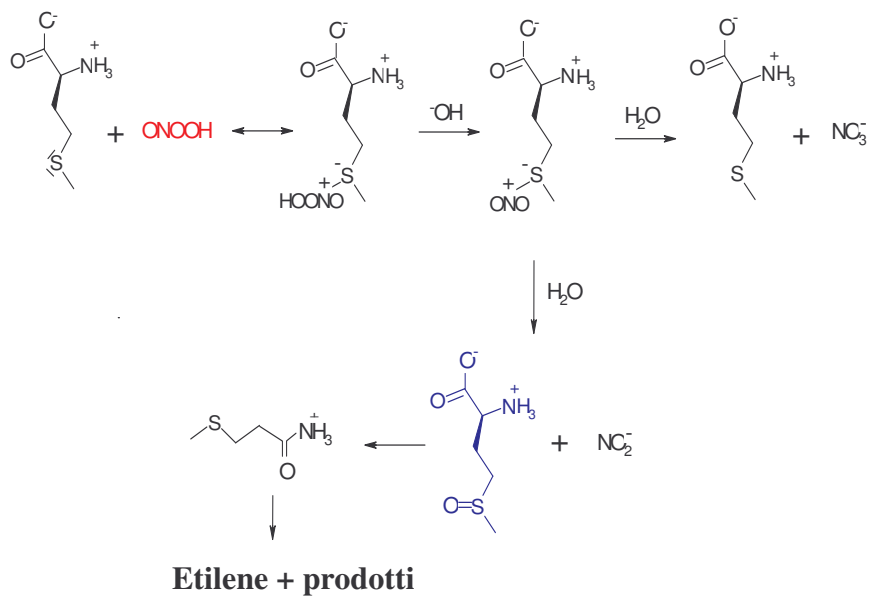


Figura 28 - Ipotesi di meccanismo per l'ossidazione della metionina mediante reazione con il perossinitrito.

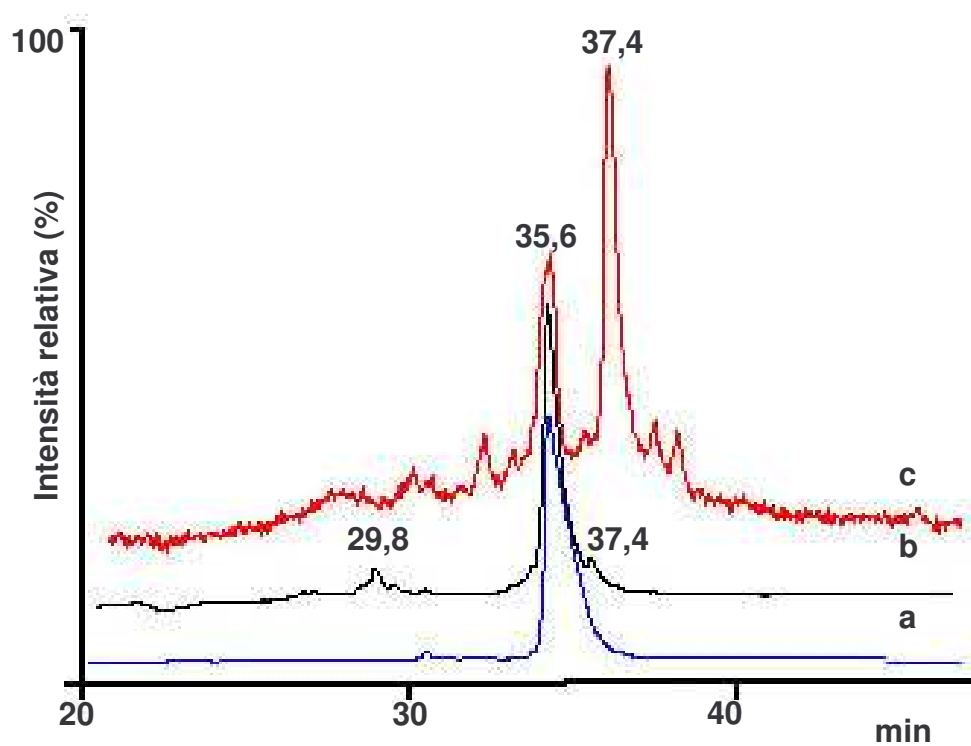


Figura 29 – RP-HPLC del peptide Aβ(1-40) irradiato in presenza di nitrato e carbonato. **a)** Aβ(1-40) non irradiata e rivelata a $\lambda=215\text{nm}$; **b)** Aβ(1-40) irradiata a 200Gy e rivelata a $\lambda=215\text{nm}$; **c)** Aβ(1-40) irradiata a 200Gy e rivelata a $\lambda=320\text{ nm}$.

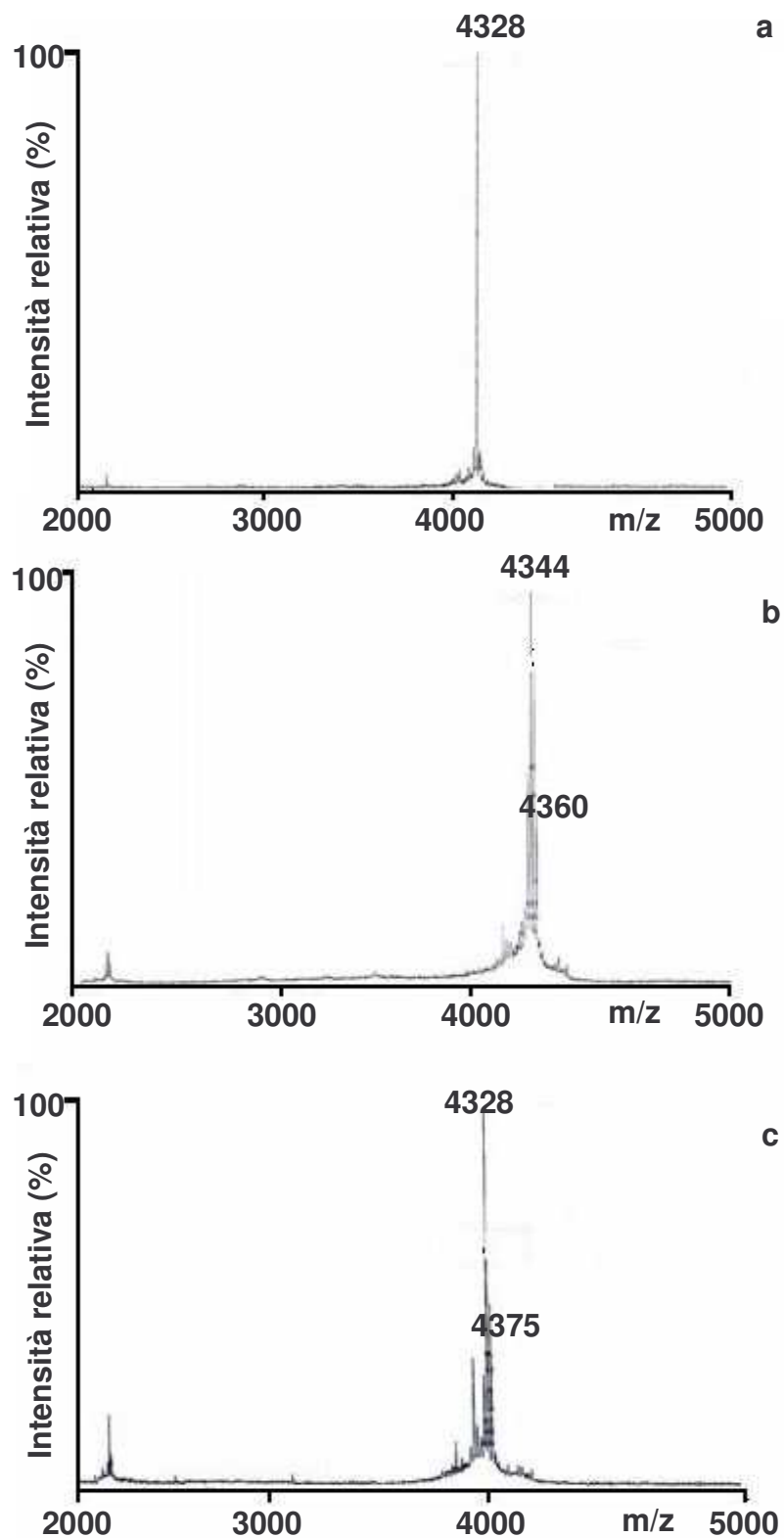


Figura 30 – MALDI-TOF MS dei prodotti di modificazione di A β (1-40) ottenuti mediante γ -radiolisi e isolati mediante RP-HPLC. **a)** A β (1-40) non modificata; **b)** A β (1-40) ossidata; **c)** A β (1-40) nitrata.

2. Reazione della A β (1-40) con il perossinitrito

L'analisi HPLC della A β (1-40) modificata con il perossinitrito, mostra un andamento simile a quello osservato dopo esposizione a radiazioni γ in presenza di nitrato e carbonato (fig. 31). Infatti, per il peptide trattato con ONOO⁻ si osserva la comparsa di due picchi, a $t_R=30,2$ min e a $t_R=38,4$ min (fig. 31b), assenti nel profilo cromatografico del peptide nativo (fig. 31a). Questi picchi sono meglio rivelati a $\lambda=320$ nm (fig. 31c) e corrispondono al ~2,8% e al ~12%, rispettivamente.

L'analisi mediante MALDI-TOF MS ha dimostrato che il prodotto a $t_R=36,7$ min contiene solo A β (1-40) nativa (4328 Da) (fig. 32a), mentre nella frazione eluita a $t_R=30,2$ min sono presenti due prodotti principali, uno con massa monoisotopica di 4344Da e l'altro corrispondente a 4360Da (incremento di massa di 16 e 32Da rispettivamente). Il picco eluito a $t_R=38,6$ min contiene il peptide nitrato con massa monoisotopica di 4375Da ed una componente a 4358Da. Quest'ultima potrebbe corrispondere al prodotto di decomposizione fotochimica della nitrotirosina indotto dall'interazione del laser¹²¹.

3. Digestione triptica della A β (1-40)

Allo scopo di identificare i siti di modificazione all'interno del peptide, l'A β (1-40) è stata digerita con tripsina e i prodotti analizzati mediante MALDI TOF MS (fig. 33). Dallo spettro si evidenzia che i frammenti triptici 1-16 (1955 Da), 6-16 (1336,6 Da) e 17-28 (1325,7Da) non sono modificati, al contrario del frammento contenente la sequenza 29-40. Infatti, le componenti con massa monoisotopica 1123Da e 1139Da sono esattamente 16 e 32Da più alte del peptide non modificato. Questo dato indica che nella sequenza 29-49 la Met35 è, probabilmente, il principale bersaglio dell'azione dei radicali NO₂[•] e CO₃^{•-}, indipendentemente da come siano generati (γ -radiolisi o reazione con perossinitrito). Questi risultati sono in accordo con quelli di letteratura secondo i quali la Met35 è particolarmente sensibile all'ossidazione, formando metionina solfossido. L'ossidazione di tale residuo è importante per l'attenuazione del processo di aggregazione alla base della formazione delle

SP¹²²⁻¹²⁴. Quindi, in condizioni di stress ossidativo, il perossinitrito potrebbe svolgere un ruolo importante nell'ossidazione dell'A β .

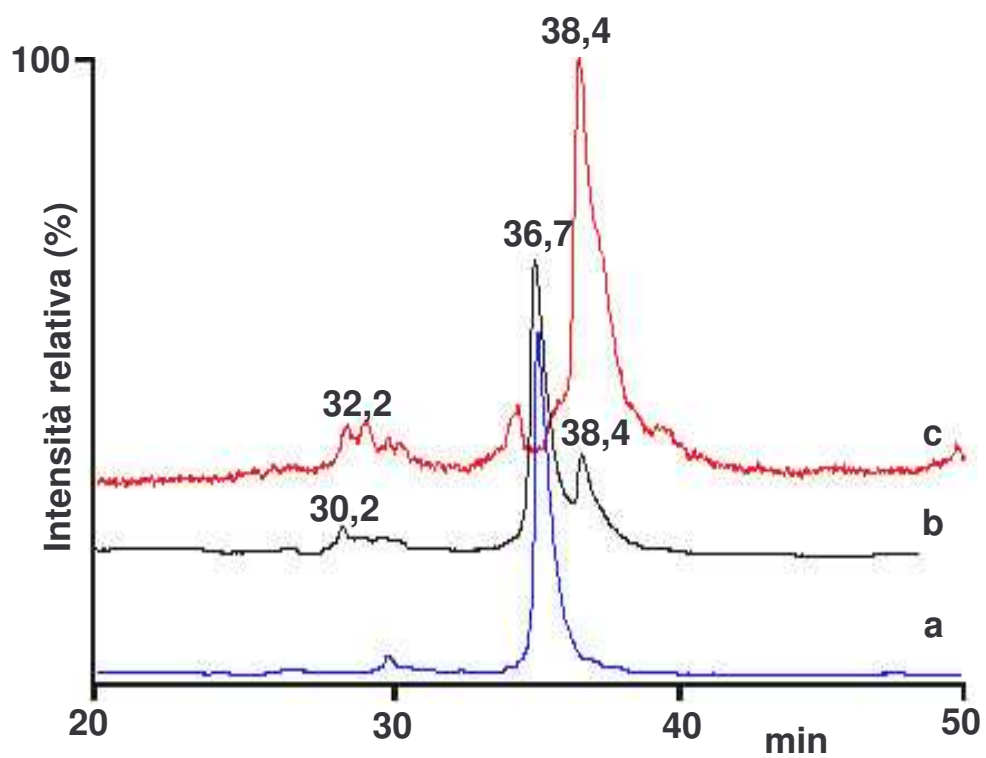


Figura 31 – RP-HPLC del peptide A β (1-40) nativo rivelato a $\lambda=215\text{nm}$ (a) del peptide modificato, mediante reazione con perossinitrito in presenza di carbonato rivelato a $\lambda=215\text{nm}$ (b) e a $\lambda=302\text{nm}$ (c).

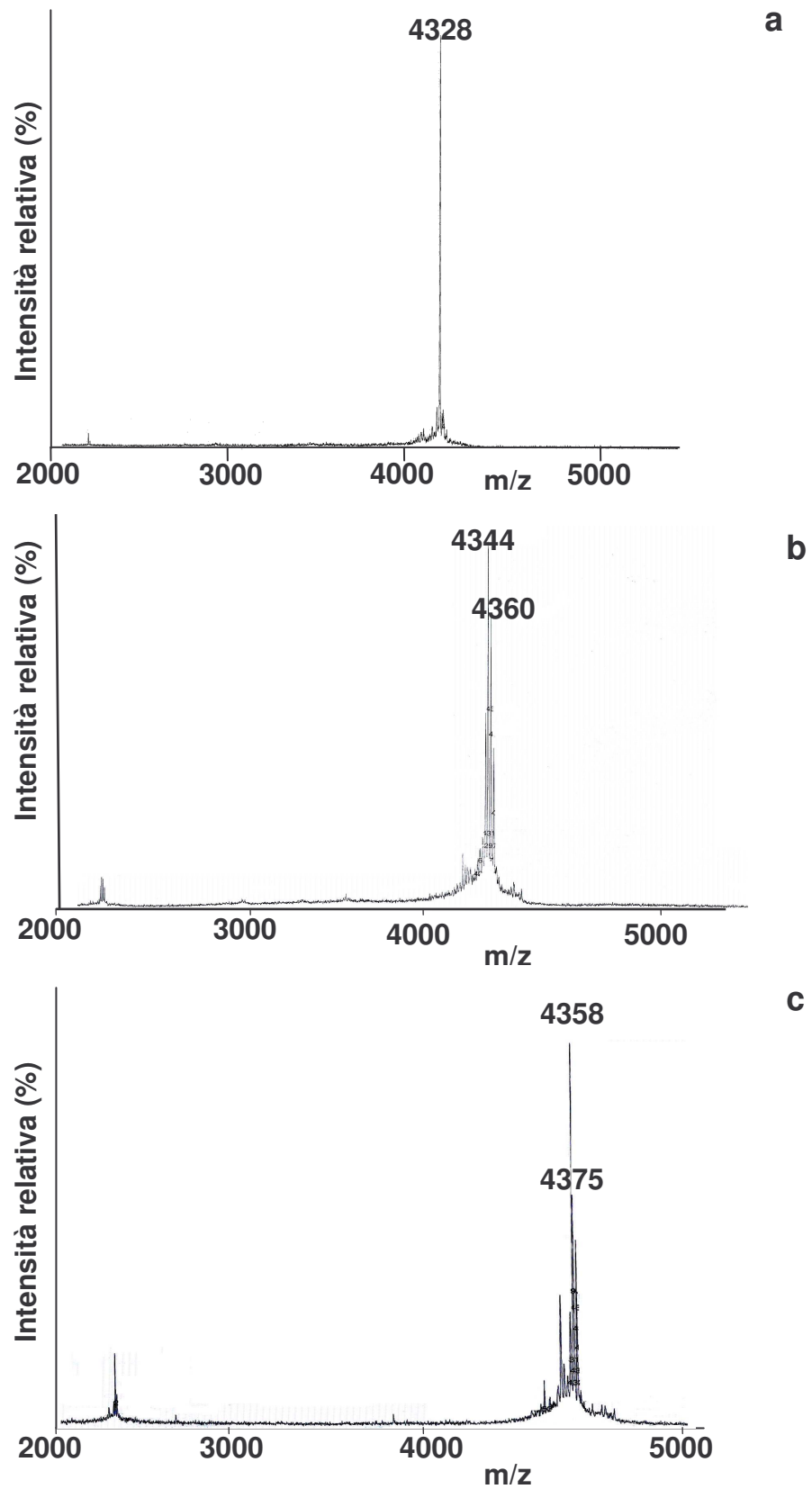


Figura 32 – MALDI-TOF MS dei prodotti di modificazione di A β (1-40) ottenuti mediante reazione con ONOO⁻ e isolati mediante RP-HPLC A β (1-40): **a)** non modificata; **b)** ossidata; **c)** nitrata.

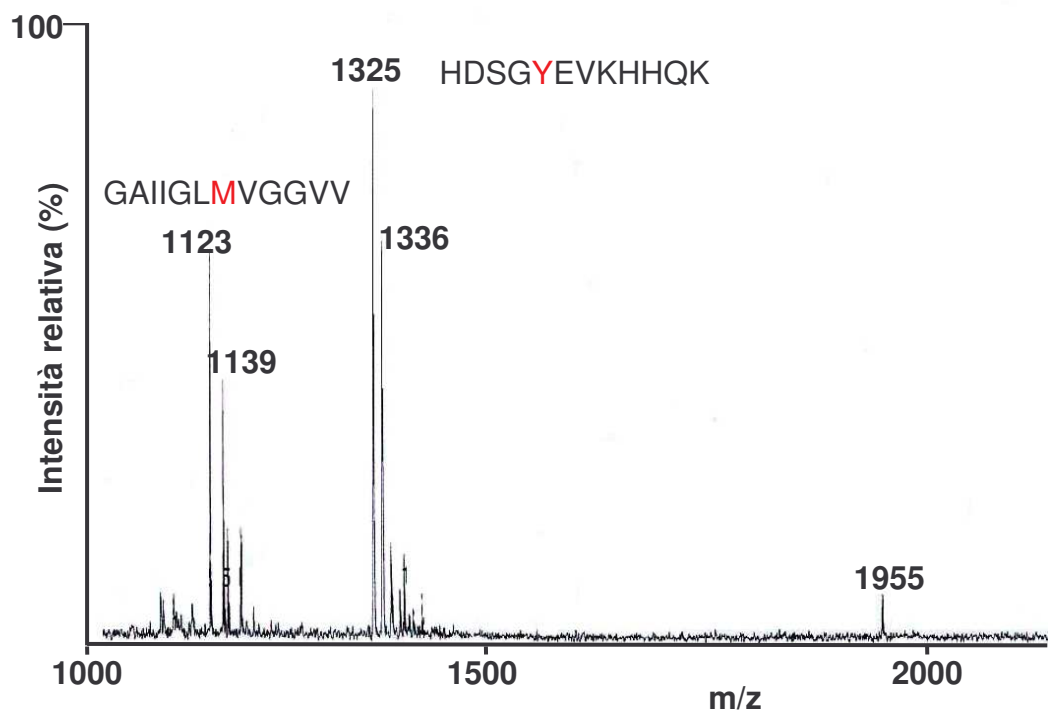


Figura 33 – MALDI-TOF MS della frazione contenete A β (1-40) modificata mediante reazione con ONOO $^-$, eluita da HPLC a $t_r=38$.min e digerita con tripsina.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi, è stato studiato il danneggiamento di alcune proteine modello in seguito ad attacco radicalico. A tale scopo i radicali sono stati generati mediante γ -radiolisi, tecnica che consente di selezionare il radicale di interesse variando opportunamente le condizioni sperimentali. In particolare nella ricerca svolta, è stato valutato principalmente il danneggiamento delle proteine ad opera dell'atomo di idrogeno, mimando, quindi, condizioni di stress radicalico riduttivo. Inoltre, sono state analizzate le modificazioni della β -amiloide, in seguito all'attacco di NO_2^\bullet e $\text{CO}_3^{\bullet-}$, radicali ad azione nitrante ed ossidante. I radicali NO_2^\bullet e $\text{CO}_3^{\bullet-}$, normalmente prodotti in condizioni di stress cellulare, sono stati generati con due sistemi sperimentali (γ -radiolisi e perossinitrito) allo scopo di valutarne le differenze e l'efficacia.

Sulla base dei dati ottenuti per la RNasi A e per il lisozima è stato osservato che $l^\bullet\text{H}$, rispetto all' $\bullet\text{OH}$ radicale, può agire in modo più selettivo, danneggiando specificamente particolari residui. Considerando gli studi di chimica e di cinetica condotti in precedenza da altri ricercatori, è stato ipotizzato che i principali bersagli dell' $\bullet\text{H}$ siano i residui di Met, che, se degradati, possono generare radicali diffusibili, til radicali^{81,82}.

Gli studi sulla β -amiloide hanno confermato che la Met è un bersaglio preferenziale sia nella γ -radiolisi che ad opera di perossinitriti. Questo dimostra che non solo i radicali prodotti *in vitro*, ma anche quelli che si formano naturalmente nella cellula (perossinitriti) possono indurre lo stesso tipo di danno alle macromolecole.

Inoltre, i risultati ottenuti dalle analisi biochimiche e spettroscopiche su RNasi A e lisozima hanno mostrato che l'entità del danno ad una proteina potrebbe dipendere non solo dalle proprietà chimico-fisiche dei radicali, ma anche dalla composizione in amminoacidi e dall'organizzazione tridimensionale della proteina stessa che, dunque, può essere più o meno accessibile al radicale.

Infatti, l'estensione del danno radicalico alla RNasi A e al lisozima evidenziato dai cambiamenti delle proprietà spettroscopiche e dell'attività

enzimatica, ha dimostrato che la RNasi A, nonostante la sua ben nota stabilità, viene rapidamente danneggiata. La perdita di gran parte della sua attività enzimatica si registra già a basse dosi di radiazioni. Al contrario, alle stesse dosi di radiazioni e a quelle più alte, il lisozima conserva gran parte dell'attività.

Questi risultati sono in perfetto accordo con quelli ottenuti mediante Spettroscopia Raman, che consente di seguire i cambiamenti strutturali delle proteine in funzione dell'irradiamento e, soprattutto, fornisce informazioni riguardo al destino di alcuni amminoacidi, aromatici e solforati. L'analisi degli spettri Raman ha dimostrato, sia per la RNasi A che per il lisozima, che le Tyr sono i residui più soggetti ad ossidazione. Infatti, esse possono essere direttamente ossidate dai radicali liberi e formare radicali fenossilici (TyrO•) o possono indurre, mediante trasferimento elettronico, l'ossidazione di altri residui, per esempio del Trp^{125, 126}. Inoltre, il Trp presente solo nel lisozima, è in grado di schermare gran parte dei radicali, ritardando l'ingresso di questi all'interno della proteina.

Allo scopo di confermare l'ipotesi del danneggiamento della metionina e la formazione di tiil radicali, è stato impiegato il sistema modello lipidi/proteine. Nel sistema contenente lisozima il processo di degradazione della Met inizia più lentamente e a dosi di radiazioni più alte rispetto alla RNasi A, come mostra la percentuale di isomeri *trans* formati. Questa degradazione va in parallelo con la riduzione di ciascuna attività enzimatica ed è sostenuta dalle variazioni spettrali osservate con la Spettroscopia Raman. Inoltre, la piccola percentuale di isomeri *trans* prodotta nei sistemi contenenti proteine non solforate o prive di Met sembrano confermare il principale coinvolgimento della metionina nella generazione di radicali diffusibili. In linea con questa affermazione sono i risultati ottenuti con il modello più semplice lipide/metionina.

L'impiego dei sistemi modello lipide/proteina ha permesso, per la prima volta, di ipotizzare un danno radicalico *tandem* che coinvolge contemporaneamente proteine e lipidi mediante la formazione di specie radicaliche diffusibili generate dal processo di degradazione della metionina all'interno di proteine solforate. Un danneggiamento *tandem* è molto più pericoloso di quello singolo che avviene nell'ambiente biologico, poiché un

danno *tandem* coinvolge, allo stesso tempo, più siti o molecole alterando i comuni sistemi di difesa e di riparazione delle cellule. La possibilità che due compartimenti apparentemente distinti, come quello acquoso e la fase lipidica, possano essere coinvolti contemporaneamente è stato studiato in pochi casi, tra cui nell'isolamento dei prodotti di accoppiamento tra i derivati della perossidazione lipidica e le proteine, i residui amminoacidici e gli acidi nucleici^{127,128}.

La formazione di lipidi *trans* nei liposomi è un metodo molto conveniente per determinare il danneggiamento di proteine solforate e può evidenziare tale danno anche in percentuali molto basse, dell'ordine di nanomoli.

La preparazione di modelli contenenti diverse proteine solforate e l'uso di diversi rapporti lipide/proteina consente una valutazione attenta e precisa del danno radicalico *tandem*.

I dati ottenuti dagli studi chimici in condizioni biomimetiche dimostrano che i tiil radicali sono efficienti catalizzatori dell'isomerizzazione *cis-trans* dei lipidi nel doppio strato e che tale trasformazione non può essere ignorata quando si considera il danneggiamento per via radicalica delle principali componenti biologiche.

Inoltre, l'analisi del processo di isomerizzazione *cis-trans* degli acidi grassi insaturi nei lipidi di membrana potrebbe essere un sistema molto sensibile per rivelare in una fase molto precoce, i fenomeni di stress radicalico che avvengono nelle cellule.

BIBLIOGRAFIA

1. Phospholipids Handbook (Ed.: G. Cevc), Marcel Dekker, New York, 1993.
2. Fave G, Coste TC, Armand M. *Cell Mol Biol* 2004, 50, 7, 815-31.
3. Small, D. M, and Steiner, J. *Plenum Press*, New York, 1986, 587-592.
4. B. G. Fox, K. S. Lyle, C. E. Rogge, *Acc. Chem. Res.*, 2004, 37, 421-429.
5. J. E. Baezinger, H. C. Jarrell, I. C. P. Smith, *Biochemistry* 1992, 31, 3377-3385.
6. R. M. Sargis, P. V. Subbaiah, *Biochemistry* 2003, 42, 11533-11 543.
7. .C. Roach, S. E. Feller, J. A. Ward, S. Raza Shaikh, M. Zerouga, W. Stillwell, *Biochemistry* 2004, 43, 6344-6351.
8. C. Ferreri, S. Pierotti, A. Barbieri, L. Zambonin, L. Landi, S. Rasi, P. L. Luisi, F. Barigelletti, C. Chatgililoglu, *Photochem. Photobiol.* 2005, DOI: 10.1562/2005-05-07-RA-518.
9. S.-L. Niu, D. C. Mitchell, B. J. Litman, *Biochemistry* 2005, 44, 4458-4465.
10. H. W. Cook, *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 531, 245-256.
11. G. M. Helmkamp, Jr., *Biochemistry* 1980, 19, 2050-2056.
12. F. A. Kummerow, Q. Zhou, M. M. Mahfouz, *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70, 832-838.
13. J. Rauch, J. Gumperz, C. Robinson, M. Skold, C. Roy, D. C. Young, M. Lafleur, D. B. Moody, M. B. Brenner, C. E. Costello, S. M. Behar, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 47 508-47 515
14. F. A. Kummerow, Q. Zhou, M. M. Mahfouz, *Am. J. Clin. Nutr.* 1999, 70, 832-838.
15. H. Keweloh, H. J. Heipieper, *Lipids* 1996, 31, 129 -137.
16. H. J. Heipieper, F. Meinhardt, A. Segura, *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 229, 1-7.
17. H. J. Heipeiper, G. Neumann, N. Kabelitz, M. Kastner, H. H. Richnow, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 66, 285-290.
18. V. Pedrotta, B. Witholt, *J. Bacteriol.* 1999, 181, 3256-3261.
19. H. Okuyama, A. Ueno, D. Enari, N. Morita, T. Kusano, *Arch. Microbiol.* 1998, 169, 29-35.
20. R. Holtwick, F. Meinhardt, H. Keweloh, *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4292-4297.
21. H. Keweloh, H. J. Heipieper, *Lipids* 1996, 31, 129-137.
22. L. J. Halverson, M. K. Firestone, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2414-2421.
23. Allison A. *Nature* 2002, 420, 600-601.
24. .L. P. L. van de Vijver *et al. Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 126-135.
25. Wolff R. L., Precht D., Molkentin P. In trans fatty acids in Human Nutrition; Sébédio J. L., Christie W. W., Eds. The Oily Press; Dundee, Scotland, 1998; Charter 1; pp 1-33.
26. Katan M.B., Zock P. L., Mensink R. P., *Annu. Rev. Nutr* 1995, 15, 473-493.
27. W. Schwarz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000, 102, 633-635.
28. A. Romero, C. Cuesta, F. J. Sanchez-Muniz, *Nutr. Res.* 2000, 20, 599-608.
29. Yu G, Bjorksten B., *Eur J Pediatr* 1998;157,298-303.
30. M. Bender Brandt, L. A. Le Gault, *J. Food Compos. Anal.* 2003, 16, 383-393.
31. R. L. Wolff, B. Entressangles, *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1211, 198 -206.
32. B. Koletzko, T. Decsi, *Clin. Nutr.* 1997, 16, 229-237.
33. J. L. SQbQ- dio, S. H. F. Vermunt, J. M. Chardigny, B. BeaufrQre, R. P. Mensink, R. A. Armstrong, W. W. Christie, J. Niemela, G. HWnon, R. A. Riemersma, *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 104-113.
34. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Eds.:D. E. Vance, J. E. Vance), 4th ed., Elsevier, Amsterdam, 2002.
35. U. Roy, O. Loreau, M. Balazy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 1019-1022.
36. O. Berdeaux, J. M. Chardigny, J. L. SQbQdio, T. Mairot, D. Poullain, J. M. VatWle, J. P. NoRl, *J. Lipid Res.* 1996, 37, 2244-2250.

37. O. Berdeaux, J. P. Blond, L. Bretillon, J. M. Chardigny, T. Mairiot, J. M. VatWle, D. Poullain, J. L. SQbQdio, *Mol. Cell. Biochem.* 1998, 185,17–25.
38. D. Anagnostopoulos, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, A. Samadi, A. Siafaka-Kapadai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 2766-2770.
39. Smith C.V., Jones D.P., Guentner T.M. Lash L. H. and Lanterburg B.H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, 140, 109-114.
40. Dunn M. A., Blabock t. L. and Cousins R. *J. Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 1987, 185, 109-114.
41. Chivers P. T., Prehoda K. E., Volkman B. F., Kim, B.-M.,Markley J. L. and Raines R.T. *Biochemistry* 1997, 36, 14985–14991.
42. Singh R. and Whitesides G. M. (1993) Thiol-disulfide exchange. In: *The Chemistry of Sulfur-Containing Functional Groups*, pp. 633–658, Patai S. and Rappoport, Z. (eds), Wiley, Chichester.
43. Bulaj G., Kortemme T. and Goldenberg D. P. *Biochemistry* 1998, 37, 8965-8972.
44. Narayan M., Weler E., Wedemeyer W. J. and Scheraga H. A. *Acc. Chem. Res.* 2000, 33:805–812.
45. Shin H.-C., Song M.-C. and Scheraga H. A. *FEBS Lett.* 2002, 521, 77–80.
46. Bulaj G., Kortemme T. and Goldenberg D. P. *Biochemistry* 1998, 37, 8965–8972.
47. Halliwell B. Gutteridge J.M. C. (eds) (2001) *Free radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, London.
48. Pogocki D. and Schoneich C. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 98-107.
49. Nauser T. and Schoneich C. *Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2042-2043.
50. Stubbe J. (2003) *Chem Commun.* 2511-2513- Buckel W. and Golding B. T. (1999) *FEMS Microb. Rev.* 22:523-541.
51. Wardman P. (1999) in *S-Centered Radicals*, pp. 289-309, Alfassi Z. B.(ed.), Wiley, Chichester.
52. Leussing D. L., Mislán J. P. and Goll R. J. (1960) *J. Phys. Chem.* 64: 1070–1073,
53. Jameson R. F., Linert W., Tschinkowitz A. and Gutmann V.(1988) *J. Chem. Soc. DaltonTrans.* 943–946,
54. Jameson R. F., Linert W., Tschinkowitz A. and Gutmann V.(1988) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2109–2112]
55. Shahid Akhlaq M., Schuchmann H.-P. and von Sonntag C. *Int. J. Radiat. Biol.* .1987, 51, 91–102,
56. Chatgililoglu C. and Guerra M. (1993) Thiyl radicals. In: *Supplement S. The Chemistry of Sulfur-Containing Functional Groups*, pp. 363–394, Patai S. and Rappoport Z.(eds), Wiley, Chichester,
57. Schöneich C., Dillinger U., von Bruchhausen F. and Asmus K.-D. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 292, 456–467.
58. C. Walling, W. Helmreich, *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 1144–1148.
59. C. Chatgililoglu, M. Ballestri, C. Ferreri, D. Vecchi, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 3826 –3831.
60. C. Chatgililoglu, C. Ferreri, *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 441-448.
61. C. Ferreri, C. Costantino, L. Perrotta, L. Landi, Q. G. Mulazzani, C. Chatgililoglu, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 4459 – 4468.
62. Yamamoto Y., Niki E., Kamiya Y. and Shimasaki H. *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 795, 332–340.
63. Barclay L. R. C. *Can. J. Chem.* 1993, 71, 1–16.
64. Chatgililoglu C., Ferreri C., Ballestri M., Mulazzani Q. G. and Landi L. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4593–4601.
65. Chatgililoglu C., Zambonin L., Altieri A., Ferreri C., Mulazzani Q. G. and Landi L. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 1681–1692.
66. H. Sies, *Free Radical Biol. Med.* 1999, 27, 916 –921.
67. von Sonntag C. (1987) *The chemical basis of radiation in biology*, Taylor and Francis, London.
68. Uppu R.M. and Pryor W. A. *Anal. Biochem.* 1996, 236, (2), 242-249.
69. Walsh D.M. *et al. J. Bio. Chem.* 1999, 274, 25945-25952.
70. Kunitz, M. *J. Biol. Chem.* 1946, 164, 563-568.
71. Shortman, K. *Biochim. Biophys. Acta* 1951, 51, 37-49.

72. Shugar, D. *Biochim. Biophys. Acta* 1952, 8, 302.
73. Faraone-Mennella, M.R.; De Lucia, F.; Gentile, N.; Quesada, P.; Farina, B. *J Cell Biochem* 1999, 76, 20-29.
74. *Liposomes a practical approach*; New, R. R. C., Ed.; IRL Press: Oxford, 1990.
75. *Liposofast*.
76. Chen JK, Chow SE *Chang Gung Med J.* 2005, 28, 6, 369-77.
77. Berg K., Jynge P., Bjerve K., Skarra S., Basu S., Wiseth R. *Free Radic Res.* 2005, 39, 6, 629-36.
78. Betteridge, D.J. *Metabolism* 2000, 49, 3-8
79. C. L. Hawkins, M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1504, 196–219.
80. Berisio, R.; Sica, F.; Lamzin, V.S.; Wilson, K.S.; Zagari, A.; Mazzarella, L. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, 58, 441-450.
81. R. Shapira, G. Stein, *Science* 1968, 162, 1489–1491.
82. L.K. Mee, S. J. Adelstein, *Radiat. Res.* 1974, 60, 422–431.
83. W.M. Garrison, *Chem. Rev.* 1987, 87381.
84. Valko M, Morris H, Cronin MT. *Curr Med Chem.* 2005, 12, 10, 1161-208.
85. D. Steinberg, J. Witztum, *Circulation* 2002, 105, 2107.
86. A.B. Ross, W.G. Mallard, W.P. Helman, G.V. Buxton, R.E. Huie, P. Neta, NDRL-NIST Solution Kinetic Database—Ver. 3, Notre Dame Radiation Laboratory, Notre Dame, IN and NIST Standard Reference Data, Gaithersburg, MD, 1998.
87. Yamamoto, O. In Protein Crosslinking, Biochemical and Molecular Aspects; Friedman M. (Ed); New York: Plenum Press, 1977; pp. 509-547.
88. Giulivi C., Traaseth N.J., Davies K.J.A., *Amino Acids* 2003, 25, 227-232
89. Marciani D.J.; Tolbert B.M., *Biochem Biophys Acta* 1972, 271, 262-273.
90. Arviex J.; Regnault V., Hachulla E., Darnige L., Berthou F., Youinou P., *Throm Haemost* 2001, 86, 1070-1076.
91. H. E. van Wart, A. Lewis, H. A. Scheraga, F. D. Saeva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973, 70, 2619–2623.
92. R. C. Lord, N. T. Yu, *J. Mol. Biol.* 1970, 51, 203–213.
93. Ferreri C., Manco I., Faraone-Mennella M. R., Torreggiani A., Tamba M., Chatgililoglu C., *ChemBioChem* 2004, 5, 1710-1712.
94. A. J. Hulbert, N. Turner, L. H. Storlien and P. L. Else, *Biol. Rev.* 2005, 80, 155-169.
95. C.C.F. Blake, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma, *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 167 (1967) 365.
96. D.C. Phillips, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1967, 57, 484.
97. T. Miura, H. Takeuchi, I. Harada, *J. Raman Spectrosc.* 1989, 20, 667.
98. H. E. van Wart, A. Lewis, H. A. Scheraga, F. D. Saeva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973, 70, 2619–2623.
99. M.C. Chen, R.C. Lord, R. Mendelsohn, *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 328, 252.
100. S.D. Maleknia, J.G. Kiselar, K.M. Downard, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 53.
101. Coyle J., T. Puttfarcken P., *Science* 1993, 262, 689-695.
102. William R. Markesbery *Free Radical Biology & Medicine* 1997, 23, 134-147.
103. Harper JD., Lansbury PT Jr., *Annual Review of Biochemistry* 1997, 66, 385-407.
104. Seilheimer B. et al. *J. Struct. Biol.* 1997, 119, 59-7,.
105. Tickler AK, Wade JD, Separovic F. *Protein Pept Lett.* 2005, 12, 6, 513-9.
106. Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. *Peptides.* 2002, 23, 7, 1311-5.
107. Kremer J. J., Sklansky D. J., Murphy R. M. *Biochemistry* 2001, 40, 8563-8571.
108. Curtain C.C. et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 20466-20473.
109. Yip C. M., McLaurin J., *Biophys. J.* 2001, 80, 1359-1371.
110. SchÖneich C., Williams T. D., *Chem. Res. Toxicol.* 2002, 15, 717-722.
111. K Hensley, JM Carney, MP Mattson, M Aksenova, M Harris, JF Wu, RA Floyd and DA Butterfield *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 3270-3274.
112. Kanski J. Varadarajan S. Aksenova M., Butterfield D. A., *Biochem. Biophys. Acta* 2001, 1586, 190-198.

113. Ischiropoulos H., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 356, 1-11.
114. Souza JM, Daikin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 371, (2), 169-178.
115. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos, H. *FEBS Lett.* 2001, 385, 63-66.
116. Huie R. E., Padmaja S *Radic Res Commun.* 1993, 18, 195-199.
117. Goldstein S. and Czapski G. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 19, 505-510.
118. Vesela A, Wilhelm J *Physiol Res.* 2002; 51,4, 335-9.
119. Shiva S, Oh JY, Landar AL, Ulasova E, Venkatraman A, Bailey SM, Darley-Usmar VM *Free Radic Biol Med.* 2005, 38, 3 , 297-306.
120. Alvarez B, Radi R. *Amino Acids.* 2003, 25, 3-4, 295-311.
121. Aaron Sarver, N. Karoline Scheffler, Martin D. Shetlar, and Bradford W. Gibson *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2001, 12, 439-448.
122. Palmblad M., Westlind-Danielsson A., Bergquist J., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 19506-19510.
123. Hou L., Kang I., Marchant R. E., Zagorski M. G. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 40173-40176.
124. Bitan G. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125 15359-15365.
125. Vogt W. *Free Radic Biol Med* 1995, 18, 93-105.
126. Prutz W.A, Butler J., Land E. J., *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985, 47, 149-156.
127. K. Uchida, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 4544-4548.
128. J. R. Requena, M. X. Fu, M. W. Ahmed, A. I. Jenkins, T. J. Lyons, J. W. Baynes, S. R. Thorpe, *Biochem. J.* 1997, 322, 317-325.