

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E

NATURALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

Tesi di Laurea

Studio dei meccanismi di regolazione dell'espressione di una nuova

classe di glutatione transferasi: *GST-Omega*

Candidato

Relatore

Cecilia Monacci

Prof. Alessandro Casini

Anno Accademico 2005/2006

Ai miei genitori e a mio fratello

INDICE

INDICE DELLE ABBREVAZIONI	pag. 8
RIASSUNTO	pag. 10
ABSTRACT	pag. 14
INTRODUZIONE	pag. 18
Glutatione transferasi Omega (GSTO)	pag. 20
<i>LA REGIONE G (G-SITE) E IL RICONOSCIMENTO DEL GSH</i>	pag. 25
<i>LA REGIONE H (H SITE)</i>	pag. 27
Organizzazione genomica delle glutazione transferasi Omega	pag. 29
Attività enzimatiche delle GSTO umane	pag. 30
<i>ATTIVITÀ TIOLTRANSFERASICA</i>	pag. 30
<i>ATTIVITÀ DEIDROASCORBATO REDUTTASICA</i>	pag. 32
<i>ATTIVITÀ MONOMETILARSENATO (MMA^V) E DIMETILARSENATO (DMA^V) REDUTTASICA</i>	pag. 36

<i>MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI CANALI INTRACELLULARE DEL CALCIO</i>	pag. 40
<i>RUOLO NELLA PROCESSAZIONE POST-TRADUZIONALE DELLA INTERLEUCHINA-1</i>	pag. 43
SCOPO DELLA TESI	pag. 47
MATERIALI E METODI	pag. 50
Colture cellulari	pag. 50
<i>LINEA CELLULARE DI MELANOMA Me665/2/21</i>	pag. 50
<i>Condizioni di coltura</i>	pag. 50
<i>LINEA CELLULARE U937</i>	pag. 51
<i>Condizioni di coltura</i>	pag. 51
Trattamenti sperimentali e preparazione dei campioni per Immunoblotting	pag. 52
<i>TRATTAMENTO CON TNF-α</i>	pag. 52
<i>EFFETTO DELL' AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE</i>	pag. 52
<i>PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI</i>	pag. 53
Trattamenti sperimentali e preparazione degli	

estratti cellulari per RT-PCR	pag. 53
<i>TRATTAMENTO CON TNF-α</i>	pag. 53
<i>AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE</i>	pag. 54
<i>ESTRAZIONE DELL'RNA</i>	pag. 54
<i>QUANTIFICAZIONE DELL'RNA</i>	pag. 55
Trattamenti sperimentali e preparazione degli estratti cellulari per l'EMSA	pag. 56
<i>TRATTAMENTO CON TNF-α</i>	pag. 56
<i>AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE</i>	pag. 56
<i>PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI NUCLEARI</i>	pag. 57
Preparazione del citosol	pag. 58
Determinazione della concentrazione proteica	pag. 58
Elettroforesi delle proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)	pag. 59
Immunoblotting	pag. 61

<i>TRASFERIMENTO E INCUBAZIONE CON L'ANTICORPO PRIMARIO E SECONDARIO</i>	pag. 61
<i>RIVELAZIONE DELLA REAZIONE ANTIGENE ANTICORPO TRAMITE CHEMIOLUMINESCENZA</i>	pag. 62
EMSA (Electroforesis Mobility Shift Assay)	pag. 63
<i>IBRIDAZIONE DELLA SONDA</i>	pag. 63
<i>ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN CONDIZIONI NON DENATURANTI</i>	pag. 64
<i>SOUTHERN BLOT</i>	pag. 65
<i>RIVELAZIONE DELLA SEQUENZA BIOTINILATA TRAMITE CHEMIOLUMINESCENZA</i>	pag. 66
Reverse Trascriptase Polymerase Chain reaction (RT-PCR)	pag. 67
RISULTATI	pag. 71
A) Trattamento con TNF-α	pag. 71
<i>RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE IMMUNOBLOTTING</i>	pag. 71
<i>RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE RT-PCR</i>	pag. 76

<i>ATTIVAZIONE DEL FATTORE TRASCRIZIONALE NFκB. Risultati dell'analisi tramite Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	pag. 78
<i>RISULTATI DEL PRETRATTAMENTO CON PARTENOLIDE SULL'ATTIVAZIONE DI NFκB</i>	pag. 80
B) Effetto dell'aumento della densità cellulare sulla espressione delle GSTO	pag. 82
<i>RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE IMMUNOBLOTTING</i>	pag. 82
<i>RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE RT-PCR</i>	pag. 84
<i>RISULTATI DELL'ANALISI IMMUNOBLOTTING SULLA LINEA CELLULARE U937</i>	pag. 87
<i>RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY</i>	pag. 88
Appendice	pag. 90
<i>IMMUNOBLOTTING EFFETTUATO SU CITOSOL DI TESTICOLO E UTERO UMANO</i>	pag. 90
DISCUSSIONE	pag. 91
LETTERATURA CITATA	pag. 100

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

AA = acido ascorbico

AA \cdot = radicale semideidroascorbato

DHA = acido deidroascorbico

DHAR = deidroascorbato reduttasi

BSA = albumine from bovine serum

CLIC = chloride intracellular channel

CRID = cytokine release inhibitory drug

D.O. = densità ottica

DTT = ditiotreitolo

DMA^{III} = dimetilarsenito

DMA^V = dimetilarseniato

MMA^{III} = monometilarsenito

MMA^V = monometilarseniato

EDTA = acido etilendiamminotetra acetico

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

EMSA = electrophoretic mobility shift assay

EST = expressed sequence tag

GAPDH = gliceraldeide tre fosfato deidrogenasi

GSH = glutatione

GST = glutatione transferasi

HEPES = [N-(2-idrossietil)piperazina-N'-(acido 2-etansulfonico)]

IL-1 = interleuchina 1

LPS = lipopolisaccaride

MAPEG = membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione

NFkB = nuclear factor kappa B

PBS = phosphate buffered saline

PBS-T = phosphate buffered saline-tween 20

RT-PCR = Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SDS = sodio dodecil solfato

SDS/PAGE = elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

TNF- α = tumor necrosis factor- α

U.V. = ultravioletti

RIASSUNTO

Le glutazione transferasi (GST) sono una superfamiglia di enzimi detossificanti di fase II che, utilizzando il glutatione come cofattore, contribuiscono alla biotrasformazione di numerosi composti di natura esogena ed endogena, come agenti cancerogeni, farmaci e prodotti dello stress ossidativo (Townsend D.M. et Tew K.D., 2003).

La superfamiglia delle GST si suddivide in tre famiglie: citosoliche, mitocondriali e MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (Ladner J.E. & al., 1999; Robinson A. & al., 2004). La superfamiglia delle GST citosoliche è la più ampia ed è costituita da proteine estremamente polimorfe. Nell'uomo sono state identificate varie classi denominate: α , μ , π , θ , ζ , σ ; recentemente è stata aggiunta una nuova classe denominata omega (GSTO) (Board P.G. & al., 2000).

L'enzima deidroascorbato reduttasi, purificato per la prima volta nel 1994 dal fegato di ratto nel laboratorio in cui ho svolto la presente tesi (Maellaro E. & al. 1994), è il capostipite di questa nuova classe di glutatione transferasi. Nel 1998, il cDNA di tale enzima è stato clonato (Ishikawa T. & al., 1998). Nel 1999 un gruppo americano ha clonato il cDNA di una nuova proteina murina (p28) che veniva sovraespressa in una linea di

linfoma radioresistente (Kodym R. & al., 1999). Gli stessi autori hanno inoltre inserito in banca dati la sequenza dell'omologa proteina umana. Successivamente nel 2000 Board et al. hanno raggruppato queste tre proteine in un'unica classe di GST, cui hanno dato il nome di classe Omega (Board P.G. & al., 2000).

Le proteine appartenenti alle GSTO mostrano caratteristiche assai peculiari: sono prive di attività glutatione transferasica, ma sono dotate di numerose altre funzioni di grande importanza nella risposta allo stress cellulare quali l'attività tioltransferasica e deidroascorbato reduttasica, la modulazione del trasporto del calcio, l'attivazione post-traduzionale di altre proteine, la risposta allo shock di natura termica e chimica e l'intervento nel metabolismo dell'arsenico (Board P.G. & al., 2000; Dulhunty A. & al., 2000; Laliberte R.E. & al., 2003; Kodym R. & al., 1998; Zakharyan R.A. & al., 2001). Nell'uomo esistono due forme di GSTO, la GSTO1 e la GSTO2 (Whitbread A.K. & al., 2003). Entrambe sono localizzate sul cromosoma 10, sono costituite da 6 esoni, possiedono nel sito attivo una cisteina in posizione 32 e all'estremità terminale una coda di 19 amminoacidi con caratteristiche peculiari di questa classe di GST (Whitbread A.K. & al., 2003).

E' noto che altre GST e shock protein vengono indotte dal TNF- α e dall'aumento della densità cellulare (Mehlen P. & al., 1995; Garrido C. &

al., 1997; Morceau F. & al., 2004). Abbiamo quindi deciso di adottare questi modelli sperimentali al fine di studiare i possibili meccanismi di regolazione dell'espressione della GSTO1 e della GSTO2.

Le linee cellulari utilizzate sono state due: una linea cellulare di melanoma umano Me665/2/21 e la linea cellulare U937. Le due linee cellulari differiscono per le modalità di crescita: la prima (Me665/2/21) cresce adesa al substrato, mentre la seconda (U937) cresce in sospensione. L'analisi mediante di Immunoblotting su cellule di melanoma umano Me665/2/21 ha dimostrato come, in entrambi i modelli sperimentali, sia possibile osservare un aumento dell'espressione della GSTO. Il siero anti-GSTO1, attualmente in uso, non permette però di distinguere tra le due forme (GSTO1 e GSTO2), perché interagisce anche con la GSTO2. Ulteriori indagini, condotte mediante tecniche di RT-PCR hanno permesso di dimostrare che il trattamento con il TNF- α provoca un aumento del solo mRNA della GSTO1, mentre l'aumento della densità cellulare induce un aumento del solo mRNA della GSTO2.

E' noto che molti effetti della stimolazione con TNF- α sono mediati dall'attivazione del fattore nucleare NFkB (Delhalle S., et al. 2004). Tale attivazione è stata confermata anche nel nostro modello sperimentale tramite EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Esperimenti condotti mediante Immunoblotting, impiegando il partenolide (inibitore di

NFκB (Delhalle S., et al. 2004)), hanno mostrato che l'inibizione dell'attivazione di NFκB blocca anche l'aumento della GSTO (valutato tramite Immunoblotting) indotto dal TNF-α. Questi dati fanno pertanto supporre che il gene per la GSTO1 faccia parte del pattern di geni la cui trascrizione è regolata da NFκB.

Per quanto riguarda l'induzione della GSTO2 all'aumentare del grado di densità cellulare, tale induzione si osserva nelle cellule di melanoma, ma non nelle U937 che crescono in sospensione. In entrambe le linee cellulari non si osserva attivazione di NFκB all'aumentare della densità cellulare. Questi dati fanno supporre che l'induzione della GSTO2 non dipenda dal semplice aumento del numero di cellule, ma da altri fenomeni legati alla confluenza cellulare quali l'adesione al substrato, l'aumento delle giunzioni intercellulari, l'arresto del ciclo cellulare, etc.

ABSTRACT

The glutathione transferases (GSTs) are a super-family of phase II detoxification enzymes that, using the glutathione as a cofactor, contributed to the bio-transformation of many compounds both of endogenous and exogenous nature, like cancerous agents, drugs and oxidizing stress products. (Townsend D.M. et Tew K.D., 2003).

In the GST super-family three smaller families are included: the cytosolic, the mitochondrial and the MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) one (Ladner J.E. & al., 1999; Robinson A. & al., 2004). The cytosolic GST family, which is the largest of the three, is composed of extremely polymorphous proteins. In human being many classes have been identified. These are named: α , μ , π , θ , ζ , σ . Recently, the Omega class (GSTO) has been added to the group (Board P.G. & al., 2000).

Dehydroascorbate reductase, which was purified from rat liver in 1994 in the lab where I carried out this thesis, is the first member of this new glutathione transferases class (Maellaro E. & al., 1994). In 1998, the cDNA of the enzyme was cloned (Ishikawa T. & al., 1998). In 1999 an American group succeeded in cloning the cDNA of a new mouse protein (p28)

overexpressed in a radio-resistant lymphoma cell line (Kodym R. & al., 1999). The above scientists could also sequence a human protein with a high grade homology and they filed the sequence in GenBank (U90313). Then, in 2000 Board et al. grouped these three proteins in just one new GST class, that they named Omega class (Board P.G. & al., 2000).

The proteins belonging to the GSTO class show peculiar features: they lack any glutathione transferase activity while they are endowed with many other functions so relevant to the answer to the cell stress, i.e. the thioltransferase activity, the dehydroascorbate reductase activity, the calcium transport modulation, the post-translational activation of other proteins, the response to the thermal/chemical shock, the participation in the arsenic metabolism (Board P.G. & al., 2000; Dulhunty A. & al., 2000; Laliberte R.E. & al., 2003; Kodym R. & al., 1998; Zakharyan R.A. & al., 2001).

In humans two different forms of GSTO are found, the GSTO1 and the GSTO2 (Whitbread A.K. & al., 2003). Both are localized onto the chromosome 10 and they consist of 6 exons, both have a cysteine in position 32 inside the active site and a characteristic 19 amino acid tail at the N-terminus (Whitbread A.K. & al., 2003).

It is well known that overexpression of GST and small heat shock proteins can be induced by TNF- α and by increase in the cell density (Mehlen P. &

al. 1995; Garrido C. & al., 1997; Morceau F. & al., 2004). So we chose to adopt these experimental models with the purpose of studying the possible mechanisms able to regulate the GSTO1 and the GSTO2 expression.

Two are the cell lines utilized to the purpose: a cell line from a human melanoma Me665/2/21, and a cell line named U937. The two cell lines are different in the growth pattern: the first one (Me665/2/21) develops adherent to the substratum, while the second one (U937) develops in suspension. The analysis by means of the Immunoblotting on the human melanoma Me665/2/21 proved, in both the experimental models, that an increase in the expression of the GSTO is observable. But the serum anti-GSTO1, at the moment in use, unfortunately doesn't help to distinguish between the two forms (GSTO1 and GSTO2) because it interact also with GSTO2. Further investigations by means of RT-PCR could proved that the TNF- α treatment causes an increase just in the GSTO1 mRNA, while a raise in the cell density induces an increase just in the GSTO2 mRNA. It is known that many an effect deriving from the stimulation with TNF- α are mediated by the nuclear transcription factor NFkB activation (Delhalle S. & al., 2004). This activation was confirmed, in our experimental model too, by means of EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Experiments on cells treated with parthenolide (NFkB inhibitor)(Delhalle S. & al.,2004) showed that upon inhibition of the NFkB activation, the expected increase

of the GSTO (estimated by means of Immunoblotting) induced by TNF- α is blocked. These data let suppose that the GSTO1 gene belongs to the pattern of genes whose transcription is ruled by NF κ B.

With reference to the GSTO2 induction at the increase in the cell density, it was observed that this induction was present in the melanoma cells but not in the U937 cells that grow in suspension. In both the cell lines no NF κ B activation was observed at the increase in the cell density. Consequently, it was derived that the GSTO2 induction doesn't simply depend on the increase of the cell number, but it is a consequence of other phenomena linked to the cell confluence, like the adhesion to the substratum, the increase in the intercellular junctions, the cell cycle block.

INTRODUZIONE

Le glutathione transferasi (GST) costituiscono una superfamiglia di enzimi detossificanti di fase II, che catalizzano la coniugazione del glutathione (GSH) con substrati elettrofili di natura esogena ed endogena. Tramite tale attività, le GST contribuiscono allo smaltimento di un gran numero di xenobiotici elettrofilici, quali tossici, cancerogeni chimici, inquinanti ambientali e farmaci. Molte GST possiedono inoltre altre attività, quali la riduzione GSH-dipendente dei perossidi, reazioni di isomerizzazione e sintesi di eicosanoidi (Townsend D.M. & Tew K.D., 2003).

Esistono tre principali famiglie di proteine, ampiamente diffuse in natura, dotate di attività GSH transferasica. Due di queste famiglie, le GST citosoliche e le GST mitocondriali, comprendono enzimi solubili e sono solo lontanamente correlate tra di loro, mostrando qualche somiglianza nella loro conzione tridimensionale (Robinson A. & al., 2004; Ladner J.E. & al., 2004; Holm P.J. & al., 2002). Le GST citosoliche derivano da un comune gene ancestrale, che nel tempo ha subito numerose modificazioni come duplicazioni, ricombinazioni genetiche e mutazioni, che hanno portato alla differenziazione tra le diverse GST (Townsend D.M. & Tew K.D., 2003). La terza famiglia, strutturalmente diversa dalle due precedenti,

è costituita dalle GST microsomiali ed è ora nota con la sigla MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (Holm P.J. & al., 2002). Esiste anche un'ulteriore famiglia di transferasi, rappresentata dalle proteine batteriche FosA e FosB responsabili della resistenza alla fosfomicina (Armstrong R.N. & al., 2000). Variazioni, determinate geneticamente, nei livelli dell'attività e/o dell'espressione di alcune GST sono identificate come fattori di rischio nello sviluppo di alcune forme tumorali (Strange R.C. & Fryer A.A., 1999), nell'acquisizione della resistenza ai farmaci (Hayes J.D. & Pulford D.J., 1995; O'Brien M.L. & Tew K.D., 1996; Tew K.D., 1994; Hall A.G. & al., 1994), e nell'insorgenza della malattia di Parkinson (Menegon A. & al., 1998).

Le GST sono di particolare interesse per farmacologi e tossicologi perché forniscono bersagli utili per le terapie antiasmatiche e antitumorali (Evans J.F. & al., 1991; Matsushita N. & al., 1998; Jakobsson P.J. & al., 1999a) e perché metabolizzano agenti chemioterapici, insetticidi, erbicidi, cancerogeni e prodotti dello stress ossidativo.

L'esposizione ad agenti proossidanti provoca un aumento dell'espressione delle GST in microbi, piante, insetti, pesci e mammiferi (Allocati N. & al., 2003; Veal E.A. & al., 2002; Leiers B. & al., 2003; An J.H. & al., 2003;

Desikan R. & al., 2001; Wang M.C. & al., 2003; Kobayashi M. & al., 2002).

Le GST citosoliche rappresentano la famiglia più numerosa di transferasi e funzionano in forma dimerica come omo o eterodimeri (questi ultimi si formano solo tra subunità della stessa classe)(Ladner J.E. & al., 2004).

Gli enzimi MAPEG e alcune GST citosoliche catalizzano l'isomerizzazione di vari composti insaturi (Jakobsson P.J. & al., 1999b; Khojasteh-Bakht S.C. & al., 1999; Dixon D.P. & al., 2000) e sono intimamente coinvolte nella sintesi delle prostaglandine e dei leucotrieni (Hayes J.D. & McLellan L.I., 1999; Jakobsson P.J. & al., 1999b).

Nell'uomo sono state identificate sette classi di GSTs citosoliche : α , μ , π , θ , ζ , σ e Omega. Quest'ultima classe, indicata con la sigla GSTO, è di recente identificazione (Board P.G. & al., 2000) ed è stata l'oggetto di studio della presente tesi. Descriverò pertanto in maggior dettaglio le principali caratteristiche di questa nuova classe di glutathione transferasi.

Glutathione transferasi Omega (GSTO)

La prima GSTO, identificata nel ratto come deidroascorbato reduttasi (DHAR), è stata purificata e caratterizzata nel laboratorio dove ho svolto la presente tesi (Maellaro E. & al., 1994; Ishikawa T. & al., 1998). La DHAR

è stata purificata dal fegato del ratto in base alla sua capacità di catalizzare la riduzione, GSH dipendente, dell'acido deidroascorbico ad acido ascorbico. La proteina è largamente espressa in tutti i tessuti del ratto, raggiungendo i livelli più alti nel fegato, nel rene e nell'apparato gastroenterico (Paolicchi A. & al., 1996). Successivamente, nel 1998, è stato clonato il cDNA di tale enzima e ne è stata approfondita la caratterizzazione molecolare (Ishikawa T. & al., 1998).

Nel 1999 un gruppo americano ha clonato il cDNA di una proteina murina di 28 KDa (p28) che risultava sovraespressa in una linea di linfoma dopo l'acquisizione della radioresistenza (Kodym R. & al., 1999). La sequenza aminoacidica della p28, formata da 240 aminoacidi, mostra un'identità del 81,2% con la sequenza della DHAR di ratto. Il relativo mRNA è espresso in molti tessuti e il fegato e il cuore ne contengono le più alte concentrazioni (Kodym R. & al., 1999). Gli Autori non sono stati in grado di identificare caratteristiche funzionali di tipo enzimatico della suddetta proteina, ma hanno ipotizzato, sulla base di analogie di sequenza, che sia una heat shock protein di basso peso molecolare. Infatti la p28 in seguito all'innalzamento della temperatura trasloca dal citoplasma, dove normalmente si trova, al nucleo.

Gli stessi Autori hanno inoltre inserito in banca dati la sequenza di un'omologa proteina umana (GenBank accession number U90313) che ha un'identità del 76.5% con la DHAR del ratto.

Nel 2000 il gruppo di P.G. Board ha effettuato uno studio volto all'identificazione di nuovi membri della famiglia delle glutatione transferasi sulla base delle similitudini di sequenza. A tal fine gli Autori hanno svolto la loro ricerca su data base EST (Expressed Sequence Tag) contenente sequenze uniche espresse all'interno del genoma umano, usando come riferimento sequenze amminoacidiche delle GST θ e ζ (Board P.G. & al., 2000). Questa ricerca ha portato all'identificazione del cDNA di una nuova proteina con caratteristiche tipiche della famiglia delle GST. Gli stessi Autori hanno notato però che una sequenza identica era già stata immessa in GenBank (U90313) e che in altre banche dati si trovavano sequenze altamente simili relative a proteine di altre specie animali e, per l'esattezza, la sequenza della p28 del topo, quella della DHAR del ratto e quella di una proteina di un nematode (*Caenorhabditis elegans*) (Board P.G. & al., 2000; Kodym R. & al., 1999; Ishikawa T. & al., 1998). Queste sequenze avevano rispettivamente un'identità del 72%, 76% e 34% con quella della proteina umana.

Eseguendo un'analisi filogenetica, basata sull'allineamento con sequenze rappresentative delle varie classi di GST, gli Autori (Board P.G. & al.,

proteina ricombinante in condizioni native forma un omodimero (GSTO 1-1).

La GSTO 1-1 mostra scarsa attività con i principali substrati delle GST, quale ad esempio il 1-cloro-2,4-dinitrobenzene. Al pari della omologa proteina del ratto mostra invece attività DHA reduttasica. L'attività tiol-transferasica (misurata con il classico substrato, idrossietil disulfuro) risulta però di gran lunga la più alta. In conclusione la GSTO 1-1 umana mostra attività molto simili a quelle della glutaredossina, differenziandosi pertanto dalle altre GST (Board P.G. & al., 2000; Whitbread A.K. & al., 2003).

La struttura cristallina è stata determinata sul complesso covalente tra GSTO 1-1 e GSH (Board P.G. & al., 2000). Sebbene la GSTO 1-1 presenti una modesta identità di sequenza con le GST di cui è nota la struttura cristallina, essa adotta chiaramente la tipica conformazione delle GST. Vi sono due domini: un dominio N-terminale tioredossina-simile e un dominio C-terminale interamente strutturato in α -eliche. Il dominio N-terminale contiene 4 foglietti β , intercalati con 3 α eliche ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$). Delle sette α -eliche del dominio C-terminale, cinque ($\alpha 4$ – $\alpha 8$) sono comuni alla maggior parte delle GST, ma le ultime due ($\alpha 9$ e $\alpha 10$) si piegano indietro sul dominio N-terminale, costituendo una struttura tipica di questa classe. Questa estensione C-terminale forma molti legami ad idrogeno con il dominio N-terminale, formando con esso una superficie continua.

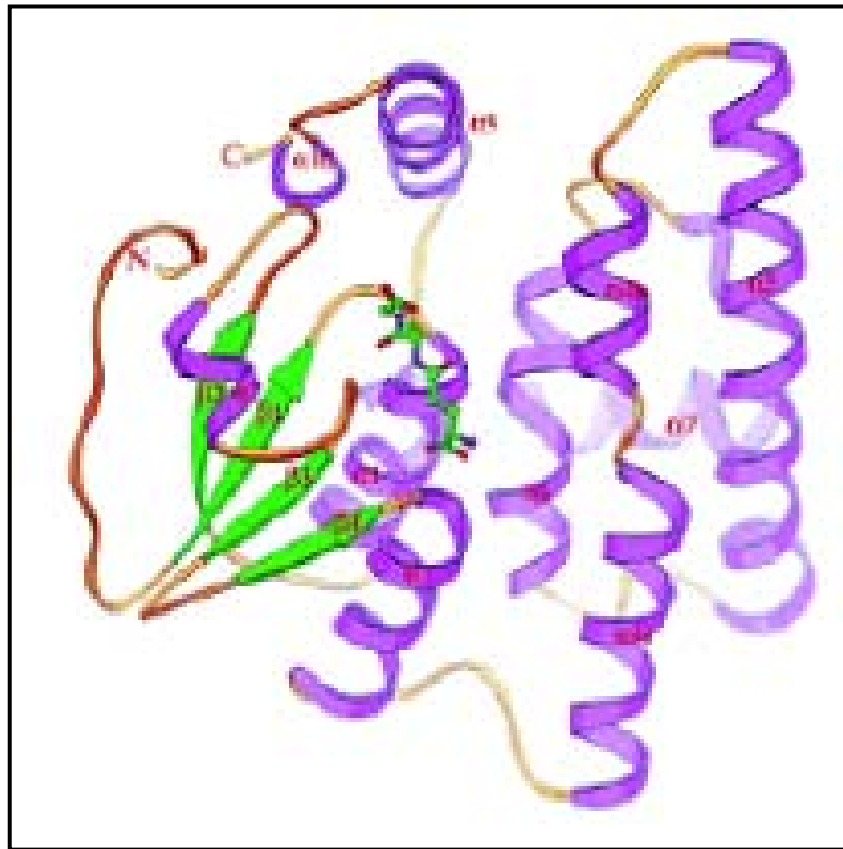


Fig. 2. Struttura della GSTO1-1 umana. Rappresentazione del monomero. Da Board P.G. & al., 2000.

LA REGIONE G (G SITE) E IL RICONOSCIMENTO DEL GSH.

Con il termine “G-site” si indica quella parte della proteina deputata al legame con il GSH. Due caratteristiche distinguono la GSTO 1-1 dalle tipiche GST per quanto concerne questa regione.

La prima consiste nella presenza di una cisteina in posizione 32 in grado di formare un disolfuro misto con il GSH. Non è però chiaro quale residuo del

sito catalitico possa stabilizzare la forma tiolata del GSH, cosa necessaria per la classica funzione delle GST di trasferimento del GSH stesso su di un gruppo elettrofilo (Armstrong R.N., 1997). Per la GSTM 2-2 è stato suggerito che lo spostamento di un residuo di arginina carico positivamente nella tasca catalitica promuova la ionizzazione del sulfidrilico del GSH (Patskovsky Y.V. & al., 2000). Nella GSTO 1-1 non ci sono gruppi chimici in prossimità della cisteina 32 in grado di svolgere tale funzione.

La Cys-32 è localizzata nella parte N-terminale di $\alpha 1$, con il tiolo collocato precisamente sopra l'asse dell'elica. Questa posizione è esattamente quella della cisteina N-terminale del motivo Cys-Xaa-Xaa-Cys della tioredossina e della glutaredossina. E' molto verisimile che questa sia la struttura determinante per il funzionamento della GSTO 1-1.

La seconda caratteristica originale della GSTO 1-1 è data dall'assenza di interazioni tra il GSH legato ad una catena polipeptidica e gruppi dell'altro polipeptide. Nelle altre strutture note di GST vi è un legame salino tra l'azoto N-terminale del GSH e un residuo acido sull'elica $\alpha 4$ della seconda subunità. Questo non avviene nella GSTO 1-1 perchè il residuo corrispondente è Lys-122.

Il dimero GSTO 1-1 presenta un'insolita configurazione aperta a forma di V. I contatti tra le due subunità sono limitati alle catene laterali di $\beta 4$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$. Gran parte delle interazioni alla interfaccia sono di tipo non polare;

infatti sono presenti solamente due legami salini e mancano totalmente legami a idrogeno. L'orientamento dei monomeri all'interfaccia corrisponde a quello osservato in altre strutture cristalline di GST, ma l'interfaccia è più aperta che negli altri dimeri di GST. L'area nascosta all'interfaccia misura 1960 \AA^2 , mentre nella maggior parte dei dimeri delle altre GST misura $2700\text{-}3400 \text{ \AA}^2$.

Da tutti gli altri punti di vista, il legame del GSH è del tutto analogo a quanto si osserva nelle altre GST: tutte le interazioni tra GSH e proteina avvengono a livello del dominio N-terminale e i residui che contribuiscono al legame con il GSH sono conservati o conservativamente sostituiti.

LA REGIONE H (H SITE)

La maggior parte delle GST catalizzano la coniugazione del gruppo tiolico del GSH con un gruppo elettrofilo, spesso componente di uno xenobiotico tossico con caratteri in parte idrofobici. La struttura tipica delle GST prevede una regione, chiamata regione H, che contiene un dominio idrofobo ed è situata in vicinanza del sito di legame al GSH, regione G. La regione H è formata da elementi sia del dominio N- che C-terminale e le variazioni a questo livello tra le varie classi di GST riflettono le diverse specificità di substrato.

La GSTO 1-1 possiede una ben definita cavità in corrispondenza della regione H presente nelle altre GST e si presume pertanto che rappresenti una zona di legame con altre molecole. Tuttavia, data la presenza dei residui Trp-222 e Arg-183, la tasca risulta molto meno idrofobica rispetto alle regione H delle altre GST.

In conclusione l'interfaccia particolarmente aperta tra le subunità e la natura relativamente polare della regione H, suggeriscono che il substrato della GSTO 1-1 potrebbe essere una molecola di grosse dimensioni e non altamente idrofobica. Il legame con un'altra proteina appare quindi possibile. Considerando che la principale attività osservata nella GSTO 1-1 è quella tiol-transferasica GSH-dipendente, si può ipotizzare che tra i substrati naturali vi siano peptidi S-tiolati. E' noto, ad esempio, che in seguito ad uno stress ossidativo un gran numero di proteine forma addotti S-tiolati (disolfuri misti) con il GSH o la cisteina, con possibile inattivazione o cambiamento di funzioni enzimatiche delle proteine interessate (Seres T. & al., 1996; Hanson S.R. & al., 1999; Ravichandran V. & al., 1994; Jahngen-Hodge J. & al., 1997). Una possibile funzione della GSTO 1-1 potrebbe pertanto essere quella di ridurre questi disolfuri, con ripristino della funzionalità delle proteine colpite (Board P.G. & al., 2000).

Organizzazione genomica delle Glutathione Transferasi Omega

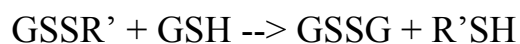
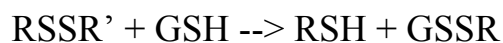
Il gruppo di P.G. Board ha proceduto successivamente allo studio della organizzazione genomica della GSTO1 (Whitbread A.K. & al., 2003). Tramite la “fluorescence *in situ* hybridization” (FISH), il gene della GSTO1 é stato localizzato nel cromosoma 10 e, precisamente, nella regione 10q24.3. Nel corso di questi studi é stata evidenziata la presenza, sul cromosoma 10, di un secondo gene della classe omega, cui é stato dato il nome GSTO 2. Questo gene, al pari del GSTO 1, ha sei esoni e si trova 7,5 kb al di sotto del gene GSTO 1. E’ verisimile pertanto che sia il risultato di una duplicazione genica. Il relativo cDNA codifica per una proteina di 243 residui aminoacidici con il 64% di identità con la proteina GSTO 1 composta da 241 residui. E’ noto che i geni codificanti gli enzimi di ciascuna classe di GST tendono a trovarsi in “clusters” su cromosomi distinti. Ad esempio i geni che codificano per le GST di classe α sono localizzati nel cromosoma umano 6p12, quelli della classe μ in 1p13.3, quelli della classe θ in 22q11.2, ecc. Nessun gene di GST era stato fino ad ora localizzato sul cromosoma umano 10; pertanto la localizzazione di GSTO 1 e 2 in questo locus rappresenta un ulteriore dato a supporto della classificazione filogenetica delle GST omega come una classe distinta di GST.

Nel corso di questa ricerca é stato individuato un terzo gene di classe omega (GSTO 3p) sul cromosoma 3. Questo gene mostra un'alta omologia con la regione codificante di GSTO 1; tuttavia, data la sua mancata rappresentazione nella banca dati EST, l'assenza di sequenze introniche e la sua collocazione cromosomica diversa dalla GSTO 1 e dalla GSTO 2, sembra verosimile che si tratti di uno pseudogene.

Attivita' enzimatiche delle GSTO umane

ATTIVITA' TIOLTRANSFERASICA

La tioltransferasi, conosciuta anche come glutaredossina, é un membro delle tiolo-disolfuro ossidoreduttasi. E' una piccola proteina citosolica con un peso molecolare di 11,8 kDa. Catalizza in maniera specifica la riduzione di proteine tiolate dal GSH (PSSG) (Chrestensen C.A., 1995) La reazione procede nel seguente modo:



Dove R e R' rappresentano rispettivamente i tioli proteici e quelli non proteici. Pertanto la riduzione di PSSG avviene tramite formazione di

GSSG che viene poi riciclato a GSH grazie all'azione della glutatione reduttasi.

Una significativa attività osservata nella GSTO1-1 è la capacità di agire, al pari della glutaredossina, come tioltransferasi GSH dipendente (Board P.G. & al., 2000). Tale capacità é mostrata, in misura pressochè simile, dalla GSTO2-2 (Schmuck E.M. & al., 2005). Sembra che questo tipo di attività dipenda dal fatto che la Cys-32 potrebbe funzionare come centro nucleofilo, ipotesi basata sulla omologia strutturale con la tioredossina e la glutaredossina (Board P.G. & al., 2000).

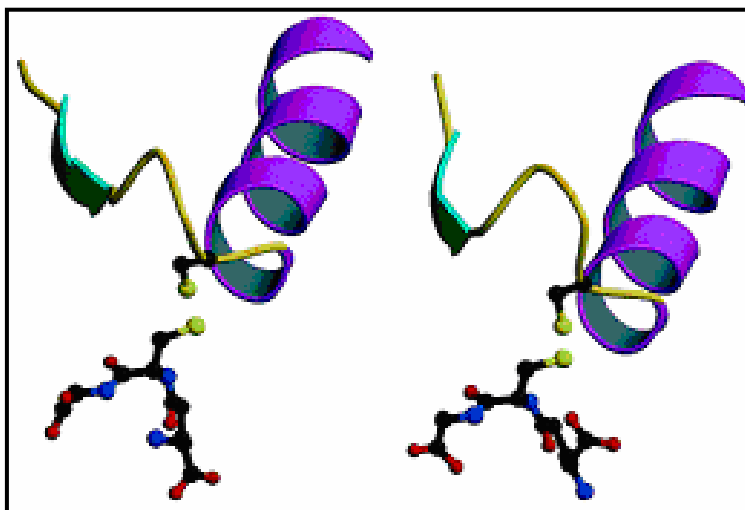


Fig.3. Comparazioni tra il sito di legame per il GSH nella glutaredossina (sinistra) e nella GSTO (destra). Da Board P.G. & al., 2000.

Molte molecole contenenti legami disolfuri possono rappresentare potenziali substrati per questo tipo di attività, inclusi i polipeptidi S-tiolati. Per esempio, durante lo stress ossidativo, numerose proteine formano

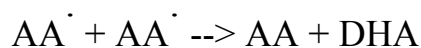
addotti S-tiolo con glutatione e cisteina (Seres T. & al., 1996; Hanson S.R. & al., 1999) con conseguente inattivazione o cambiamenti funzionali delle proteine (Ravichandran V. & al., 1994; Jahngen-Hodge J. & al. 1997). Quindi una probabile funzione della GSTO1-1 è di ridurre questi addotti S-tiolo ripristinando la funzionalità enzimatica. Come precedentemente descritto, la struttura cristallina della GSTO1-1 indica che il suo sito H è particolarmente aperto alla superficie e largo abbastanza per alloggiare una catena polipeptidica (Board P.G. & al., 2000).

ATTIVITA' DEIDROARCORBATO REDUTTASICA

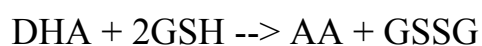
Una caratteristica peculiare delle GSTO è quella di possedere attività DHA reduttasica (Maellaro & al., 1994; Board P.G. & al., 2000), cioè la capacità di ridurre il DHA, forma ossidata della vitamina C, ricostituendo l'acido ascorbico (AA).

L'AA è un chetolattone a sei atomi di carbonio, presente in tutti gli organismi viventi, sia vegetali che animali. Nel regno animale viene sintetizzato nel fegato degli anfibi, dei rettili, degli uccelli e dei mammiferi a partire dall'acido glucuronico derivante da glucosio (Chatterjee I.B. et al., 1975). Tra i mammiferi l'uomo, alcuni primati, la cavia e alcuni chiroteri hanno perso la capacità sintetica.

L'AA gioca un ruolo essenziale in tutti gli organismi viventi grazie alla sua capacità di andare facilmente incontro, nei sistemi biologici, ad ossidazione. Tale caratteristica gli consente di agire sia da scavenger diretto dei radicali liberi e delle specie attive dell'ossigeno, che da agente riducente in numerose tappe del normale metabolismo cellulare (biosintesi del collagene, della carnitina, della noradrenalina e attivazione di ormoni) (Padh H., 1991). Il processo di ossidazione dell'acido ascorbico può avvenire attraverso il trasferimento di un elettrone, portando alla formazione del radicale semideidroascorbato oppure attraverso il trasferimento di due elettroni producendo il DHA; quest'ultimo può formarsi inoltre anche per dismutazione di due AA \cdot secondo la seguente reazione:



E' noto da tempo che gli organismi viventi sono dotati di attività DHA reduttasiche molto efficienti in grado di ripristinare l'AA utilizzando il GSH come donatore di equivalenti riducenti:



Queste attività sono pertanto di grande importanza per mantenere costante la concentrazione di acido ascorbico a dispetto della continua ossidazione da parte dei radicali liberi.

I sistemi di riduzione del DHA però sono importanti non solo per riciclare la vitamina C: è ben documentato, infatti, che il DHA può produrre effetti tossici, a causa della sua capacità di legarsi ai gruppi amminici e sulfidrilici delle proteine. Ad esempio, alti livelli di DHA sono tossici per gli eritrociti (Bianchi J. & Rose R.C., 1986), le isole pancreatiche (Pillsbury S. & al., 1973) e l'endotelio corneale (Wolff S.P. & al., 1987). La capacità di ridurre efficientemente il DHA ad AA può pertanto proteggere la cellula dagli effetti tossici del DHA.

Un'altra importante funzione dei sistemi riducenti il DHA è quella di contribuire all'uptake della vitamina C. L'AA e il DHA sono entrambi trasportati entro le cellule, ma con meccanismi diversi. L'AA è accumulato come tale attraverso un trasporto attivo carrier-mediato e saturabile, dipendente dal sodio e dalla sua stessa concentrazione (Welch R.W. & al., 1995). Il DHA penetra dentro le cellule, dove si accumula però come AA, attraverso un meccanismo di diffusione facilitata (Hughes R.E. & Maton S.C., 1968; Bigley R. & al., 1981; Vera J.C. & al., 1993; Welch R.W. & al., 1995), che sfrutta gli stessi trasportatori del glucosio (Vera J.C. & al., 1993). L'efficiente riduzione intracellulare del DHA, evitando il

raggiungimento di un equilibrio tra concentrazione extra- ed intra- cellulare del DHA, rende questa forma di uptake molto più efficiente dell'uptake diretto del AA.

In conclusione dai dati della letteratura possiamo dedurre che i sistemi di riduzione del DHA svolgono essenzialmente tre funzioni:

- i) ripristinano la forma attiva della vitamina C (AA);
- ii) impediscono gli effetti tossici del DHA;
- iii) permettono l'uptake della vitamina C sotto forma di DHA.

I primi enzimi ad attività DHA reduttasica scoperti sono stati la glutaredossina e la disolfuro isomerasi (Wells W.W. & al., 1990). Successivamente, nel laboratorio dove ho preparato la tesi, è stata scoperta e caratterizzata la DHA reduttasi di ratto, poi inclusa nel gruppo delle GSTO (Maellaro E. & al., 1994). In base ad esperimenti di immunotitolazione, la capacità DHA reduttasica globale del citosol di fegato di ratto sembra dipendere in massima parte (almeno il 70%) dalla presenza di questo enzima (Paolicchi A. & al., 1996). Un'analogia attività deidroascorbato reduttasica è stata osservata successivamente nella forma umana (GSTO1-1) (Board P.G. & al., 2000). Infine un'attività particolarmente elevata è stata trovata nella forma umana GSTO 2-2. L'attività specifica di questa proteina (circa 100 volte superiore a quella

della GSTO 1-1) è attualmente la più alta di qualsiasi altro enzima fin ad ora noto (Schmuck E.M. & al., 2005).

ATTIVITA' MONOMETILARSENIATO (MMA^V) E DIMETILARSENIATO (DMA^V) REDUTTASICA.

L'arsenico inorganico è un comune contaminante dell'acqua naturale in molti regioni del mondo ed è conosciuto come cancerogeno. La World Health Organization ha stimato che circa 70 milioni di persone in Bangladesh sono a rischio di cancro perché bevono acqua contaminata dall'arsenico inorganico. Anche altre aree del mondo come la Romania, il Taiwan, la Cina, il Messico, la Mongolia e l'Ungheria hanno simili problemi (National Research Council Report, 1999; Arsenic Exposure and Health Effects, 1998).

La biotrasformazione dell'arsenico inorganico é un processo a più stadi catalizzato in successione dalla arseniato reduttasi (Radabaugh T.R., & Aposhian H.V., & al. 2000;), dalla arsenito metiltransferasi (Zakharyan R. & al., 1995; Wildfang E. & al., 1998), dalla monometilarseniato (MMA^V) reduttasi (Zakharyan R.A. & Aposhian H.V., 1999a), dalla monometilarsenito metiltransferasi e dalla dimetilarseniato (DMA^V) reduttasi (Zakharyan R. & al., 1999).

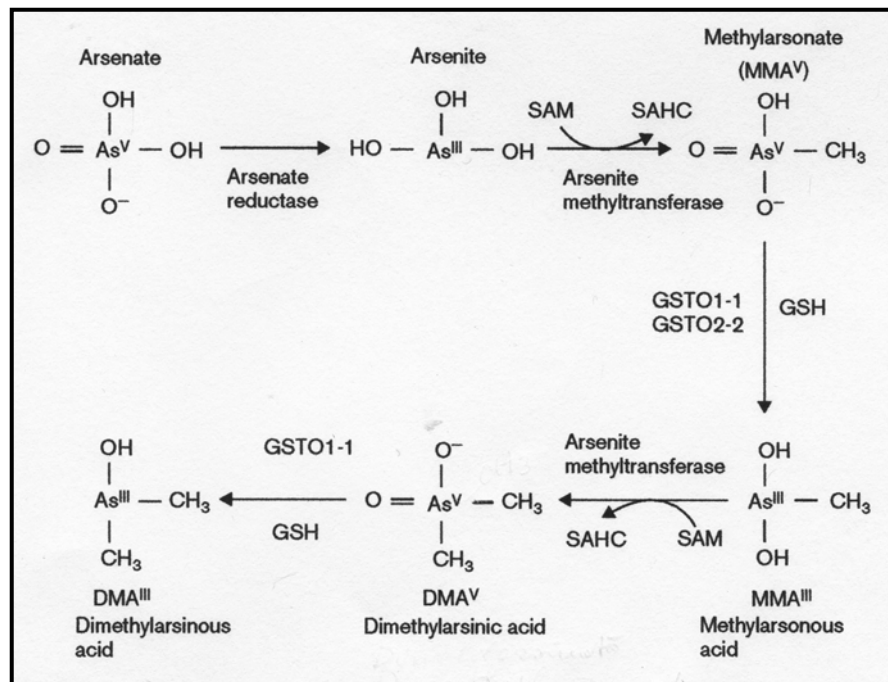


Fig.4. Tappe metaboliche della biotrasformazione dell'arsenico inorganico. Da Schmuck E.M. & al., 2005.

E' discutibile se tale via metabolica debba considerarsi una via di detossificazione: alcuni dei metaboliti sono infatti cancerogeni e fortemente tossici (Cullen W.R. & al., 1989; Styblo M. & al., 1997). L'arsenito é metabolizzato dall'arsenito metiltransferasi a MMA^V, che é un metabolita relativamente innocuo. Questo, però, deve essere ridotto a MMA^{III}, prodotto altamente tossico, prima che una seconda metilazione possa aver luogo per produrre il DMA^V, che rappresenta, al contrario, il composto meno tossico tra tutti i metaboliti noti (Petrick J.S. & al., 2000; Mass M.J. & al., 2001). Una volta che sufficienti livelli di MMA^V sono stati prodotti,

la MMA^{V} reduttasi può produrre il MMA^{III} , che può poi essere metilato dalla MMA^{III} metiltransferasi a DMA^{V} . La DMA^{V} , inoltre, può essere ridotta da una DMA^{V} reduttasi a DMA^{III} , altro metabolita probabilmente molto tossico (Schmuck E.M. & al., 2005).

La reazione catalizzata dalla MMA^{V} reduttasi è la tappa limitante nel metabolismo dell'arsenico inorganico, poichè la sua K_m è nel range millimolare, mentre quelle delle metiltransferasi sono nel range micromolare (Zakharyan R.A. & Aposhian H.V., 1999a).

Esistono vari dati comprovanti la maggior tossicità del MMA^{III} rispetto agli altri metaboliti. Ad esempio Petrick J.S. & al. (2000) dimostrarono le seguenti tossicità relative nei confronti delle cellule Chang provenienti da fegato umano: MMA^{III} ($\text{LC}_{50} = 6\mu\text{M}$) > arsenito ($\text{LC}_{50} = 68\mu\text{M}$) > arsenato ($\text{LC}_{50} = 1628\mu\text{M}$) > MMA^{V} ($\text{LC}_{50} = 8235\mu\text{M}$) > DMA^{V} ($\text{LC}_{50} = 9125\mu\text{M}$).

Dal momento che il DMA^{V} è meno tossico e il MMA^{III} è più tossico rispetto all'arsenito inorganico, i possibili benefici della metilazione dell'arsenico come via di detossificazione devono essere valutati sulla base dell'accumulo dei vari metaboliti tossici.

Come abbiamo già detto, la MMA^{V} reduttasi rappresenta la tappa limitante nel metabolismo dell'arsenico inorganico ed è quella che produce il composto più tossico (Zakharyan R.A. & Aposhian H.V., 1999a). In

seguito ad una parziale purificazione della MMA^V reduttasi umana, è stato possibile determinare la sequenza aminoacidica del 92% della proteina (Zakharyan R.A. & al., 2001). Tale sequenza si è rivelata perfettamente identica a quella della GSTO1-1. In accordo con ciò, la GSTO 1-1 ricombinante umana mostra attività MMA^V reduttasica con valori di Km e Vmax comparabili con quelli della MMA^V reduttasi umana e, di converso, la MMA^V reduttasi umana parzialmente purificata mostra capacità catalitiche analoghe alla GSTO 1-1 (attività tiol-transferasica e DHA reduttasica). Entrambi gli enzimi hanno un'assoluta specificità per il GSH. Infine la banda elettroforetica corrispondente alla MMA^V reduttasi umana viene riconosciuta, mediante Immunoblot, dall'antisiero verso la GSTO 1-1 umana. Gli Autori (Zakharyan R.A. & al., 2001), sulla base dei suddetti dati, giungono pertanto alla conclusione che la MMA^V reduttasi umana e la GSTO 1-1 umana debbano essere considerate proteine identiche.

Recentemente, come abbiamo già descritto, uno studio sull'organizzazione genomica della GSTO 1 umana (Whitbread A.K. & al., 2003) ha portato alla identificazione di un secondo gene attivamente trascritto, cui è stata data la sigla GSTO 2. La proteina GSTO 2 ha una identità del 64% con la GSTO 1 per quanto riguarda la sequenza aminoacidica e conserva il residuo di cisteina in posizione 32, che si ritiene importante per il sito attivo della GSTO 1 (Whitbread A.K. & al., 2003). La successiva

caratterizzazione della GSTO 2-2 umana (Schmuck E.M. & al., 2005) ha evidenziato che anche questo enzima ha un'attività MMA^V reduttasica comparabile a quella della GSTO 1-1. Nel corso dello stesso studio è stato pure evidenziato che la GSTO 1-1 ha anche una buona attività DMA^V reduttasica e può pertanto catalizzare anche l'ultima tappa nota nel metabolismo dell'arsenico. Pure la GSTO 2-2 mostra tale capacità, ma con un'attività specifica molto più bassa rispetto alla GSTO1-1.

MODULAZIONE DELL'ATTIVITA' DEI CANALI INTRACELLULARI DEL CALCIO.

Studi recenti hanno evidenziato un possibile ruolo della GSTO1-1 nella regolazione del Ca²⁺ intracellulare (Mariot P & al., 2000; Pan Z. & al., 2000). Studi condotti utilizzando la sequenza caratteristica delle GST di classe θ nel tentativo di trovare altri membri della famiglia GST, hanno infatti rivelato una significativa somiglianza di questa sequenza con i membri appartenenti al gruppo di canali proteici intracellulari CLIC (Chloride Intracellular Channel), in particolar modo con la proteina NCC27 (CLIC 1) (Dulhunty A. & al., 2001). Ricerche dettagliate sull'allineamento tra la sequenza della GSTO1 e la sequenza di CLIC1 hanno rivelato la conservazione di alcuni residui fondamentali caratteristici della famiglia strutturale GSTO, in particolare nella regione N-terminale deputata al

legame con il GSH e nel sito attivo dove è conservato il tipico residuo di cisteina delle GSTO (Dulhunty A. & al., 2001). Studi predittivi sulla conformazione della proteina indicano inoltre che la proteina CLIC 1 adotta il tipico modello conformazionale delle GST e che può quindi essere considerata un membro della famiglia strutturale delle GST (Dulhunty A. & al., 2001).

L'osservazione che le proteine CLIC probabilmente adottano la struttura terziaria tipica delle GSTO e che condividono con queste una significativa omologia di sequenza nella regione N-terminale e nel sito attivo, hanno indotto gli Autori a esaminare la possibilità che le GSTO abbiano attività analoghe alle proteine CLIC, che possano cioè agire come canali ionici e/o modulatori di canali ionici (Dulhunty A. & al., 2001).

Lo studio in vitro condotto su bilayer fosfolipidici contenenti la GSTO 1-1 ricombinante non ha evidenziato la capacità di tale proteina di formare canali ionici. Tuttavia, considerando che la GSTO 1-1 è fortemente espressa nel muscolo cardiaco e scheletrico, gli Autori hanno successivamente preso in esame l'eventuale capacità della proteina di modulare l'attività dei "Ryanodine Receptor" (RyRs), canali di rilascio del Ca^{2+} nei muscoli scheletrici e nel reticolo sarcoplasmatico cardiaco (Dulhunty A. & al., 2001).

I risultati indicano che la GSTO1-1 può sia inibire che potenziare i canali del calcio RyR. L'inibizione si osserva solo nei confronti di RyR2 e richiede il mantenimento della attività tiol-transferasica dell'enzima. L'attivazione, invece, si può osservare sia nei confronti di RyR2 che di RyR1 ed è indipendente dal mantenimento dell'attività enzimatica. Gli Autori suggeriscono che RyR2 abbia due siti di legame per la GSTO1-1, uno per l'attivazione del canale e l'altro per la sua inibizione. In effetti RyR ha un dominio citoplasmatico molto grande con diversi siti di legame per ligando, e sono noti ligandi con duplice effetto sull'attività del canale in seguito a legame su siti diversi. Esempi in tal senso sono il Ca^{2+} (Laver D.R. & al., 1995) e l'ATP (Kermode H. & al., 1998).

I canali RyR sono regolati da diversi fattori, incluse reazioni di ossidazione e riduzione (Dulhunty A.F. & al., 2000). La GSTO1-1 rappresenta un'ulteriore possibilità di regolazione (Dulhunty A. & al., 2001). Considerando che le proteine CLIC formano o modulano i canali ionici (Valenzuela S.M. & al., 1997; Qian Z. & al., 1999) e hanno una struttura simile alle GST, si può ipotizzare che la modulazione dei canali ionici sia una proprietà generale di questa superfamiglia (Dulhunty A. & al., 2001).

RUOLO NELLA PROCESSAZIONE POST-TRADUZIONALE DELLA INTERLEUCHINA – 1.

L'interleuchina-1 (IL-1) é un mediatore proinfiammatorio prodotto in gran quantità da monociti e macrofagi dopo attivazione da parte del lipopolisaccaride (LPS) batterico (Dinarelli C.A., 1998). Diversamente da molte altre citochine prodotte da queste cellule, IL-1 non viene rilasciata costitutivamente. Per un efficiente rilascio di IL-1 occorre, infatti, che le cellule produttrici siano sottoposte all'azione di un effettore in grado di dare inizio ad un meccanismo di modifiche post traduzionali piuttosto insolito che porta in ultimo al rilascio della citochina (Hogquist K.A. & al., 1991; Perregaux D. & al., 1992; Rubartelli A. & al., 1990). E' però necessario uno stimolo ulteriore e diverso per la secrezione, poiché l'iniziale prodotto traduzionale della IL-1 é privo di una sequenza segnale che diriga il polipeptide verso il reticolo endoplasmico (March C.J. & al., 1985; Auron P.E. & al., 1984; Walter P. & Johnson A.E., 1994). Da qui tipicamente i polipeptidi destinati alla secrezione procedono verso la superficie cellulare attraverso un apparato secretorio che coinvolge il complesso di Golgi e le piccole vescicole secretorie. In mancanza di questo segnale di riconoscimento per entrare nel reticolo endoplasmico, la IL-1 di nuova sintesi si accumula nel compartimento citoplasmatico perdendo la

sua funzione di mediatore extra-cellulare (Traub L.M. & Kornfeld S., 1997; Singer I.I. & al., 1988; Stevenson F.T. & al., 1992).

Due geni separati, ma correlati, codificano per le due procitochine IL-1 α e IL-1 β (March C.J. & al., 1985; Auron P.E. & al., 1984). In risposta ad appropriati stimoli, i prodotti traduzionali di 31 kDa di entrambi i geni vengono trasformati per mezzo di proteolisi nei prodotti finali di 17 kDa. In particolare la pro- IL-1 β viene processata dalla caspasi-1, un membro di quella famiglia di proteasi che iniziano e/o eseguono la risposta apoptotica (Cerretti D.P. & al., 1992; Thornberry N.A. & al., 1992; Thornberry N.A. & Lazebnik Y., 1998).

Tra gli stimoli che, in vitro, promuovono un'efficiente modifica post-traduzionale delle IL-1, abbiamo l'ATP extra-cellulare (Hogquist K.A. & al., 1991; Perregaux D. & Gabel C.A., 1994; Ferrari D. & al., 1997), la nigericina (ionoforo per il potassio) (Perregaux D. & al., 1992; Cheneval D. & al., 1998), tossine batteriche, quali la emolisina dell'*Escherichia coli* (Bhakdi S. & al., 1990) e le cellule T citotossiche (Hogquist K.A. & al., 1991; Perregaux D.G. & al., 1996).

L'IL-1 é un mediatore chiave di molti processi infiammatori. Studi preclinici su modelli animali e studi clinici sull'uomo hanno dimostrato l'efficacia terapeutica di vari inibitori dell'IL-1. Recentemente é stata identificata una serie di inibitori (CRID, Cytokine Release Inhibitory

Drug), derivati dalla diarilsulfonilurea, che in maniera selettiva e con notevole efficacia inibiscono le modifiche post-traduzionali della IL-1 β (Laliberte R.E. & al., 2003).

Uno studio, intrapreso dagli Autori al fine di chiarire i meccanismi di tale inibizione, ha portato ad identificare la GSTO 1-1 come una proteina in grado di legare la diarilsulfonilurea e l'interazione tra i CRID e la GSTO 1-1 come la responsabile dell'inibizione del processo post-traduzionale della IL-1 β , indotto da ATP.

Le principali evidenze a supporto di tali conclusioni sono: i) CRID con diarilsulfonilurea, contenenti un gruppo epossidico marcato con ^{14}C , si legano irreversibilmente alla GSTO 1-1 e tale legame correla con l'entità della inibizione nella produzione di citochine; ii) la GSTO 1-1 si lega reversibilmente ad una colonna di affinità contenente diarilsulfonilurea; iii) un addotto CRID-glutazione, somministrato a monociti intatti, inibisce le modifiche post-traduzionali della IL-1 β indotte da ATP e interagisce con la GSTO 1-1. Altri dati suggeriscono che l'inibizione si attua tramite il legame dei CRID con la cisteina 32, responsabile dell'attività catalitica della GSTO 1-1. Ad esempio la sostituzione della cisteina 32 con una alanina impedisce completamente il legame dell'inibitore con la GSTO 1-1. Il fatto che la GSTO 1-1 sia il target specifico attraverso cui si esplica l'azione inibitoria dei CRID suggerisce di conseguenza che tale proteina

svolga un ruolo determinante nel contesto delle modifiche post-traduzionali della IL-1 β indotte da stimoli vari (Laliberte R.E. & al., 2003). Il meccanismo non é attualmente noto, ma gli Autori avanzano due ipotesi. La prima prende spunto dalla somiglianza strutturale tra GSTO 1-1 e CLIC 1 di cui abbiamo parlato nel precedente capitolo. Gli Autori ipotizzano che anche la GSTO 1-1 possa contribuire, al pari della CLIC 1, alla formazione di canali ionici. Infatti le modifiche post-traduzionali dell'IL-1 indotte dall'ATP sono accompagnate da drastici cambiamenti nella omeostasi ionica e l'emissione all'esterno delle citochine é notevolmente condizionata dalla composizione ionica del mezzo. Per esempio l'aumento del K⁺ extracellulare, la rimozione del Na⁺ extracellulare o la sostituzione del Cl⁻ con anioni caotropici inibiscono la risposta cellulare. Gli autori in base a queste osservazioni pensano che la GSTO 1-1 possa avere un ruolo nel modulare i notevoli flussi ionici che si verificano in tale circostanza.

La seconda ipotesi si basa sull'attività tiol-transferasica della GSTO 1-1. Tale attività potrebbe essere importante per mantenere allo stato ridotto sulfidrili critici per l'attività della caspasi e delle altre proteine che ad essa si associano nella formazione del cosiddetto inflammasoma (Laliberte R.E. & al., 2003).

SCOPO DELLA TESI

Nel nostro laboratorio è stato purificato dal citosol di fegato di ratto un nuovo enzima a funzione deidroascorbato reduttasica (DHA), cioè capace di ridurre il DHA in acido ascorbico recuperando la forma attiva della vitamina C. In seguito è emerso che lo stesso enzima è il capostipite di una nuova famiglia di glutatione transferasi, la famiglia Omega (GSTO) caratterizzata dall'assenza di attività glutatione-transferasica, ma dotata di numerose altre funzioni di grande importanza nella risposta allo stress cellulare, quali l'attività tiol-transferasica, deidroascorbato reduttasica, la modulazione del trasporto del calcio, l'attivazione post-traduzionale di altre proteine, la risposta allo shock di natura termica e chimica (Board P.G. & al., 2000; Dulhunty A. & al., 2001; Laliberte R.E. & al., 2003). Recentemente è stato scoperto che la GSTO umana è presente in due forme, cui è stato dato il nome di GSTO1 e GSTO2 (Whitbread A.K. & al., 2003). Lo scopo della presente tesi è stato quello di studiare la regolazione dell'espressione delle GSTO in linee cellulari umane.

Il primo modello adottato è stato quello della stimolazione con TNF- α . Tale modello è stato scelto perché è noto che l'espressione di alcune GST è indotta da TNF- α tramite attivazione del fattore trascrizionale NFkB

(Pinkus R. & al., 1996; Morceau F. & al., 2004). Inoltre nostri dati preliminari hanno mostrato un'augmentata espressione delle GSTO in linee cellulari in seguito a trattamenti tossici che comportano aumentato stress ossidativo, quali adriamicina e metil mercurio. E' noto che un'augmentata produzione di specie attive dell'ossigeno può causare attivazione del fattore NFkB (Li N. & Karin M., 1999). E' noto anche che il trattamento con TNF- α è uno dei modelli sperimentali più usati per indurre attivazione di NFkB (Delhalle S. & al., 2004). Tutti questi dati ci hanno indotto a verificare se il trattamento con TNF- α possa indurre l'espressione di una o di entrambe le forme di GSTO umana e se tale induzione avvenga tramite NFkB.

Nel corso di questi esperimenti, come descritto nei risultati, si è evidenziata la possibilità che l'aumento della densità cellulare induca la sovraespressione delle GSTO umane. Tale dato non è affatto sorprendente. E' noto che il fenomeno della confluenza cellulare può influire sull'espressione di molti geni. In particolare è ben nota la sovraespressione confluenza-dipendente della hsp27, una delle più studiate stress protein di piccolo peso molecolare (Garrido C. & al., 1997). Si ritiene che tali proteine facciano parte, insieme con le GST, di una medesima famiglia ancestrale (Koonin E.V. & al., 1994). In accordo con ciò Kodym & al., (1998) hanno dimostrato che la GSTO murina ha caratteristiche tipiche

delle stress protein di piccolo peso molecolare, quali la migrazione nel nucleo in seguito a rialzo termico.

Per tutti questi motivi abbiamo deciso di studiare l'aumento della densità cellulare quale ulteriore meccanismo in grado di modulare l'espressione di una o di entrambe le forme della GSTO umana. Chiaramente questo modello apre molti quesiti, perché l'effetto modulante può essere dovuto alla variazione di molti parametri quali il semplice aumento della densità cellulare, l'instaurarsi di connessioni cellula-cellula o cellula-substrato, il fenomeno dell'inibizione da contatto, etc.

Lo scopo della presente tesi è quindi quello di verificare se i due trattamenti sperimentali sopra menzionati (trattamento con TNF- α e effetto dell'incremento della densità cellulare) sono in grado di modulare l'espressione delle GSTO umane e se tale modulazione avviene per entrambe le due forme o selettivamente per una solamente. Vengono inoltre presentati esperimenti preliminari volti a individuare i meccanismi responsabili della modulazione nei due modelli sperimentali.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

LINEA CELLULARE DI MELANOMA Me665/2/21

Il Dott. Parmiani dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano ha gentilmente concesso un gruppo di cloni (Me665/2) derivanti da una metastasi sottocutanea di melanoma umano. Tra questi è stato utilizzato il clone Me665/2/21 (clone 21) che è caratterizzato da bassa invasività ed alto grado di differenziazione.

Condizioni di coltura

Il clone 21 è stato coltivato nel mezzo di coltura RPMI 1640 addizionato con L-glutammina 2mM e integrato con siero fetale bovino al 10% precedentemente inattivato a 56°C per 30 min. Le linee cellulari sono state coltivate in incubatore a 37°C, in atmosfera satura di umidità e con il 5% di CO₂.

Quando le cellule coltivate raggiungevano la confluenza venivano staccate dalla plastica incubandole per 2-3 min a 37°C con una soluzione di tripsina/EDTA sodico alla concentrazione rispettivamente di 5g/l e 0,2 g/l.

Le cellule venivano poi risospese nell'apposito mezzo di coltura e riseminate alla opportuna densità.

LINEA CELLULARE U937

La linea cellulare U937 (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) è derivata da cellule maligne dell'effusione pleurale di un maschio caucasico con linfoma istocitico diffuso. La modalità di crescita di questa linea cellulare è in sospensione.

Condizioni di coltura

Le cellule U937 sono state coltivate in sospensione in terreno RPMI 1640 addizionato con L-glutammina 2mM e integrato con siero fetale bovino al 10% precedentemente inattivato a 56°C per 30 min. Periodicamente la soluzione veniva diluita in modo da preservare una densità cellulare ottimale alla propagazione.

Trattamenti sperimentali e preparazione dei campioni per Immunoblotting.

TRATTAMENTO CON TNF- α

Il trattamento con il TNF- α è stato effettuato sui monostrati del clone 21. Le cellule venivano seminate alla opportuna densità 24 ore prima del trattamento.

Come riportato nei “Risultati”, dopo aver effettuato dei test preliminari, le condizioni standard adottate sono state: impianto di 100000 cellule/piastra Petri 60 mm \varnothing e trattamento con TNF- α alla concentrazione di 10 ng/ml. Nei controlli il TNF- α è stato sostituito con un ugual volume di PBS sterile. In alcuni esperimenti è stato effettuato un pretrattamento con partenolide 5 μ M per 2 ore, seguito dal trattamento con TNF- α per 1 ora alla concentrazione di 10 ng/ml.

EFFETTO DELL' AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE

Le cellule di melanoma clone 21 e le cellule U937 sono state seminate ad una densità pari a 100000 cellule/piastra Petri 60 mm \varnothing , incubate in atmosfera umidificata a 37°C e al 5% di CO₂, e raccolte a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina.

In alcuni esperimenti le cellule sono state seminate alla densità di 100000 e 400000 cellule/piastra Petri 60 mm \varnothing e raccolte dopo 24 ore.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI

Al termine di ciascun trattamento i monostrati di clone 21 sono stati lavati 2 volte con PBS, e raccolti in tampone di lisi (Tris HCL 10 mM pH7,8 e Triton X-100 1% v/v) e sottoposti a 5 cicli di congelamento-scongelo.

Per le cellule U937, terminato il periodo di incubazione, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 g per 5 min, il terreno è stato eliminato e il pellet cellulare è stato lavato 2 volte con PBS. Infine le cellule sono state risospese in tampone di lisi (Tris HCL 10 mM pH7,8 e Triton X-100 1% v/v) e sottoposte a 5 cicli di congelamento-scongelo.

Trattamenti sperimentali e preparazione degli estratti cellulari per RT-PCR.

TRATTAMENTO CON TNF- α

Le cellule di melanoma umano clone 21 sono state seminate alla opportuna densità (700000 cellule/piastra Petri 150 mm \varnothing); 24 ore dopo la semina è

stato aggiunto il TNF- α alla concentrazione di 10 ng/ml per 16 ore. Nei controlli il TNF- α è stato sostituito con un ugual volume di PBS sterile.

AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE

Similmente a quanto effettuato per il trattamento con il TNF- α , 700000 cellule di melanoma umano Me665/2/21 sono state seminate in piastre Petri da 150 mm \varnothing . Tali cellule sono state raccolte a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina. Al termine dei trattamenti le cellule sono state lavate con PBS freddo (4°C), quindi raschiate e recuperate con 1 ml di PBS.

ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il “ NucleoSpin RNA II Kits” (CLONTECH Laboratories, Inc. USA). Tale Kit permette l'isolamento dell'RNA totale da colture cellulari. A tal fine dopo l'aggiunta del buffer di lisi, il campione è stato inserito in una colonna di propilene per centrifuga nella quale è contenuta una membrana di silice attivata sulla quale si adsorbe il materiale genetico. La composizione del buffer di lisi permette l'immediata inattivazione delle Rnasi e crea le condizioni necessarie affinché l'RNA venga adsorbito sulla membrana di silice. La possibilità di contaminazione da parte del DNA, in grado anch'esso di legarsi a tale membrana, è evitata aggiungendo direttamente una soluzione

di Dnasi durante la preparazione dei campioni. Dopo una serie di lavaggi, l'RNA purificato è stato infine eluito in condizioni di bassa forza ionica, con acqua "Rnasi free".

QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando un lettore di piastre ELISA, VICTOR³ (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Finland).

La lettura è stata effettuata a 260 nm. La curva di taratura è stata allestita diluendo un campione di RNA a concentrazione nota.

L'integrità dell'RNA è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% contenente lo 0,8% di bromuro di etidio, con un voltaggio costante di 100 V utilizzando TBE (Tris 0,178M, ac.Borico 0,178M, EDTA 4mM, pH 8,3) come tampone di corsa. Dopo la corsa il gel è stato visualizzato su transilluminatore UV Chemi Doc (Biorad Laboratories, Inc. USA).

Trattamenti sperimentali e preparazione degli estratti cellulari per l'EMSA

TRATTAMENTO CON TNF- α

Cellule di melanoma umano Me665/2/21 sono state seminate alla opportuna densità (1300000 cell/piastra Petri 150 mm \varnothing); dopo 24 ore le cellule sono state trattate con TNF- α alla concentrazione di 10 ng/ml per 15 min o per 1 ora. Nei controlli il TNF- α è stato sostituito con un uguale volume di PBS sterile.

In alcuni esperimenti è stato effettuato un pretrattamento con partenolide 5 μ M per 2 ore, seguito dal trattamento con TNF- α per 1 ora alla concentrazione di 10 ng/ml.

AUMENTO DELLA DENSITÀ CELLULARE

Similmente a quanto effettuato per il trattamento con il TNF- α , 1300000 cellule di melanoma umano Me665/2/21 sono state seminate in piastre Petri 150 mm \varnothing . Tali cellule sono state raccolte a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI NUCLEARI

La preparazione degli estratti nucleari (nucleosol) è stata eseguita essenzialmente secondo il protocollo di Andrews N.C. & Faller D.V. (Andrews N.C. & Faller D.V.; 1991), come di seguito riportato.

L'intero protocollo è stato effettuato a 4°C. Alla fine dei trattamenti le cellule sono state lavate con PBS, quindi raschiate e recuperate con 1 ml di PBS. I campioni sono stati centrifugati 2 min a 1000 g, risospesi in 500 µl di soluzione di lavaggio (HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 2 mM e EDTA 200 µM) e quindi centrifugati per 2 min a 1000 g.

I pellet sono stati risospesi in 300 µl di tampone B (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM e EDTA 200 µM, TRITON X-100 1%, Leupeptina 4µ g/ml e Aprotinina 1 µg/ml). I campioni sono stati lasciati per 30 min in ghiaccio e centrifugati successivamente per 5 min a 5000 g. I pellet sono stati lavati per 2 volte con 500 µl di soluzione di lavaggio e centrifugati per 2 min a 1000 g. E' stato quindi pesato il pellet di ciascun campione e sono stati aggiunti 2 volumi di tampone di estrazione (HEPES 10 mM pH 7,9, NaCl 600 mM, MgCl₂ 2 mM e EDTA 200 µM, Glicerolo al 25%, Leupeptina 4µ g/ml e Aprotinina 1 µg/ml) che serve a lisare la membrana nucleare. I campioni sono stati incubati in agitazione a 4°C per 20-30 min, al termine dei quali sono stati centrifugati a 20000 g per 30 min.

Il sovrinatante costituisce il nucleosol, che viene utilizzato per il test dell'EMSA.

Preparazione del citosol

Un frammento di testicolo e uno di utero umano sono stati omogenizzati al 33% (p/v) in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7,2 a 4°C utilizzando un omogeneizzatore Potter-Elvehjen. L'omogenato è stato centrifugato a 20000g per 15 min e il sopranatante è stato ulteriormente centrifugato a 100000g per 60 min; il sopranatante è stato quindi utilizzato come frazione citosolica.

Determinazione della concentrazione proteica

La determinazione della concentrazione proteica è stata eseguita secondo il metodo di Bradford (1976) utilizzando il reagente "Bio Rad protein assay" (Biorad Laboratories, Inc. USA).

Per ogni determinazione è stata allestita una curva di calibrazione, in triplo, utilizzando come standard 1, 2, 4, 8, 12, 16 µg di albumina bovina. Nel caso in cui il campione contenesse dei reagenti interferenti con il saggio (ad es. il TRITON X-100), questi sono stati aggiunti ad ogni standard in quantità equivalente al campione. Sia gli standard che i campioni sono stati

portati ad un volume totale di 800 μl con H_2O , al quale sono stati aggiunti 200 μl di reagente Bio-Rad. L'assorbanza è stata letta a 595 nm dopo un'inubazione di 5 min a temperatura ambiente contro un "bianco".

Elettroforesi delle proteine su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

La SDS/PAGE è stata effettuata su cella per elettroforesi "Mini-Protean III" (Biorad Laboratories, U.S.A.) secondo il metodo di Laemmli (1970) usando poliacrilamide al 5% per lo "stacking gel" e al 15% per il "separating gel".

I campioni sono stati denaturati a 100°C per 10 min in SDS allo 0,1% e 2mercaptoetanololo al 5% prima della deposizione nei pozzetti.

SEPARATING GEL 15% (quantità per due gel):

❖	Acqua distillata	2,35 ml
❖	Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,50 ml
❖	SDS 10% (W/V)	100 μl
❖	Acrilammide bis (30%)	5,00 ml
❖	Ammonio persolfato 10%	50 μl
❖	TEMED	10 μl

STACKING GEL 5% (quantità per due gel):

❖	Acqua distillata	3,05 ml
❖	Tris HCL 0,5M pH 6,8	1,25 ml
❖	SDS 10% (W/V)	50 μ l
❖	Acrilamide/Bis acrilammide (30%)	0,65 ml
❖	Ammonio persolfato 10%	50 μ l
❖	TEMED	10 μ l

Come standard di peso molecolare è stata utilizzata una miscela di proteine note (Biorad Laboratories, Inc. USA), inoltre come controllo positivo in ogni corsa è stata utilizzata la proteina GSTO1 ricombinante precedentemente purificata in questo laboratorio.

L'elettroforesi è stata eseguita a voltaggio costante (200 V) per circa 45 min a temperatura ambiente utilizzando il tampone di corsa costituito da: Tris HCl 25 mM pH di 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%.

Immunoblotting

TRASFERIMENTO E INCUBAZIONE CON L'ANTICORPO PRIMARIO E SECONDARIO

Il gel al termine dell'elettroforesi è stato equilibrato nel tampone di trasferimento (Trizma base 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM e metanolo 20% v/v) per 15 min. Il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa (0.45 µm) è stato effettuato con il sistema BioRad tramite "Mini Trans-Blot" (Biorad Laboratories, Inc. USA), con amperaggio costante (200 mA) per 90 min in vasca raffreddata. Quindi è stata effettuata la colorazione della membrana con rosso Ponceau (rosso Ponceau 0,2% w/v in acido tricloro acetico al 3% v/v) per 5 min a temperatura ambiente in modo da verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine. Dopo la decolorazione, effettuata con 2 lavaggi di 5 min in H₂O, la membrana è stata incubata "overnight" a 4°C su piastra oscillante con latte scremato in polvere al 2% in PBS-T (Tween 0,01% in PBS) per saturare i siti attivi residui della nitrocellulosa. Dopo 2 lavaggi di 10 min con PBS-T, la membrana di nitrocellulosa è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con una miscela di anticorpi primari di coniglio costituita da siero anti-GSTO1 (precedentemente prodotto nel nostro laboratorio) diluito 1:6000 e IgG antiactina diluite 1:4000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.

California) in latte al 2% in PBS-T. La β -actina è stata utilizzata come standard interno essendo una proteina costitutivamente espressa dalle cellule.

Sono stati quindi effettuati due lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-T ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia), diluito 1:10000 in latte scremato in polvere al 2% in PBS-T. Tale anticorpo è stato lasciato ad incubare a temperatura ambiente per 45 min. Al termine dell'incubazione con il secondario, sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS-T. Tutte le incubazioni sono state eseguite in agitazione leggera.

RIVELAZIONE DELLA REAZIONE ANTIGENE ANTICORPO TRAMITE CHEMIOLUMINESCENZA

La tecnica di rivelazione della reazione tra antigene e anticorpo si basa sull'ossidazione del luminolo in presenza di perossidasi e di perossido di idrogeno; tale reazione porta alla generazione di luce. Per questo tipo di rivelazione è stato utilizzato il kit Roche (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA). Al buio, dopo aver drenato l'eccesso di tampone di lavaggio, la membrana è stata incubata per 1 min con la soluzione di substrato. Allo scadere del tempo è stato rimosso l'eccesso di substrato dalla membrana e l'emissione luminosa è stata registrata tramite

l'apparecchio per acquisizione di immagini Chemi Doc (Biorad Laboratories, Inc. USA).

Le bande ottenute sono state sottoposte ad analisi densitometrica (DO/mm^2) mediante il software “Quantity One” Chemi Doc (Biorad Laboratories, Inc. USA).

EMSA(Electroforesis Mobility Shift Assay)

IBRIDAZIONE DELLA SONDA

Per il test dell’EMSA è stata utilizzata una sonda biotinilata (Primm.srl, Milano, Italia) la cui sequenza viene riconosciuta in modo specifico dal fattore di trascrizione NFkB.

senso 5’ GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3’

antisenso 5’ AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3’

I filamenti senso ed antisenso sono stati sciolti in TE (Tris-HCl 10mM pH 0,8, EDTA1mM) sterile, diluiti in NaCl 10 mM ad una concentrazione di 100 ng/ml e messi ad incubare a 65°C per 5 min in un becker d’acqua calda da 200 ml. Al termine dei 5 min, il campione è stato lasciato a bagnomaria a raffreddare. La sonda così ottenuta è stata conservata a -20°C.

Il competitore, ovvero la sonda non biotinilata, è stata preparata con la stessa procedura ma ad una concentrazione 50 volte superiore.

*ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN CONDIZIONI
NON DENATURANTI*

20 µg del sovranatante nucleare di ciascun campione sono stati aggiunti a 6µl di Binding Buffer 5X sterile (glicerolo al 20%, MgCl₂ 5mM, EDTA 2,5 mM, DTT 2,5 mM, NaCl 250 mM, Tris-HCl, pH 7,5 e poly(dI-dC) · poly(dI-dC) 0,25 mg/ml). A tale miscela di reazione è stato quindi aggiunto il probe (1µl).

Quando necessario è stata aggiunta acqua sterile per portare ad un volume finale di 30 µl. I campioni sono stati quindi incubati a 37°C per 30 min. Al termine di tale incubazione sono stati aggiunti 2µl di loading buffer 10X (Tris HCl 250 mM pH 7,5, blu di bromofenolo 0,2%, glicerolo 40%) e i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 6%. Nei test che prevedevano la competizione con la sonda non biotinilata la miscela di reazione è stata preincubata a 37°C per 10 min con un eccesso di competitore (100 volte più concentrato della sonda biotinilata).

Il gel di poliacrilammide utilizzato è al 6%, ed è costituito da:

H ₂ O distillata	24 ml
Acrilammide bis (30%)	9 ml
TBE 0,25 X (Tris 0,045M, Ac Borico 0,045M, EDTA 1mM)	11,4 ml

Ammonio persolfato 10%	450 μ l
TEMED	150 μ l

L'elettroforesi è stata eseguita a voltaggio costante (350 V) per 90 min circa ad una temperatura di 16°C utilizzando il TBE 0,25X come tampone di corsa.

SOUTHERN BLOT

Il trasferimento su membrana di nylon (Hybond N, Amersham Biosciences Europe GmbH, Milano Italia) a 200mA per 1 ora in TBE 0,25X è stato effettuato utilizzando il sistema semy-dry (Amersham Biosciences Europe GmbH, Milano Italia).

La membrana è stata quindi lavata con SSC 2X filtrata (NaCl 0,3M e Na citrato 0,03 M) per 5 min e poi lasciata asciugare all'aria.

La membrana è stata successivamente esposta ai raggi U.V. per 45 secondi su trans-illuminatore UV ChemiDoc (Biorad Laboratories, Inc. USA) al fine di fissare il DNA alla membrana stessa.

I siti di legame aspecifici sono stati bloccati incubando la membrana “over night” a temperatura ambiente con 50 ml di una soluzione composta da : Dendhart's 10X (BSA 0,25%, Ficoll 400 0,25%, polivinilpirolidone

0,25%), SSC 6X, SDS 0,1% e H₂O distillata per portare a volume (Dominici S. & al., 2003).

RIVELAZIONE DELLA SEQUENZA BIOTINILATA TRAMITE CHEMIOLUMINESCENZA

Per questo tipo di rivelazione è utilizzato il “Phototope – Star Detection kit” (New England BioLabs, Inc. USA)

Questa tecnica di rivelazione si basa sul legame della streptavidina alla sequenza biotinilata della sonda. Successivamente si aggiunge la fosfatasi alcalina biotinilata, che legandosi alla streptavidina, porta alla formazione di un coniugato tra la fosfatasi alcalina e il DNA fissato alla membrana. Infine si aggiunge il reagente CDP – Star™ (fenilfosfato substituted 1,2 dioxetane), a cui viene rimosso un fosfato tramite la fosfatasi alcalina e con produzione di un intermedio moderatamente stabile che decade con emissione di luce alla lunghezza d’onda di a 461 nm.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- nel primo step sono stati aggiunti 0,1 ml per cm² di membrana di Blocking Solution (5% SDS in 125mM NaCl, 25mM di fosfato sodico, pH 7,2) per 5 minuti in agitazione.

- in seguito è stata aggiunta la streptavidina diluita 1:1000 nella Blocking Solution (concentrazione finale di 1 µg/ml) utilizzandone 0,05 ml per cm² di membrana per 5 minuti in agitazione.
- sono stati quindi eseguiti 2 lavaggi usando 0,5 ml per cm² di membrana di Wash Solution I (0,5% SDS in 12,5 mM NaCl, 2,5 mM di fosfato sodico, pH 7,2).
- al termine dei lavaggi è stata aggiunta la fosfatasi alcalina diluita 1:1000 nella Blocking Solution (concentrazione finale di 0,5 µg/ml) utilizzandone 0,05 ml per cm² di membrana per 5 minuti, seguita da un lavaggio con 0,5 ml per cm² di membrana di Wash Solution I e 2 lavaggi con 0,5 ml per cm² di membrana di Wash Solution II (10 mM Tris-Hcl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,5).
- la rivelazione delle bande è stata effettuata aggiungendo il reagente CDP-Star diluito 1:100.

Le acquisizioni delle immagini sono state effettuate tramite Chemi Doc (Biorad Laboratories, Inc. USA).

Reverse Transcriptase – Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

L'RT-PCR è stata effettuata utilizzando il “ TITANIUM™ One –Step RT-PCR Kit” (CLONTECH Laboratories, Inc. USA).

La miscela di incubazione in ogni eppendorf era composta da:

- Master Mix :
 - 5µl di One-Step Buffer 10X (400 mM Tricina, 200 mM Kcl, 30 mM MgCl₂, 37,5µg/ml BSA)
 - 1µl di dNTP Mix 50X (10 mM di dATP, dCTP, dGTP e dTTP; con concentrazione finale per ciascuno uguale a 0,2 mM),
 - 0,5µl di Recombinant Rnase Inhibitor (40 units/µl, clonato da placenta umana),
 - 25 µl di Thermostabilizing Reagent,
 - 10µl di GC-Melt,
 - 1 µl di Oligo(dt) primer (20µM; dt [18]),
 - 1µl di RT-TITANIUM Taq Enzyme Mix 50X (MMLV-reverse transcriptase, TITANIUM *Taq* DNA polymerase, e TaqStart Antibody)
- 40µM di primers
- 0,5 µg di RNA estratto
- il volume totale è stato portato a 50µl con acqua Rnase free.

Le sequenze dei primer sono state scelte in porzioni di cDNA non omologhe tra la GSTO1 e la GSTO2 e permettono per ciò l'amplificazione selettiva delle due forme.:

hGSTO1:

FWD 5' GAAGCTTTATTAGAAGCCAAAATAAAGA 3'

REV 5' ATATCAGACATAGCTTTATTGCTGACT 3'

hGSTO2:

FWD 5' CCAGAGCCCAGTAGTTCAAAAATTAA 3'

REV 5' AGAAAAGAAAGAGAGACGGATTGGTT 3'

La gliceraldeide tre fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata scelta come standard interno di amplificazione.

GAPDH

FWD 5' CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT 3'

REV 5' AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC 3'

La fase di retrotrascrizione è stata effettuata a 54°C per 1 ora; al fine di distruggere qualsiasi attività DNAsica, la miscela di reazione è stata quindi incubata a 94°C per 5 min.

La reazione di amplificazione è stata effettuata con il seguente ciclo:

94°C/30''+59°C/30''+68°C/1min

ripetuto per 31 volte.

Al fine di verificare che la reazione di amplificazione fosse in fase esponenziale sia per la GSTO1 che per la GSTO2 e per il controllo interno

(GAPDH), sono state prelevate dalla miscela di reazione diverse aliquote (5 ul) a 28, 31, 34, 40 cicli. L' aliquota prelevata a 31 cicli è risultata la migliore in quanto l' amplificazione era ottimale ed ancora in fase esponenziale per tutti e tre gli amplificati. Al termine dei cicli di amplificazione la miscela è stata incubata a 68°C per 2 minuti.

Per visualizzare i prodotti dell' amplificazione si è proceduto con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1,2% contenente Bromuro di Etidio allo 0,8%. Il gel è stato visualizzato dopo la corsa su transilluminatore UV Chemi Doc (Biorad Laboratories, Inc. USA

RISULTATI

A) Trattamento con TNF- α

RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE IMMUNOBLOTTING

Il trattamento con TNF- α è stato effettuato esclusivamente sulla linea cellulare di melanoma umano Me665/2/21.

Al fine di determinare la densità cellulare e la concentrazione di TNF- α ottimale per il trattamento con TNF- α sono stati effettuati esperimenti con diversi gradi di confluenza cellulare e differenti dosi di TNF- α .

Come si può osservare in fig. 5 A e 6 A il trattamento con TNF- α in cellule seminate alla densità di 100000/piastra Petri da 60 mm causa un aumento della banda relativa alla GSTO che è già massimo alla dose di 10 ng/ml.

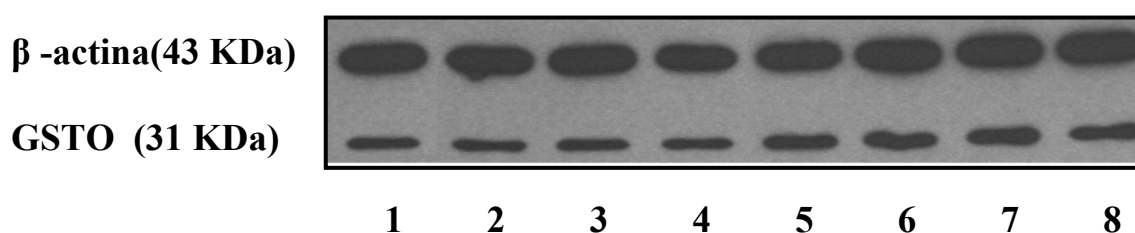


Figura 5 A. Immunoblotting di cellule di melanoma umano Me665/2/21 (100000 cellule/piastra) trattate con TNF- α . Rilevazione con anticorpo anti-GSTO1. In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Il trattamento è stato effettuato con dosi crescenti di TNF- α per 16 ore. Le cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento ad una densità di 100000 cell/piastra Petri 60mm. Corsie 1 e 2: controllo; corsia 3 e 4: TNF- α 5 ng/ml; corsie 5 e 6: TNF- α 10 ng/ml; corsie 7 e 8: TNF- α 50 ng/ml.

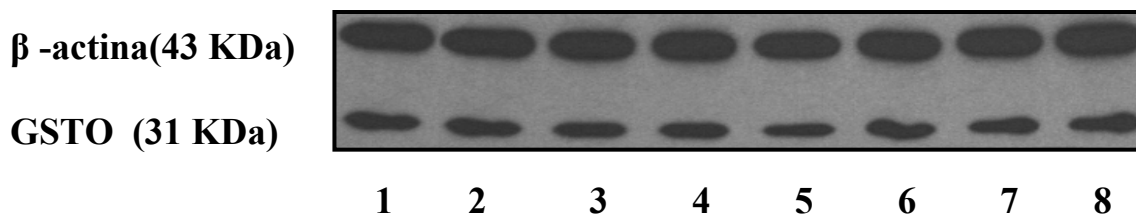


Figura 5 B. Immunoblotting di cellule di melanoma umano Me665/2/21 (200000 cellule/piastra) trattate con TNF- α . Rilevazione con anticorpo anti-GSTO1. . In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Il trattamento è stato effettuato con dosi crescenti di TNF- α per 16 ore. Le cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento ad una densità di 200000 cell/piastra Petri 60mm. Corsie 1 e 2: Controllo; corsie 3 e 4 : TNF- α 5 ng/ml; corsie 5 e 6: TNF- α 10 ng/ml; corsie 7 e 8: TNF- α 50 ng/ml.

Seminando 200000 cellule/piastra (Fig. 5 B) la quantità della GSTO è notevole in tutti i campioni ed è imputabile all'effetto della densità cellulare come verrà descritto successivamente. In tali condizioni non si osservano differenze tra cellule controllo e cellule trattate con TNF- α .

Nelle figure 6 A e 6 B è riportata l'analisi densitometrica effettuata sulle bande immunoreattive di 2 esperimenti analoghi a quelli riportati nelle figure 5 A e 5 B. I valori sono stati corretti tramite rapporto con l'actina.

Come mostrato in figura 6 A il maggior aumento dell'espressione della GSTO si ha con 10 ng/ml di TNF- α . A tale dose l'intensità relativa della banda immunoreattiva aumenta di circa 4 volte rispetto al campione controllo.

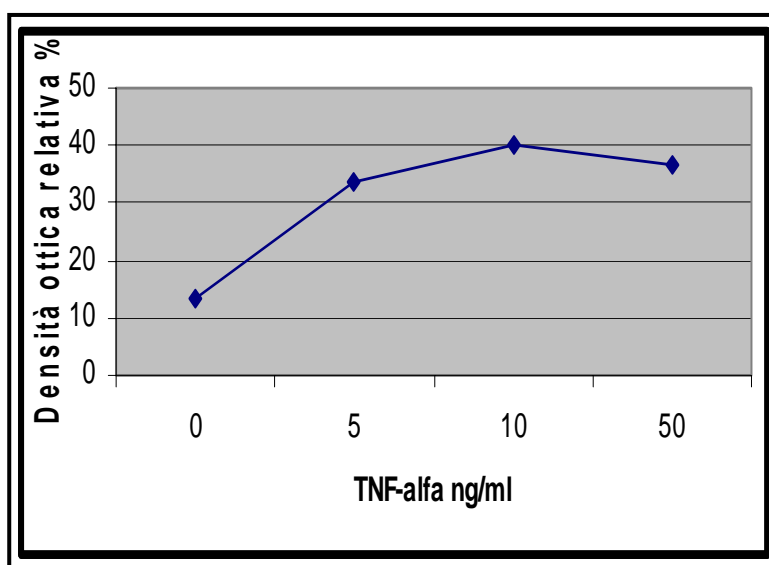


Figura 6 A. Analisi densitometrica delle bande immunoreattive di due esperimenti analoghi a quello riportato in fig. 5 A (100000 cellule/piastra seminate). Sulle ordinate è riportato il valore del rapporto tra la densità ottica della banda immunoreattiva relativa alla GSTO e quella dell'actina.

La fig. 6 B conferma i dati osservati nella Fig. 5 B: la densità ottica relativa della banda della GSTO è in condizioni basali circa 6 volte superiore a quella che si osserva seminando le cellule alla densità di 100000 cell/piastra. Il trattamento con TNF- α non apporta ulteriori aumenti a nessuna delle dosi usate.

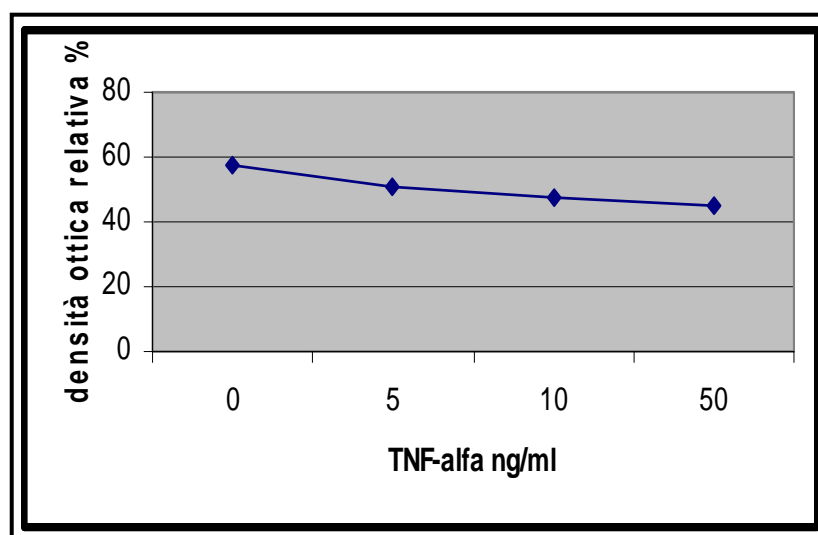


Figura 6 B. Analisi densitometrica delle bande immunoreattive di due esperimenti analoghi a quello riportato in Fig. 5 B (200000 cellule/piastra seminate). Sulle ordinate è riportato il valore del rapporto tra la densità ottica della banda immunoreattiva delle GSTO e quella dell'actina.

Sulla base di questi risultati preliminari i successivi esperimenti sono stati condotti seminando 100000 cellule/piastra Petri 60 mm e trattando con TNF- α alla dose di 10 ng/ml per 16 ore.

In fig.7 è possibile osservare il risultato di un tipico esperimento di induzione della GSTO operato dal TNF- α .

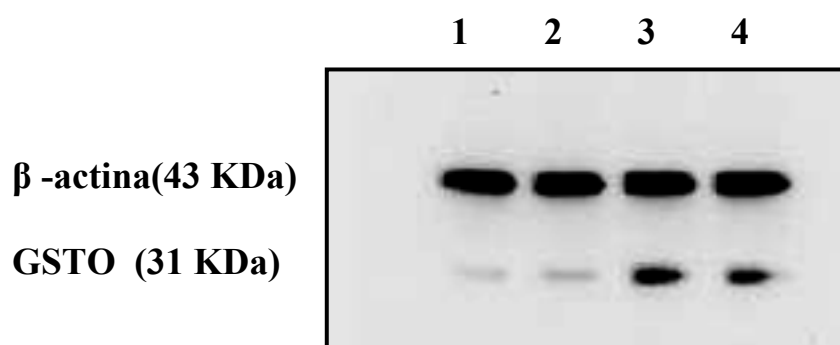


Figura 7. Immunoblotting di cellule di melanoma umano Me665/2/21 trattate con TNF- α . Rilevazione con anticorpo anti-GSTO1. . In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Le cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento ad una densità di 100000 cell/piastra Petri 60mm. Corsie 1 e 2: controllo; corsie 3 e 4: trattamento con TNF- α 10 ng/ml per 16 ore.

Nella figura 8 è riportata la media \pm S.D. dell'analisi densitometrica delle bande immunoreattive di 4 esperimenti analoghi a quello riportato in fig. 7:

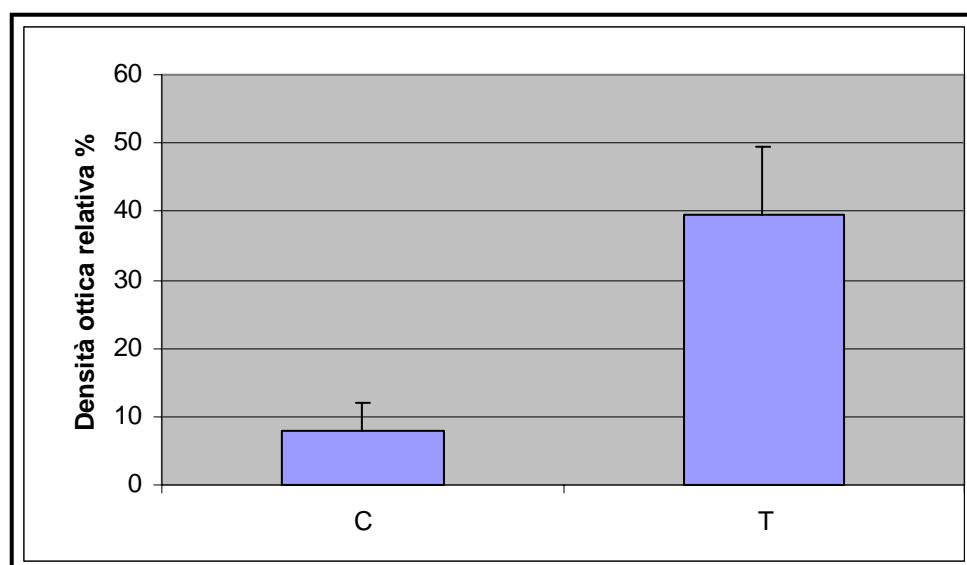


Figura 8. Analisi densitometrica delle bande immunoreattive di 4 esperimenti analoghi a quello riportato in Fig.7. Sulle ordinate è riportato il valore del rapporto tra la densità ottica della banda immunoreattiva relativa alla GSTO e quella dell'actina. Le cellule sono state seminate ad una densità di 100000 cellule su piastra Petri da 60 mm e trattate per 16 ore con TNF- α alla dose di 10 ng/ml. C: controllo, T: TNF- α .

RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE RT-PCR

Poiché, come mostrato nell'appendice ai Risultati, l'attuale anticorpo nei confronti della GSTO1 riconosce anche la GSTO2, non è possibile discriminare quale forma sia interessata nell'aumento dell'espressione evidenziato tramite Immunoblotting.

Per identificare se l'aumento della banda immunoreattiva sia ascrivibile alla GSTO1 o alla GSTO2 è stata effettuata l'RT-PCR con due coppie di primer specifici per le due forme. Ovviamente tale metodo non può valutare eventuali effetti sulla sintesi e sul turnover proteico che potrebbero in parte rendere ragione dell'aumento quantitativo delle GSTO osservata.

In fig. 9 possiamo osservare l'elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti dell'RT-PCR che indica che il trattamento con il TNF- α induce l'aumento dell'mRNA della GSTO1 mentre quello della GSTO2 rimane invariato. In tutti gli esperimenti la GAPDH è stata utilizzata come controllo di amplificazione.

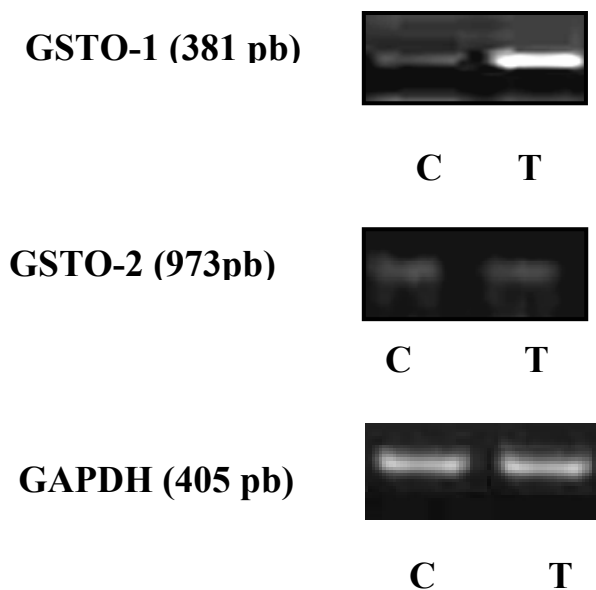


Figura 9. Effetti del trattamento con TNF- α valutati tramite RT-PCR. Il trattamento con TNF- α (10 ng/ml) per 16 ore è stato effettuato su cellule di melanoma clone 21 seminate 24 ore prima del trattamento ad una densità pari a 700000 cellule su piastre Petri da 150 mm. C:controllo; T: TNF- α 10 ng/ml per 16 ore.

Nella figura 10 è riportata la media dell'analisi densitometrica delle bande relative agli mRNA delle due forme della GSTO ottenute da 2 esperimenti analoghi a quello riportato in fig. 9.

Tale analisi mostra un aumento di circa 3 volte dell'mRNA relativo alla GSTO1, mentre quello relativo alla GSTO2 rimane invariato.

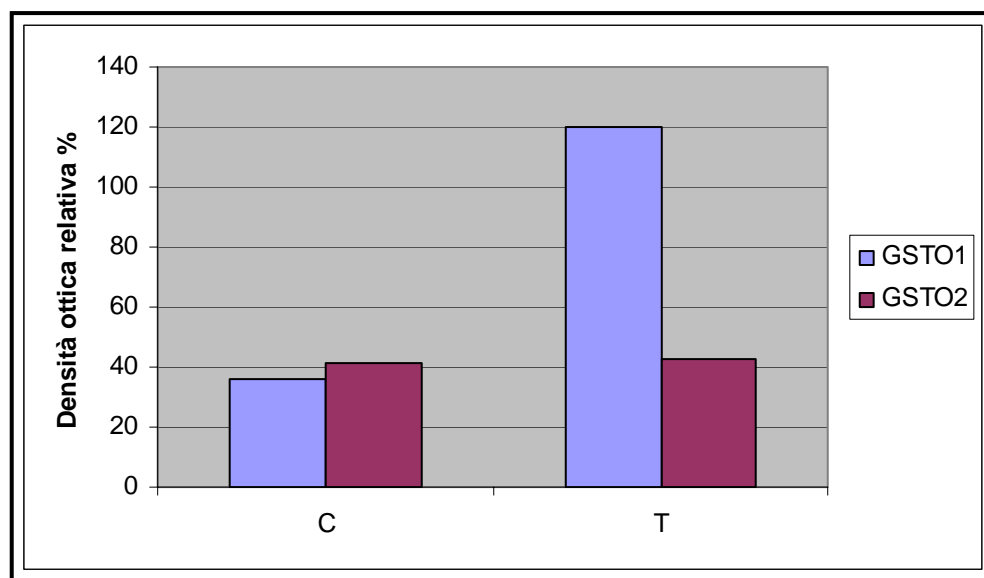


Figura 10. Analisi densitometrica delle bande relative al mRNA della GSTO1 e della GSTO2 ottenute da 2 esperimenti analoghi a quello riportato in Fig. 9. Sulle ordinate è riportato il valore del rapporto tra la densità ottica della banda relativa alla GSTO1 o alla GSTO2 e quella relativa alla GAPDH. C: controllo; T: TNF- α 10 ng/ml, 16 ore.

ATTIVAZIONE DEL FATTORE TRASCRIZIONALE NF κ B. Risultati dell'analisi tramite Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).

L'EMSA, effettuato sul nucleosol delle cellule di melanoma umano del clone 21 trattate con TNF- α , mostra che l'attivazione di NF κ B è già

evidente dopo 15 min di trattamento (Fig. 11, corsia 2) e aumenta ulteriormente dopo 1 ora (Fig.11, corsia 3).

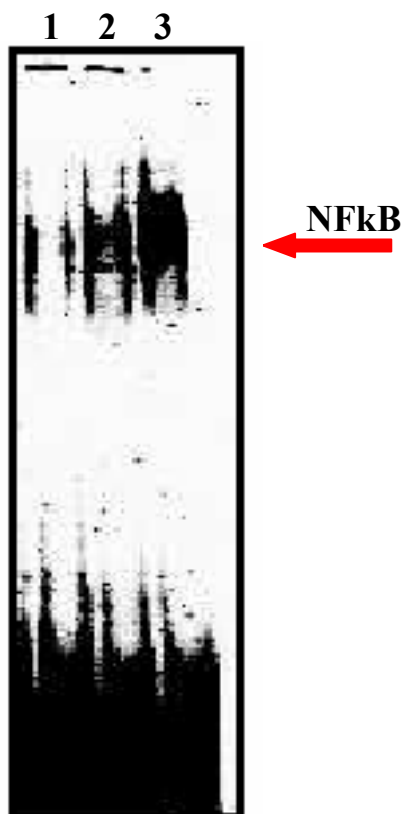


Figura 11. EMSA effettuato su cellule di melanoma umano clone 21 trattati con TNF- α (10 ng/ml). Corsia 1: controllo non trattato; corsia 2: trattamento con TNF- α 10 ng/ml per 15 min; corsia 3: trattamento con TNF- α 10 ng/ml per 60 min.

*RISULTATI DEL PRETRATTAMENTO CON PARTENOLIDE
SULL'ATTIVAZIONE DI NFκB.*

Come noto dai dati in letteratura (Delhalle S. & al., 2004) il partenolide inibisce l'attivazione di NFκB. In fig.12 si può osservare che il pretrattamento con partenolide alla concentrazione di 5μM per 2 ore inibisce l'attivazione di NFκB (valutato tramite EMSA) operata dal successivo trattamento con il TNF-α alla dose di 10 ng/ml per 1 ora, confermando così i dati della letteratura.

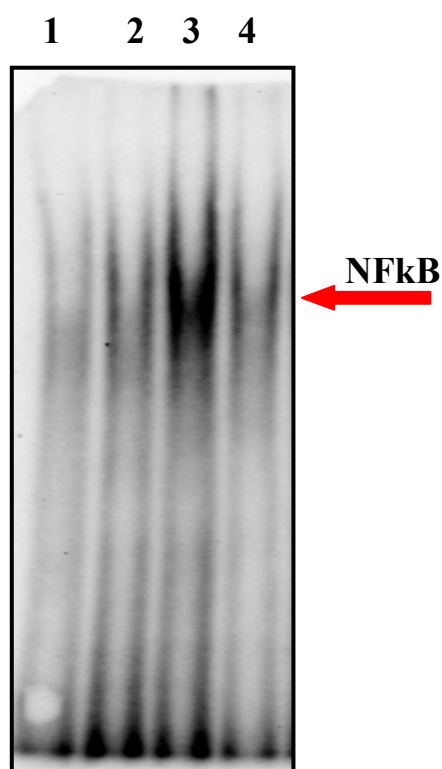


Figura 12. EMSA su cellule di melanoma umano clone 21 pretrattate con partenolide e trattate con TNF-α. Corsia 1: controllo non trattato; corsia 2: pretrattamento con partenolide 5 μM per 2 ore seguito dal trattamento con TNF-α 10 ng/ml per 1 ora; corsia 3: trattamento con TNF-α 10 ng/ml per 1 ora corsia 4: trattamento con TNF-α 10 ng/ml per 1 ora, nella miscela di reazione dell'EMSA è stato aggiunto un eccesso di competitore oltre alla sonda per NFκB (vedi Materiali e Metodi).

La fig. 13 mostra i risultati del pretrattamento con partenolide sulla sovraespressione della GSTO indotta dal TNF- α , valutata mediante Immunoblotting. Il pretrattamento con partenolide abolisce completamente l'incremento quantitativo della GSTO prodotto dal trattamento con TNF- α .

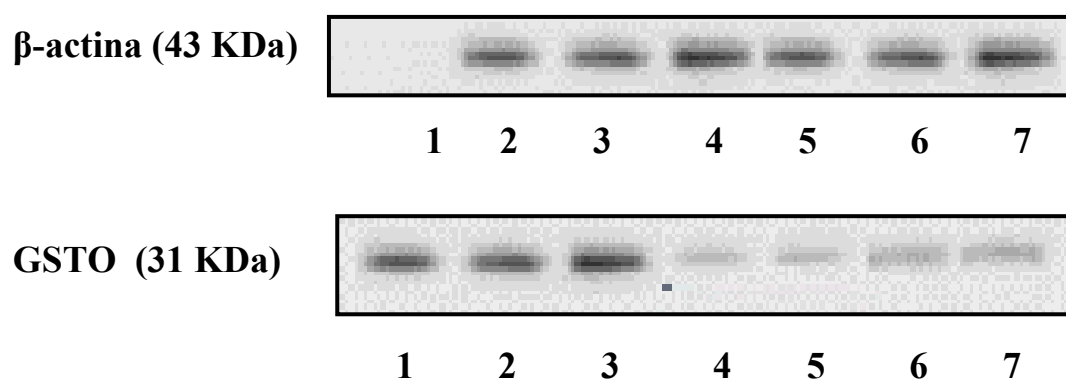


Figura 13. Immunoblotting di cellule di melanoma clone 21 pretrattate con partenolide e trattate con TNF- α . Rilevazione con anticorpo anti-GSTO1. In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Le cellule sono state seminate 24 ore prima del trattamento ad una densità di 100000 cell/piastra Petri 60mm. Corsia 1: GSTO-1 ricombinante; corsie 2 e 3: TNF- α 10 ng/ml per 16 ore; corsie 4 e 5: pretrattamento con partenolide 5 μ M per 2 ore e successivo trattamento con TNF- α 10 ng/ml per 1 ora; corsia 6: trattamento con il solo partenolide 5 μ M per 18 ore; corsia 7: controllo.

B) Effetto dell'aumento della densità cellulare sulla espressione della GSTO

RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE IMMUNOBLOTTING

L'aumento della densità cellulare nel corso del tempo ha determinato sul monostrato del clone 21 l'espressione di livelli della GSTO progressivamente crescenti (Fig. 14).

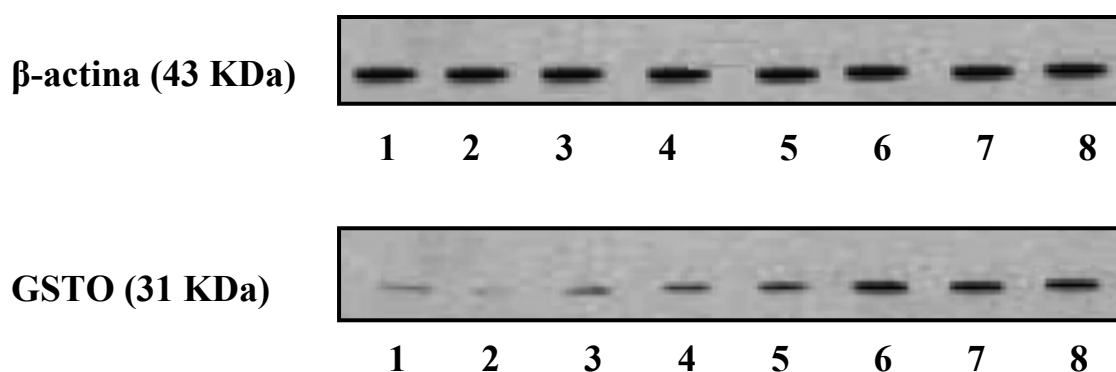


Figura 14. Immunoblotting di monostrati cellulari di melanoma umano clone 21 a vari tempi dall'impianto. Le cellule sono state seminate ad una densità di 100000 cell/piastra Petri 60 mm e raccolte a 24 ore, 48 ore, 72 ore e 96 ore dalla semina. Rilevazione con siero anti-GSTO1. In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Corsie 1 e 2: monostrati cellulari raccolti a 24 ore; corsie 3 e 4: monostrati cellulari raccolti a 48 ore; corsie 5 e 6: monostrati cellulari raccolti a 72 ore; corsie 7 e 8: monostrati cellulari raccolti a 96 ore.

Nella figura 15 è riportata la media dell'analisi densitometrica delle bande immunoreattive ottenute in 2 esperimenti analoghi a quello riportato in

fig.14. Come si può vedere dopo 72 ore di incubazione si osserva un aumento della densità ottica relativa della GSTO1 di circa 3 volte che si mantiene pressochè inalterato alle 96 ore.

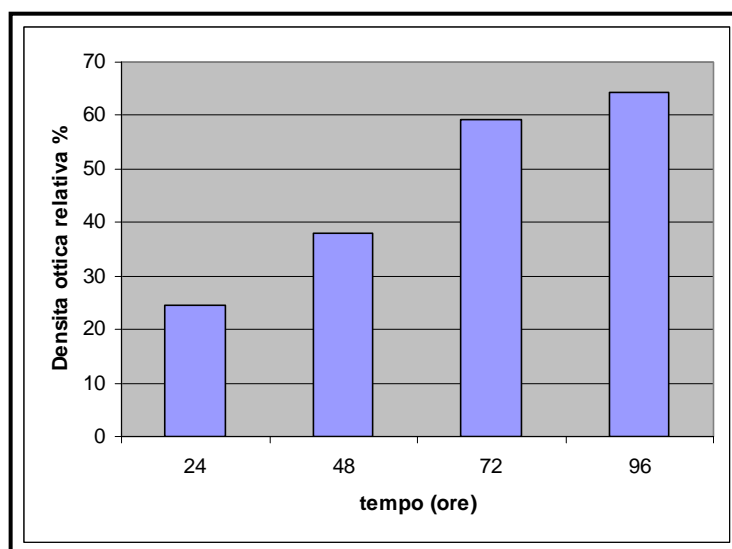


Figura 15. Analisi densitometrica delle bande immunoreattive di due esperimenti analoghi a quello riportato in Fig. 14 . In ordinata sono riportati i valori del rapporto tra la densità ottica della banda relativa alla GSTO e quella relativa all'actina. In ascissa sono riportati i tempi di incubazione a cui è stata effettuata la misurazione.

Al fine di accertare che l'effetto osservato sia conseguenza dell'aumentata densità cellulare e non del tempo di incubazione, l'esperimento è stato ripetuto seminando le cellule a diversa densità (100000 e 400000 cellule/piastra) e raccogliendo i campioni dopo lo stesso tempo di incubazione (24 ore).

Il risultato, mostrato in fig.16, evidenzia chiaramente che la sovraespressione della GSTO è dovuta all'aumento della densità cellulare e non al tempo di incubazione.

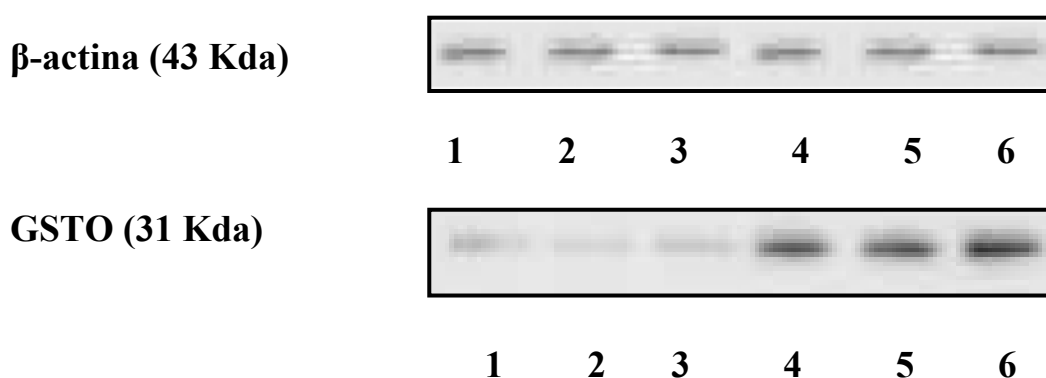


Figura 16. Immunoblotting di monostrati cellulari di melanoma umano clone 21 seminate alla densità di 100000 e 400000 cellule/piastra Petri. Rilevazione con siero anti-GSTO1. In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Corsie 1, 2 e 3: monostrati cellulari seminati ad una densità di 100000 cellule e raccolti a 24 ore; corsie 4, 5 e 6: monostrati cellulari seminati a una densità di 400000 cellule e raccolti a 24 ore.

RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE RT-PCR

Per identificare se l'aumento della banda immunoreattiva della GSTO osservato nei precedenti esperimenti (Fig. 14, 15 e 16) fosse ascrivibile alla GSTO1 o alla GSTO2, è stata effettuata l'RT-PCR con due coppie di primer specifici.

In fig.17 possiamo osservare i risultati dell'elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti dell'RT-PCR che indica come l'aumento della densità cellulare

induca l'aumento della GSTO2 mentre la GSTO1 rimane invariata. Come controllo dell'amplificazione è stata usata la GAPDH.

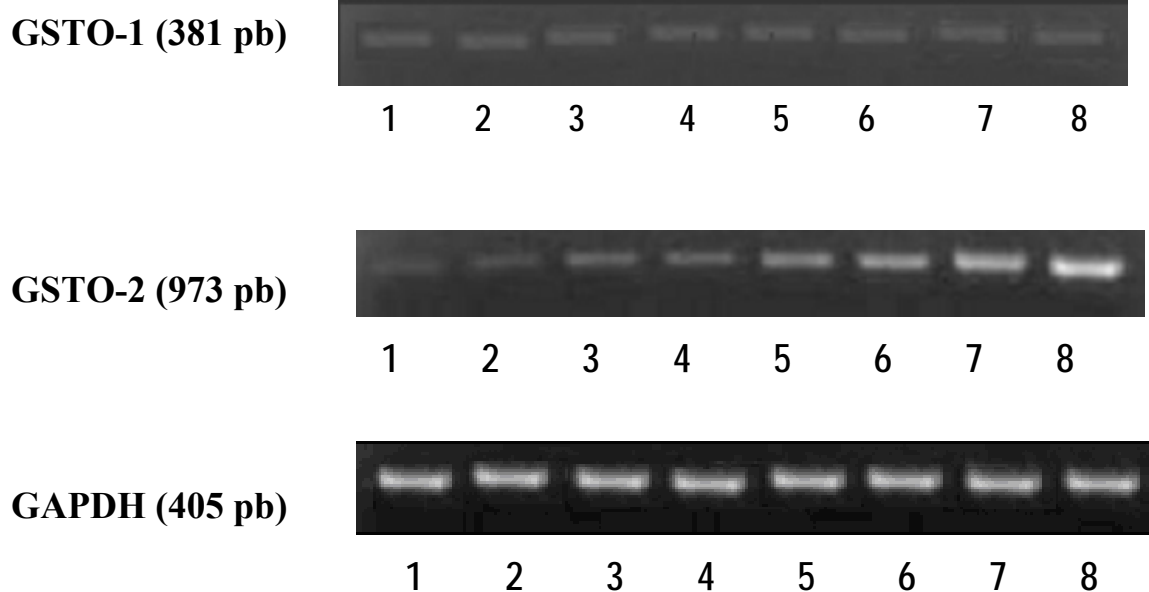


Figura 17. Effetti dell'aumento della densità cellulare sull'espressione della GSTO1 e della GSTO2 valutati tramite RT-PCR. L'aumento della densità cellulare è stato osservato su cellule di melanoma clone 21 raccolte a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina. Corsie 1 e 2, monostrati cellulari raccolti a 24 ore; corsie 3 e 4, monostrati cellulari raccolti a 48 ore; corsie 5 e 6, monostrati cellulari raccolti a 72 ore; corsie 7 e 8, monostrati cellulari raccolti a 96 ore.

Nella figura 18 è riportata la media dell'analisi densitometrica delle bande relative alla GSTO1 e alla GSTO2 ottenute in 2 esperimenti analoghi a quello riportato in fig. 17.

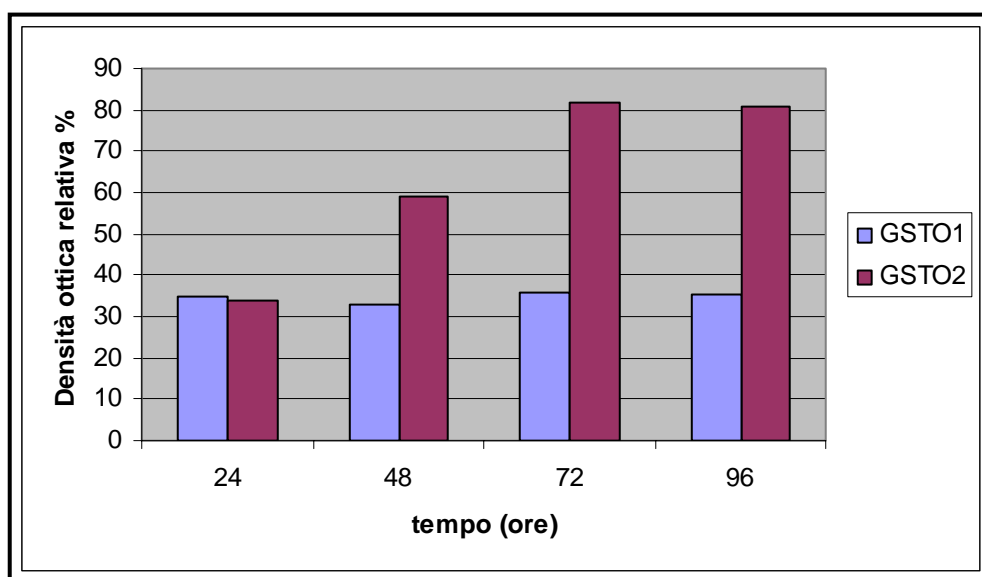


Figura 18. Analisi densitometrica delle bande relative al mRNA della GSTO1 e della GSTO2 ottenute da 2 esperimenti analoghi a quello riportato in Fig.17. Sulle ordinate viene riportato il valore del rapporto tra la densità della banda della GSTO1 o della GSTO2 e quella della GAPDH, ottenute con la metodica dell'RT-PCR. I risultati derivano da tre esperimenti analoghi a quello illustrato nella Fig. 17. Le cellule del clone 21 sono state seminate ad una densità di 700000 cellule su piastra Petri da 150 mm e raccolte dopo 24 ore, 48 ore, 72 ore e 96 ore.

RISULTATI DELL'ANALISI IMMUNOBLOTTING SULLA LINEA CELLULARE U937

Al fine di valutare se l'aumento dell'espressione della GSTO2 sia dovuto al semplice aumento della densità cellulare o a fenomeni connessi alla confluenza cellulare quali la formazione di giunzioni intercellulari, l'adesione al substrato, l'inibizione da contatto etc, gli esperimenti sono stati ripetuti utilizzando una linea cellulare (U937) la cui modalità di crescita è in sospensione, in cui pertanto si può valutare l'effetto di un aumento della densità cellulare, ma non quello della confluenza. Utilizzando tale linea non si osserva nessun incremento quantitativo dell'espressione delle GSTO (valutata tramite Immunoblotting) all'aumentare della densità cellulare (Fig.19).

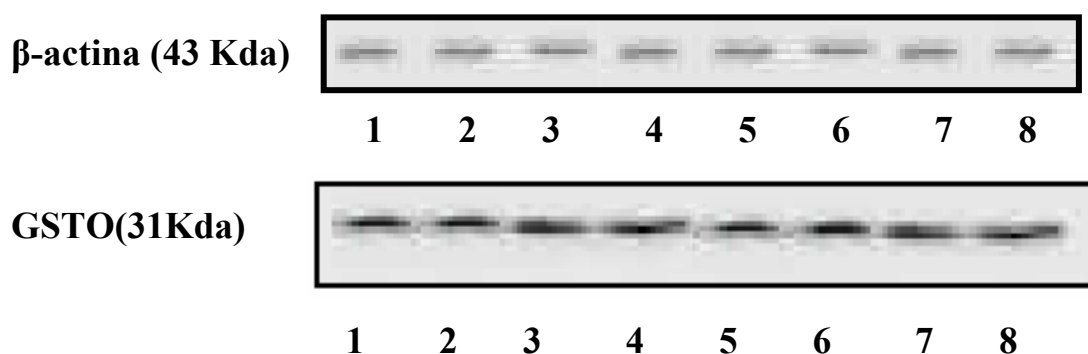


Figura 19. Immunoblotting di cellule in sospensione U937 raccolte a vari tempi. Rivelazione con anticorpo anti-GSTO1. . In ogni pozzetto sono stati caricati 4 μ g di proteine totali. Le cellule U937 sono state seminate ad una densità di 100000 cellule su piastra Petri da 60 mm. Corsie 1 e 2: cellule U937 raccolte a 24 ore, Corsie 3 e 4: cellule U937 raccolte a 48 ore, Corsie 5 e 6: cellule U937 raccolte a 72 ore, Corsie 7 e 8: cellule U937 raccolte a 96 ore.

*RISULTATI DELL'ANALISI TRAMITE ELECTROPHORETIC MOBILITY
SHIFT ASSAY*

L'EMSA effettuato sul nucleosol sia delle cellule di melanoma che delle U937 a diversi stadi di densità ha mostrato l'assenza dell'attivazione di NFkB in ciascuno stadio, tranne una leggera attivazione alle 96 ore.

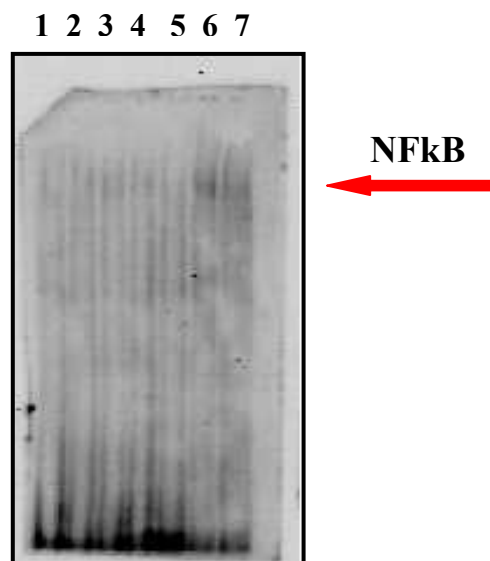


Figura 20 A. EMSA delle proteine nucleari di cellule adese del clone21 raccolte a vari tempi dopo l'impianto Corsie 1 e 2: cellule raccolte dopo 24 ore; corsie 3 e 4: cellule raccolte dopo 48 ore; corsie 5 e 6: cellule raccolte dopo 72 ore; corsia 7: Cellule raccolte dopo 96 ore.

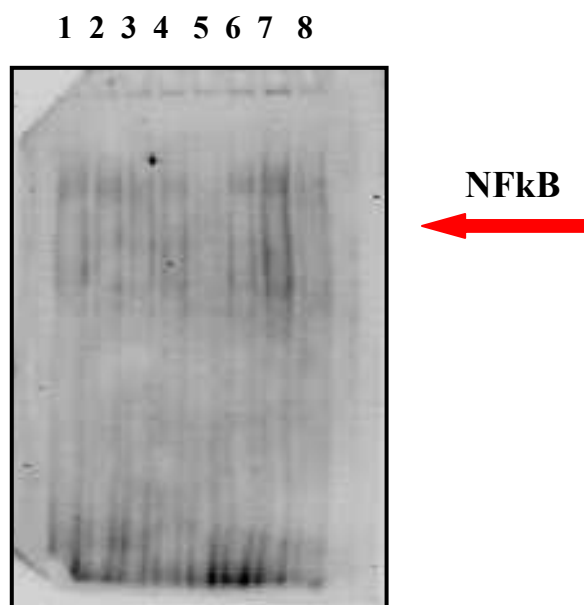


Figura 20 B. EMSA delle proteine nucleari di cellule in sospensione U937 raccolte a vari tempi dopo l'impianto. Corsie 1 e 2: cellule raccolte dopo 24 ore; corsie 3 e 4: cellule raccolte dopo 48 ore; corsie 5 e 6: cellule raccolte dopo 72 ore; corsie 7 e 8: Cellule raccolte dopo 96 ore.

Appendice

IMMUNOBLOTTING EFFETTUATO SU CITOSOL DI TESTICOLO E UTERO UMANO

La fig.21 mostra i risultati di un Immunoblotting effettuato su citosol di testicolo e utero umano.

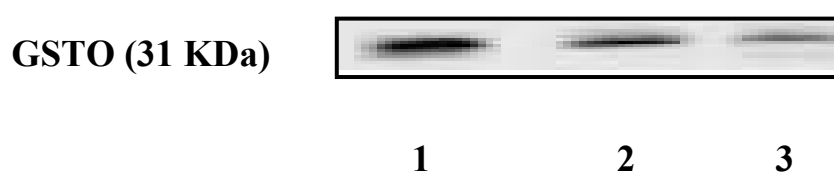


Figura 21. ImmunoBlotting della frazione citosolica di testicolo e utero umano. Rivelazione con siero anti-GSTO1. Corsia 1: GSTO1 purificata, 200 ng; corsia 2 : citosol di utero umano, 15 µg; corsia 3: citosol di testicolo umano, 15 µg.

Come si osserva l'anticorpo contro la GSTO1 rivela una banda immunoreattiva corrispondente alla GSTO1 standard sia nel citosol di utero (corsia 2), dove viene espressa essenzialmente la GSTO1, che nel citosol di testicolo (corsia 3), dove viene espressa esclusivamente la GSTO2 (Board & al., 2000). Questo dato dimostra la cross-reattività del nostro anticorpo anti GSTO1 con la proteina GSTO2, confermando i dati ottenuti da E.M. Schmuck & al. (2005).

DISCUSSIONE

Lo scopo della presente tesi è stato quello di iniziare uno studio sui meccanismi che regolano l'espressione della GSTO1 e della GSTO2 in linee cellulari umane. A tal fine abbiamo scelto due condizioni sperimentali: l'induzione da parte del TNF- α e l'effetto dell'aumento della densità cellulare. I motivi che ci hanno portato alla scelta di questi modelli sono stati esposti nella sezione "Scopo della tesi". Brevemente, è noto che il TNF- α induce l'attivazione di NFkB e che tale attivazione può causare l'aumentata espressione di alcune GST (Pinkus R. & al., 1996; Morceau F. & al., 2004). Inoltre è stato dimostrato anche che l'aumento della densità cellulare induce la sovraespressione di stress protein di piccolo peso molecolare che, con le GST, fanno parte di una medesima famiglia ancestrale (Koonin E.V. & al., 1994). Inoltre Kodym R. & al. (1998) hanno dimostrato che la GSTO murina ha caratteristiche tipiche delle stress protein di piccolo peso molecolare.

Dal punto di vista metodologico, gli effetti dei vari trattamenti sull'espressione delle due proteine sono stati valutati determinando sia la quantità delle proteine tramite Immunoblotting sia la quantità dei relativi mRNA tramite RT-PCR.

Per quanto riguarda le indagini condotte tramite Immunoblotting, l'attuale studio ha sofferto di una limitazione dovuta al tipo di anticorpo attualmente a nostra disposizione. Tale anticorpo è stato prodotto nel laboratorio dove ho svolto la presente tesi, utilizzando come antigene la GSTO1 ricombinante. Dato che l'omologia di sequenza tra la GSTO1 e la GSTO2 è del 64%, è ragionevole pensare che l'anticorpo specifico per la GSTO1 riconosca anche la GSTO2. I dati in letteratura confermano tale ipotesi (Schmuck E.M. & al., 2005). Al fine di verificare se anche l'anticorpo prodotto nel nostro laboratorio riconosce entrambe le forme delle GSTO abbiamo effettuato un Immunoblotting utilizzando il citosol di utero e di testicolo umano. E' noto dai dati in letteratura (Board & al., 2000) che nell'utero umano viene espressa essenzialmente la GSTO1 e nel testicolo umano esclusivamente la GSTO2. Come si può osservare nella Fig. 21 l'anticorpo anti GSTO1 rivela una banda immunoreattiva anche nel citosol di testicolo ed è quindi in grado di riconoscere la GSTO2. Per risolvere questo problema sono in corso di preparazione anticorpi specifici per la GSTO1 e la GSTO2. A tal fine sono state scelte due sequenze amminoacidiche delle due proteine completamente diverse tra loro. Tali sequenze sono state coniugate con un carrier (KLH, Keyhole Limpet Hemocianin) e utilizzate per immunizzare due conigli.

Per i motivi descritti gli studi di Immunoblotting effettuati in questo lavoro non sono in grado di discriminare tra le due proteine GSTO1 e GSTO2. La differenziazione è stata effettuata tramite la determinazione dei relativi mRNA con la tecnica RT-PCR.

Ovviamente, come più volte detto nei Risultati, questa tecnica non fornisce informazioni su eventuali regolazioni post-traduzionali, quali sintesi e turnover proteico, che potrebbero avere un ruolo nell'espressione finale della proteina.

Il trattamento con TNF- α è stato effettuato su una linea di melanoma umano (Me665/2/21). Nei test preliminari abbiamo provato diverse dosi di TNF- α a diverse densità cellulari (Fig. 5 A e 5 B). Si è evidenziato, seminando le cellule alla densità minore (100000 cellule/piastra), che il TNF- α è in grado di aumentare significativamente l'espressione delle GSTO, valutata tramite Immunoblotting. L'effetto più significativo del trattamento è stato ottenuto con la dose di TNF- α di 10 ng/ml per 16 ore, con una densità di 100000 cellule per piastra Petri da 60 mm, seminate 24 ore prima del trattamento. Questo protocollo è stato utilizzato nei successivi esperimenti.

La Fig. 7 mostra un tipico risultato ottenuto tramite Immunoblotting. E' evidente il notevole aumento delle GSTO dopo trattamento con TNF- α .

I risultati di quattro esperimenti analoghi sono stati quantificati tramite lettura densitometrica della banda relativa alle GSTO corretta tramite rapporto con la banda dell'actina. I risultati, mostrati in Fig. 8, mostrano un aumento quantitativo delle GSTO di circa quattro volte rispetto ai campioni controllo.

Poiché, come già detto, l'anticorpo non è in grado di distinguere tra le due forme, GSTO1 e GSTO2, sono state effettuate indagini tramite l'RT-PCR utilizzando primers specifici per le due forme di glutatione transferasi, come descritto in "Materiali e Metodi".

La Fig. 9, che riporta un tipico esperimento, mostra un chiaro aumento del mRNA relativo alla GSTO1, mentre quello della GSTO2 rimane invariato. L'analisi densitometrica (Fig. 10) effettuata su due esperimenti analoghi, mostra un aumento di tre volte del mRNA della GSTO1 dopo trattamento con TNF- α .

Il TNF- α è un mediatore proinfiammatorio (Delhalle S. & al., 2004) che regola molti processi della risposta immune, del ciclo cellulare e dell'apoptosi attraverso vie di trasduzione del segnale il cui scopo è di trasferire il segnale del TNF- α al nucleo. Tra queste quella forse più rilevante è quella che opera tramite l'attivazione del fattore trascrizionale NFkB. Nelle nostre condizioni sperimentali il TNF- α induce la traslocazione nucleare di NFkB già dopo 15 min di trattamento (Fig. 11).

NFkB è un fattore di trascrizione nucleare che, in condizioni normali, è sequestrato nel citoplasma attraverso il legame con una famiglia di proteine inibitrici (Ikb). L'azione di vari stimoli (citochine, lipopolisaccaridi, fattori di crescita, stress ossidativo ed altri) inducono l'attivazione di un complesso di chinasi (IKK) che fosforilano Ikb. Tale fosforilazione provoca l'attacco dell'ubiquitina e la degradazione di Ikb stesso. NFkB è quindi libero di entrare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni target (Delhalle S. & al., 2004; Ravid T. & Hochstrasse M., 2004; Hayden M.S. & Ghosh S. 2004). Circa il 40% dei geni regolati dal TNF- α dipende da NFkB, di questi il 17% è regolato precocemente (1-4 ore) e il 23% è regolato tardivamente (fino a 48 ore) (Banno T. & al., 2005).

Al fine di verificare se la sovraespressione delle GSTO, indotta dal TNF- α avviene tramite l'attivazione di NFkB, abbiamo verificato l'effetto del partenolide. Il partenolide è un noto inibitore dell'attivazione di NFkB (Delhalle S. & al. 2004; Banno T.& al., 2005; Hehner S.P. & al., 1998; Hehner S.P. & al., 1999). Tale molecola blocca, con meccanismo ancora da definire nei dettagli, il complesso delle chinasi di NFkB chiamate IKC (multisubunity Ikb Kinasi Complex) inibendo con ciò la fosforilazione e quindi la successiva degradazione di alcuni inibitori di Ikb, in particolare Ikb α e Ikb β (Hehner S.P. & al., 1998; Hehner S.P. & al., 1999). Il pretrattamento delle cellule di melanoma clone 21 con il partenolide

inibisce l'attivazione di NFkB operata dal TNF- α . (Fig. 12). I dati ottenuti dai nostri esperimenti preliminari dimostrano che il pretrattamento con partenolide blocca la sovraespressione della GSTO1 da parte del TNF- α . (Fig. 13). Questi risultati fanno pertanto supporre che la GSTO1 appartenga al set di geni regolati da NFkB. Tali dati dovranno essere comunque confermati tramite l'uso di altri inibitori (Resveatrol, Aspirina) e dell'inibizione specifica degli oligonucleotidi Decoy.

L'effetto della densità cellulare sull'espressione delle GSTO è stato anch'esso studiato sulla linea cellulare di melanoma, clone 21. Tale effetto, come già riferito nella sezione "Scopo della tesi", è stato osservato inizialmente durante gli studi sull'effetto del TNF- α . Nel corso degli esperimenti preliminari si era osservato infatti che ad un'aumentata densità cellulare corrispondeva un notevole incremento della quantità delle GSTO, valutata in base all' Immunoblotting (Fig. 14). Gli esperimenti sono continuati valutando l'effetto della densità cellulare con due diversi approcci: i) seminando la stessa quantità di cellule (100000 cellule/piastra) e prelevando campioni a tempi diversi (da 24 a 96 ore); ii) seminando quantità diverse (100000 e 400000 cellule/piastra) e raccogliendo i campioni allo stesso tempo (24 ore). In entrambi i casi risulta chiaro che ad un'aumentata densità cellulare corrisponde un notevole incremento delle GSTO (Fig. 14-16).

Anche in questo caso abbiamo effettuato l'indagine RT-PCR per verificare se all'aumento della banda immunoreattiva osservato nei precedenti esperimenti corrisponde l'incremento del mRNA di una o di entrambe le forme. I risultati mostrano un chiaro aumento nel tempo del mRNA della GSTO2, mentre quello relativo alla GSTO1 rimane costante (Fig. 17). L'analisi densitometrica effettuata su due esperimenti mostra un aumento medio della GSTO2 di oltre due volte (Fig. 18). Anche in questo caso, come precedentemente detto, dobbiamo evidenziare che l'indagine tramite RT-PCR non può prendere in considerazione eventuali effetti dovuti alla regolazione post-traduzionale e al turnover delle proteine. Anche in questo

Questi esperimenti verranno ripetuti utilizzando, quando saranno disponibili, gli anticorpi specifici per la GSTO1 e per la GSTO2.

Sulla base dei dati fin qui ottenuti è difficile discriminare se l'induzione della GSTO2 sia dovuta al semplice aumento della densità cellulare o ad altri parametri connessi, quali lo stabilirsi delle giunzioni cellula-cellula e cellula-substrato, l'inibizione da contatto od altri. A tal fine abbiamo ripetuto gli esperimenti nella linea cellulare U937, la cui modalità di crescita è in sospensione anziché adesa al substrato. In tale modello non si osserva sovraespressione delle GSTO in Immunoblotting all'aumentare dei giorni di coltura (Fig. 19).

L'EMSA effettuato su nucleosol sia del clone 21 che delle U937 a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina ha dimostrato che non c'è attivazione di NFκB in entrambe le linee cellulari, ad eccezione di una leggerissima attivazione nelle cellule che vengono raccolte 96 ore dopo la semina (Fig. 20). D'altra parte in tali campioni a 96 ore viene raggiunta un'altissima densità cellulare con possibili fenomeni di sofferenza cellulare che potrebbero essere responsabili della leggera attivazione di NFκB osservata.

Quindi, concludendo, in base a questi dati l'aumento della espressione della GSTO2 osservato nel clone 21 non dovrebbe essere ascrivibile a un semplice aumento della densità cellulare, dato che non si osserva in una linea cellulare in sospensione. Sembrerebbe pertanto che ai fini della sovraespressione della GSTO2 sia necessario lo stabilirsi di connessioni tra cellule o tra cellule e substrato; non si può escludere anche un rapporto con l'attività di divisione cellulare.

Ovviamente sarà necessario verificare se tale fenomeno si ripete su altre linee cellulari dotate sia di crescita in sospensione che di crescita con aderenza al substrato. Sono inoltre programmati esperimenti con inibitori delle giunzioni intercellulari (es. lindano) e con inibitori dell'adesione al substrato (es. polilisina, agar) per chiarire questo meccanismo.

Inoltre è ben noto che la formazione delle giunzioni intercellulari induce sia chemio- che radio-resistenza in cellule in coltura (Mazurov V.V. & al.,

2003; Dimanche- Boitrel M.T. & al., 1994; Muller C. & al., 1992; Durand R.E. & Sutherland R.M., 1972). Sarebbe quindi interessante verificare se il gene della GSTO2 faccia parte del pattern di geni responsabili della chemio e radio-resistenza ai trattamenti antitumorali.

LETTERATURA CITATA

Allocati N., Favalaro B., Masulli M., Alexeyev M.F. & Di Ilio C. (2003). *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem J.* **373**, 305-311.

An J.H. & Blackwell T.K. (2003). SKN-1 links *C.elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* **17**, 1882-1893.

Andrews N.C. & Faller D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2499-2504.

Armstrong R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2-18.

Armstrong R.N. (2000). Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**, 13625-13632.

Arsenic Exposure and Health Effects (1998). *In Proceedings of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects* (Chappel W.R., Abernathy C.O. & Calderon R.L. Eds.) Elsevier Science Ltd., Oxford.

Auron P.E., Webb A.C., Rosenwasser L.J., Mucci S.F., Rich A., Wolff S.M. & Dinarello C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 7907-7911.

Banno T., Gazel A. & Blumenberg M. (2005). Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **280 (19)**, 18973-18980.

Bhakdi S., Muhly M., Korom S. & Schmidt G. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J. Clin. Invest* **85**, 7988-7992.

Bianchi J. & Rose R.C. (1986). Dehydroascorbic acid and cell membranes: possible disruptive effects. *Toxicology* **40**, 75-82.

Bigley R. , Riddle M. , Layman D. & Stankova L. (1981). Human Cell dehydroascorbate reductase kinetic and functional properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **659**, 15-22.

Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermin L.S., Shulte G.K., Danley D.E., Hoth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Rosner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghegan K.F. & Pandit J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Biochem. J.* **275**, 24798-24806.

Cerretti D.P., Kozlosky D.J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T.A., March C.J., Kronheim S.R., Druck T., Cannizzaro L.A., Huebner K., & Blac R.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**, 97-100.

Chatterjee I.B., Majumder A.K., Nandi B.K. & Subramanian N. (1975). Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **258**, 24-47.

Cheneval D., Ramage P., Kastelic T., Szelestenyi T., Niggli H., Hemmig R., Bachmann M. & MacKenzie A. (1998). Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing. *J. Biol. Chem.* **273**, 17846-17851.

Chrestensen C.A., Eckman C.B., Starke D.W. & Mieyal J.J. (1995). Cloning, expression and characterization of human thioltransferase (glutaredoxin) in *E. coli*. **374**, 25-28.

Cullen W.R., McBride B.C., Manji H., Pickett A.W. & Reglinski J. (1989). The metabolism of methylarsine oxide and disulfide. *Appl. Organomet. Chem.* **3**, 71-78.

Delhalle S., Blasius R., Dicato M. & Diederich M. (2004). A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1030**, 1-13.

Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T. & Neill S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**, 159-172.

Dimanche-Boitrel M.T., Genne P., Duchamp O. & Chauffert B. (1994). Confluence dependent resistance (CDR) to doxorubicin and E-cadherin expression in murine mammary cells. *Cancer Lett.* **85**, 171-176.

Dinarelo C.A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist *Int. Rev. Immunol.* **16**, 457-499.

Dixon D. P., Cole D.J. & Edwards R. (2000). Characterization of a Zeta class glutathione transferase from *arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch.Biochem.Biophys.* **384**, 407-412.

Dominici S., Visvikis A., Pieri L., Paolicchi A., Valentini M.A., Comporti M & Pompella A. (2003). Redox modulation of Nf-kB nuclear translocation and DNA binding in metastatic melanoma. The role of endogenous and γ -glutamyl transferase-dependent oxidative stress. *Tumori* **89**, 426-433.

Dulhunty A.F., Haarmann C., Green D., & Hart J. (2000). How many cysteine residues regulate ryanodine receptor channel activity? *Antioxidants Redox Signalling* **2**, 27-34.

Dulhunty A., Gage P., Curtis S., Chelvanayagam G. & Board P. (2001). The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem.* **276**, 3319-23.

Durand R.E. & Sutherland R.M. (1972). Effects of intracellular contact on repair of radiation damage. *Exp. Cell Res.* **71**, 75-80.

Evans J. F., Leville C., Mancini J.A., Prasit P., Therien M. Zamboni R., Gauthier J.Y., Fortin R., Charleson P. & MacIntyre D.E. (1991). 5-lipoxygenaseactivating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol.Pharmacol.* **40**, 22-27.

Ferrari D., Chiozzi P., Falzoni S., Dal Susino M., Melchiorri L., Baricordi O.R. & Di Virgilio F. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* **159**, 1451-1458.

Garrido C., Ottavi P., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A.P., Chauffert B. & Mehlen P. (1997). HSP27 as a Mediator of Confluence.dependent

Resistance to Cell Death Induced by Anticancer Drugs. *Cancer Research* .
57, 2661-2667.

Hall A.G., Autzen P., Cattan A.R., Malcolm A.J., Cole M., Kernahan J. &
Reid M.M. (1994). Expression of mu class glutathione S-transferase
correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic
leukemia. *Cancer Res.* **54**, 5251-5254.

Hanson S.R., Chen A.A., Smith J.B. & Lou M.F. (1999). Thiolation of the
gammaB-crystallins in intact bovine lens exposed to hydrogen peroxide.
J.Biol. Chem. **274**, 4735-4742.

Hayden M.S. & Ghosh S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**,
2195-224.

Hayes J.D. & McLellan L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent
enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative
stress. *Free Radic. Res.* **31**, 273-300.

Hayes J.D. & Pulford D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene
family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer

chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **30**, 445-600.

Hehner S.P., Heinrich M., Bork P.M., Vogt M., Ratter F., Lehmann V., Schulze-Osthoff K., Droge W. & Schmitz M.L. (1998). Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J. Biol Chem.* **273(3)**, 1288-97.

Hehner S.P., Hofmann T.G., Droge W. & Schmitz M.L. (1999). The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. **163 (10)**, 5617-5623.

Hogquist K.A., Unanue E.R. & Chaplin D.D. (1991). Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8485-8489

Holm P.J., Morgenstern R. & Hebert H. (2002). The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22₁2₁ crystals. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**, 276-285.

Hughes R.E. & Maton S.C. (1968). The passage of vitamin C across the erythrocyte membrane. *Brit. J. Haemat.* **14**, 247-253.

Ishikawa T., Casini A.F. & Nishikimi M. (1998). Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *Biochem. J.* **273**, 28708-28712.

Jahngen-Hodge J., Obin M.S., Gong X., Shang F., Nowell T.R. Jr., Gong J., Abasi H., Blumberg J., & Taylor A. (1997). Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 28218-28226.

Jakobsson P-J., Thorén S., Mogenstern R. & Samuelsson B. (1999a). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7220-7225.

Jakobsson P-J., Mogenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. & Persson B. (1999b). Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* **8**, 689-692.

Kermode H., Williams A.J. & Sitsapesan R. (1998). The interactions of ATP, ADP, and inorganic phosphate with the sheep cardiac ryanodine receptor. *Biophys. J.* **74**, 1296-1304.

Khojasteh-Bakht S.C., Nelson S.D. & Atkins W.M. (1999). Glutathione S-transferase catalyzes the isomerization of (R)-2-hydroxymenthofuran to mintlactones. *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 59-65.

Kobayashi M., Itoh K., Suzuki T., Osanai H., Nishikawa K., Katoh Y., Takagi Y., Yamamoto M. (2002). Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* **7**, 807-820.

Kodym R., Calkins P. & Story M. (1999). The cloning and characterization of a New Stress Response Protein A MAMMALIAN MEMBER OF A FAMILY OF A θ CLASS GLUTATHIONE S-TRANSFERASE -LIKE PROTEINS *Biochem. J.* **274**, 5131-5137.

Koonin E.V., Mushegian A.R., Tatusov R.L., Altschul S.F., Bryant S.H., Bork P. & Valencia A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1

gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling *Protein Sci.* **3**, 2045-2054.

Ladner J.E., Parsons J.F., Rife C.L., Gilliland J.L. & Armstrong R.N. (2004). Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* **43**, 352-361.

Laliberte R.E., Perregaux D.G., Hoth L.R., Rosner P.J., Jordan C.K., Peese K.M., Egger J.F., Dombroski M.A., Geoghegan K.F. & Gabel C.A. (2003). Glutathione S-Transferase Omega 1-1 Is a Target of Cytokine Release Inhibitory Drugs and May Be Responsible for Their Effect on Interleukin-1 β Posttranslational Processing. *Biochem. J.* **278**, 16567-16578.

Laver D.R., Roden L.D., Ahern G.P., Eager K.R., Junankar P.R. & Dulhunty A.F. (1995). Cytoplasmic Ca²⁺ inhibits the ryanodine receptor from cardiac muscle. *J. Membr. Biol.* **147**, 7-22.

Leiers B., Kampkötter A., Grevelding C.G. Link C.D, Johnson T.E. & Henkle-Dührsen K. (2003). A stress-responsive glutathione S-transferase

confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1405-1415.

Li N. & Karin M. (1999). Is NFκB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* **13**, 1137-1143.

Maellaro E., Del Bello B., Sugherini L., Santucci A., Comporti M. & Casini A.F. (1994). Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem. J.* **301**, 471-476.

March C. J., Mosley B., Larsen A., Cerretti D.P., Braedt G., Price V., Gillis S., Henney C.S., Kronheim S.R., Grabstein K., Conlon P.J., Hopp T.P. & Cosman D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**, 641-647.

Mariot P., Prevarskaya N., Roudbaraki M.M., Le Bourhis X., Van Coppenolle F., Vanoverberghe K., & Skryma R. (2000). Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate* **43**, 205-214.

Mass M.J., Tennant A., Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M., Thomas D.J. & Kligerman A.D. (2001). Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 355-361.

Matsushita N., Aritake K., Takada A., Hizue M., Hayashi K., Mitsui K., Hayashi M., Hirotsu I., Kimura Y., Tani T. & Nakajima H. (1998). Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects. *Jpn. J. Pharmacol.* **78**, 11-22.

Mazurov V.V., Solovieva M.E., Leshchenko V.V., Kruglov A.G., Edelweiss E.F., Yakubovskaya R.I. & Akatov V.S. (2003). Small heat shock protein hsp27 as a possible mediator of intercellular adhesion-induced drug resistance in human larynx carcinoma HEp-2 cells. *Biosci Rep.* **23**, 187-197.

Mehlen P., Mehlen A., Guillet D., Preville X. & Arrigo A.P. (1995) Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem.* **58**, 248-259.

Menegon A., Board P.G., Blackburn A.C., Mellick G.D. & Le Coteur D.G. (1998). Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet*. **352**, 1344-1346.

Morceau F., Duvoix A., Delhalle S., Schnekenburger M., Dicato M. & Diederich M. (2003). Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* **67**, 1227-1238.

Muller C., Laval F., Soues S., Birck C., Charcosset J.Y. (1992). High cell density-dependent resistance and P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in mitoxantrone-selected Chinese hamster cells. *Biochem Pharmacol.* **43**; 2091-102.

National Research Council Report (1999). Arsenic in Drinking Water. *National Academy Press, Washington DC*.

O'Brien M.L. & Tew K.D. (1996). Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* **32A**, 967-978.

Padh H. (1991). Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutrition Reviews* **49**, 65-70.

Pan Z., Damron D., Nieminen A.L., Bhat M.B. & Ma J. (2000). Depletion of intracellular Ca²⁺ by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. *J. Biol. Chem* **275**, 19978-19984.

Paolicchi A., Pezzini A., Saviozzi M., Piaggi S., Andreuccetti M., Chieli E., Malvaldi G. & Casini A.F. (1996). Localization of a GSH-Dependent Dehydroascorbate Reductase in Rat Tissues and Subcellular Fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **333**,489-495.

Patskovsky Y.V., Patskovska L.N. & Listowsky I. (2000). The enhanced affinity for thiolate anion and activation of enzyme-bound glutathione is governed by an arginine residue of human Mu class glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **275**,3296-3304.

Perregaux D., Barberia J., Lanzetti A.J., Geoghegan K.F., Carty T.J. & Gabel C.A. (1992). IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine

formation can be induced specifically by nigericin. *J. Immunol.* **149**, 1294-1303.

Perregaux D. & Gabel C.A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 15195-15203.

Perregaux D.G., Svensson L. & Gabel C.A. (1996). Tenidap and other anion transport inhibitors disrupt cytolytic T lymphocyte-mediated IL-1 beta post-translational processing. *J. Immunol.* **157**, 57-64.

Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E. & Aposhian H.V. (2000). Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 203-207.

Pillsbury S., Watkins D. & Cooperstein S.J. (1973). Effect of dehydroascorbic acid on permeability of pancreatic islet tissue in vitro. *J.Pharmacol. Exp.Ther.* **185**, 713-718.

Pinkus R., Weiner L.M. & Daniel V. (1996). Role of Oxidants and Antioxidants in the Induction of AP-1, NF-kB, and Glutathione S-Transferase Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 13422-13429.

Qian Z., Okuhara D., Abe M. K. & Rosner M.R. (1999). Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 1621-1627.

Radabaugh T.R. & Aposhian H.V. (2000). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: Reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 26-30.

Ravichandran V., Seres T., Moriguchi T., Thomas J.A. & Johnston R.B. Jr. (1994). S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 25010-25015.

Ravid T. & Hochstrasse M. (2004). NF-kappaB signaling: flipping the switch with polyubiquitin chains. *Curr. Biol.* **20**, 898-900.

Robinson A., Huttley G.A., Booth H.S. & Board P.G. (2004). Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa class glutathione transferase predict a novel third transferase family with homology to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* **379**, 541-552.

Rubartelli A., Cozzolino F., Talio M. & Sitia R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**, 1503-1510.

Schmuck E.M., Board P.G., Whitbread A.K., Tetlow N., Cavanaugh J.A., Blackburn A.C. & Masoumi A. (2005). Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenetics* **15**, 493-501.

Seres T., Ravichandran V., Moriguchi T., Rokutan K., Thomas J.A. & Johnston R.B. Jr. (1996). Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational

modification with potential for buffering the effects of oxidant stress *J. Immunol.* **156**, 1973-1980.

Singer I.I., Scott S., Hall G.L., Limjuco G., Chin J. & Schmidt J.A. (1988). Interleukin 1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 389-407.

Stevenson F.T., Torrano F., Locksley R.M. & Lovett D.H. (1992). Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **152**, 223-231.

Strange R.C. & Fryer A.A. (1999). The glutathione S-transferases : influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* **148** 231-249.

Styblo M., Serves S.V., Cullen W.R. & Thomas D.J. (1997). Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 27-33.

Tew K.D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer. Res.* **54**, 4313-4320.

Thornberry N.A., Bull H.C., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., Elliston K.O., Ayala J.M., Casano F.J., Chin J., Ding G. J.-F., Egger L.A., Gaffney E.P., Limjuco G., Palyha, O.C., Raju S.M., Rolando A.M., Mumford R.A., Schmidt J.A., & Tocci M.J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.

Thornberry N.A. & Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 312-316.

Townsend D.M. & Tew K.D. (2003). The role of glutathione.S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369-7375.

Traub L.M. & Kornfeld S. (1997). The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 527-533.

Valenzuela S.M., Martin, D.K., Por S.B., Robbins J.M., Warton K., Bootcov M.R., Schofield P.R., Campbell T.J. & Breit S.N. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **272**, 12575-12582.

Veal E.A., Toone W.M., Jones N. & Morgan B.A. (2002). Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35523-35531.

Vera J.C., Rivas C.I., Fischbarg J. & Golde D.W. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* **364**, 79-82.

Walter P. & Johnson A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 87-119.

Wang M.C., Bohmann D. & Jasper H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Develop. Cell.* **5**, 811-816.

Welch R.W., Wang Y., Crossman A. Jr., Park J.B., Kirk K.L. & Levine M. (1995). Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occur by separate mechanisms. *J.Biol.Chem.* **270**, 12584-12592.

Wells W.W., Xu D.P., Yang Y.F. & Rocque P.A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem.* **265**, 15361-15364.

Whitbread A.K., Tetlow N., Eyre H.J., Sutherland G.R. & Board P.G. (2003). Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* **13**, 131-144.

Wildfang E., Zakharyan R.A. & Aposhian H.V. (1998). Enzymatic methylation of arsenic compounds: VI. Characterization of hamster liver arsenite and methylarsonic acid methyltransferase activities in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **152**, 366-375.

Wolff S.P., Wang G.M. & Spector A. (1987). Pro-oxidant activation of ocular reductants. 1. Copper and riboflavin stimulate ascorbate oxidation causing lens epithelial cytotoxicity in vitro. *Exp. Eye Res.* **45**, 777-789.

Zakharyan R.A. & Aposhian H.V. (1999a). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: The rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1278-1283.

Zakharyan R.A., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E. & Aposhian H.V. (1999). Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 9-15.

Zakharyan R.A., Sampayo-Reyes A., Healy S.M., Tsaprailis G., Board P.G., Liebler D.C. & Aposhian H.V. (2001). Human Monomethylarsonic Acid (MMA(V)) Reductase Is a Member of the Glutathione-S-transferase Superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1051-1057.

Zakharyan R., Wu Y., Bogdan G.M. & Aposhian H.V. (1995). Enzymatic methylation of arsenic compounds. Assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 1029-1038.

