



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE MEDICHE e MEDICINA MOLECOLARE

XXII CICLO

*Studio dei Polimorfismi delle Glutathione trasferasi nell'aumentata
susceptibilità ai processi tumorali. Caratterizzazione Strutturale e
Funzionale della Glutathione Trasferasi di Cianobatterio*

Dottoranda: Sarah Ciccone

A.A. 2009/2010

Docente Guida: Prof. Lo Bello

Coordinatore: Prof. Federici

INDICE

Sommario	3
Abstract	8
Abbreviazioni	11
1. Introduzione	12
1.1 Definizione e proprietà generali	12
1.2 Classificazione ed Evoluzione	13
1.3 GST nelle piante	14
1.4 GST nei procarioti	15
1.5 Le GST citosoliche	17
1.6 Funzione catalitica delle GST	17
1.7 Struttura quaternaria delle GST	20
1.7.1 Residui importanti del sito G	22
1.7.2 Residui importanti del sito H	23
1.8 Ruolo biologico delle GST	24
1.9 GST P1-1	26
1.10 GSTP1-1 e tumore della prostata	26
1.11 Polimorfismi nelle GST citosoliche	28
1.11.1 Conseguenze biologiche dei polimorfismi delle GST	29
1.11.2 Polimorfismi della GSTP1-1 e loro principali conseguenze biologiche	30
1.11.3 Polimorfismo genetico della GST M1-1	33
1.11.4 Polimorfismo genetico della GST T1-1	33
1.12 Clorambucile	35
1.13 Benzene	36
1.14 Cianobatteri	37
1.14.1 <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	38
Progetto di ricerca	39
2. Risultati	42
2.1 STUDI SULLE VARIANTI ALLELICHE DELLA GSTP1-1	42
2.1.1 Attività specifica e proprietà cinetiche delle varianti alleliche della GSTP1-1 in presenza di specifici cosubstrati.	42
2.1.2 Stabilità termica delle varianti alleliche della GSTP1-1	44
2.1.3 Studi di inibizione delle varianti alleliche della GSTP1-1	45
2.2 ANALISI DEL POLIMORFISMO GENETICO NEI GENI UMANI GSTM1 e GSTT1	46
2.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA GST short DI SYNECHOCYSTIS	49
2.3.1 Espressione e purificazione della GST sh	49
2.3.2 Attività specifica e proprietà cinetiche della GST short	49
2.3.3 Stabilità termica	51
2.3.4 Estrazione delle proteine solubili da <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	52
2.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA GSTP1-1 IN LINEE CELLULARI TUMORALI DELLA PROSTATA	53
2.4.1 Studi di Western Blotting condotti sulle linee cellulari di prostata	53
2.4.2 Analisi dell'attività specifica della GSTP1-1 in linee cellulari tumorali prostatiche	55

3 DISCUSSIONE	56
3.1 Studi condotti sulla GSTP1-1 e sui suoi mutanti I104V, A113V e I104V/A113V	56
3.2 Genotipizzazione della GSTM1 e della GSTT1 in campioni di DNA estratto da sangue intero	60
3.3 Caratterizzazione della GST short di cianobatterio	62
3.4 Analisi di espressione della GSTP1-1 in linee cellulari prostatiche a diverso grado patologico	64
Appendice 1: Materiali e Metodi	67
Bibliografia	84
Pubblicazioni	100

SOMMARIO

Le Glutathione Transferasi sono una famiglia di enzimi ubiquitari, ampiamente distribuiti nell'organismo umano e costituiscono parte importante di un meccanismo cellulare integrato di risposta allo stress chimico e ossidativo, che coinvolge diversi sistemi di detossificazione interdipendenti tra loro. Più precisamente, tali enzimi agiscono nella cosiddetta fase II dopo l'intervento del sistema del citocromo P-450, il principale responsabile delle reazioni della fase I, tra le quali la più importante sembra essere quella di ossigenazione (Guengerich, 1990). In questo modo la fase I produce un metabolita più solubile in acqua e meno tossico che può essere escreto direttamente, ma che spesso viene utilizzato come substrato per le reazioni della fase II. Queste ultime prevedono la coniugazione del metabolita attivato ad un composto endogeno polare come il glutathione (GSH), l'acido glucuronico o la glicina. Nella maggioranza delle specie la reazione che avviene più frequentemente nella fase II è rappresentata dalla coniugazione con il GSH, catalizzata dalle GST (Sheehan *et al.*, 2001). In ogni caso, le GST realizzano la loro funzione di protezione catalizzando l'attacco nucleofilo del GSH ridotto, sotto forma di anione tiolato (GS^-), al centro elettrofilo di un'ampia varietà di composti non polari, endogeni e xenobiotici (Armstrong, 1991).

A partire dagli anni '80 sono stati identificati numerosi polimorfismi a carico delle GST (Hayes *et al.* 2000) che contribuiscono a definire le differenze interindividuali in risposta a numerosi composti xenobiotici, compresi farmaci e chemioterapici. Sebbene ormai siano stati identificati polimorfismi per tutte le GST citosoliche, ai fini dei nostri studi, risultano di particolare interesse quelli riguardanti la GSTP1, GSTM1 e GSTT1.

Nel caso delle GSTM1, sono stati individuati sia casi di duplicazione che di deplezione genica (Widersten M. *et al.* 1991; Xu S. *et al.* 1998); queste variazioni sembrano essere responsabili di una differenza di attività nei confronti dei perossidi.

Per la GSTP1 sono state identificate quattro varianti alleliche che differiscono a livello degli aminoacidi 104 e 113 (Ali Osman F. *et al.* 1997; Harries L.W. *et al.* 1997; Watson MA *et al.* 1998).

In fine, per quanto riguarda il gene GSTT1 della classe Theta, esso risulta deletato nel 10%-20% degli individui (Pemble S. *et al.* 1994; Rebbeck T. M., 1997; Strange R. C., Fryer A., 1999); negli individui Theta nulli, la perdita del gene comporta una ridotta capacità dell'enzima a coniugare il GSH con alcuni substrati quali il Dibromoetano (DBE), il Diclorometano (DCM), l'etilene ossido (EO) e il metil bromuro (MB) (Sherhatt P. J. *et al.* 1997; Guengerich F. P. *et al.* 1995).

Il clorambucile è un agente alchilante a base di azoto usato nel trattamento primario della leucemia linfocitica cronica, la più comune leucemia nei paesi occidentali (Foon *et al.*, 1990). Esso sembra svolgere la sua funzione citotossica mediante formazione di legami interstrand di DNA che possono portare la cellula a morte per apoptosi. Uno studio ha riportato che le varianti alleliche della GSTP1-1 possono differire significativamente con l'enzima wt nella capacità di formare il prodotto

di coniugazione GSH-CHL, indicando questi polimorfismi come potenziali responsabili dello sviluppo della farmaco resistenza (Pandya *et al.*, 2000).

Il benzene è un composto ubiquitariamente presente nell'ambiente, in particolare come prodotto del petrolio (Snyder *et al.*, 1993) e del fumo di sigarette (Best *et al.*, 2001). L'esposizione al benzene, che risulta particolarmente frequente per alcune categorie di lavoratori, è stata associata con numerosi effetti dannosi per la salute, mediati da intermedi genotossici e citotossici che inducono danni al DNA (Erexson *et al.*, 1985; Yager *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004) tanto che il benzene è stato riconosciuto come agente carcinogeno di primo livello (WHO, 1993). L'esposizione al benzene si verifica generalmente per inalazione e la misura di benzene nell'urina o nel sangue è utilizzata come marker di una recente esposizione (Weisel *et al.*, 1996; Ashley *et al.*, 1994). Alcuni studi indicano che sia la Glutazione trasferasi T1 (GSTT1) che la Glutazione trasferasi M1 (GSTM1) sono implicate nella detossificazione del benzene ossido (Snyder *et al.*, 1993; Ross, 1996). L'assenza del gene di queste proteine comporta la perdita dell'attività enzimatica (Alves *et al.*, 2002; Seidegard *et al.*, 1988; Sprenger *et al.*, 2000).

La GST P1-1 è, tra i membri della famiglia delle GST, la più espressa nelle linee cellulari tumorali (Doroshov *et al.*, 1995). In modo particolare, tali linee cellulari contengono livelli aumentati di GSTP1-1 rispetto al tessuto sano (Eaton *et al.*, 1999; Tsuchida *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1989), e la sua espressione è, generalmente, inversamente proporzionale alla prognosi e alla risposta ad agenti chemioterapici (Nishimura *et al.*, 1998). Tuttavia, al contrario di quanto accade nella maggior parte dei tumori umani, nel tumore della prostata la GSTP1-1 sembra essere assente (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1998), mentre risulta presente nelle cellule epiteliali basali del tessuto sano le quali vengono perse durante lo sviluppo del tumore invasivo (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997). L'assenza di espressione della GSTP1-1 nel tessuto tumorale risulta associata ad una ipermetilazione del promotore della proteina stessa (Lee *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999).

Oltre alle GST ben caratterizzate dei mammiferi, sono state studiate anche GST provenienti da altri organismi sia eucariotici che procariotici (Sheehan *et al.*, 2001), tra cui i cianobatteri o alghe blu-verdi, considerati progenitori dei cloroplasti vegetali. (Bryant, DA *et al.*, 1986). Il cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803 è diventato un sistema modello per numerosi studi molecolari e biochimici, compresi studi sulla fotosintesi (Gombos *et al.*, 1992), risposta allo stress (Hagemann M. *et al.*, 1990) analisi riguardanti l'heat shock (Suzuki I. *et al.*, 2001).

Il sequenziamento del suo intero genoma ha permesso di assegnare, sulla base delle omologie di sequenza, putativi ruoli funzionali alle diverse proteina codificate, tuttavia molte di queste proteine devono ancora essere caratterizzate da un punto di vista biochimico e fisiologico. In particolare sono state individuate tre putative glutazione trasferasi (sll0067, sll1147 e sll1545).

Scopo del Lavoro

La prima parte del mio progetto di dottorato si propone di analizzare da un punto di vista cinetico la funzionalità delle varianti alleliche della GST P1-1 e di valutarne l'attività in risposta al trattamento con il chemioterapico clorambucile. Per raggiungere questo obiettivo, i mutanti I104V, A113V e I104V/A113V sono stati clonati, espressi in cellule di *E.coli* TOP10 e purificati mediante cromatografia per affinità al glutatione. Le proteine ottenute dalla purificazione sono state utilizzate sia per la caratterizzazione biochimica in presenza di diversi cosubstrati (CDNB, EA, NBD-Cl), sia per effettuare prove di termostabilità a diverse temperature (10°C-55°C), sia per valutare l'effetto inibitore del clorambucile. Inoltre, è stato possibile determinare, mediante cristallografia a raggi X, l'interazione del clorambucile con il sito attivo di queste varianti alleliche in modo da valutare l'eventuale variazione di legame tra l'enzima wt e i suoi mutanti.

Un secondo punto preso in considerazione nel corso del mio progetto di dottorato è stato quello relativo allo studio dei polimorfismi, non solo della GSTP1-1, ma anche delle GSTT1-1 e della GSTM1-1, specialmente nelle loro forme polimorfiche più diffuse (date dalla delezione dei geni GSTM1 e GSTT1). In modo particolare la nostra attenzione si è focalizzata sul ruolo che tali polimorfismi potrebbero avere in soggetti occupazionalmente esposti al benzene. A tale scopo sono stati condotti studi di genotipizzazione per i geni GSTT1, GSTM1 e GSTP1 (anche se l'analisi di quest'ultimo non è stata ancora terminata), condotti su DNA estratto da campioni di sangue intero, accompagnati da studi di carattere fenotipico volti a saggiare l'attività specifica degli enzimi GSTP1-1 e GSTT1-1 presenti nei campioni, utilizzando i substrati specifici per questi enzimi (rispettivamente, CDNB e EPNP). Anche in questo caso le analisi sono ancora in fase di svolgimento.

La terza parte del mio dottorato è stata basata sullo studio della GSTP1-1 in linee cellulari tumorali immortalizzate di prostata a diverso grado patologico. In questo contesto i nostri studi sono consistiti nella coltura di linee cellulari immortalizzate della prostata e nella valutazione dell'alterazione di espressione della GSTP1-1 sia mediante tecnica del Western Blotting, sia mediante saggio dell'attività enzimatica.

In fine, una parte importante del mio dottorato è stata impiegata nella caratterizzazione biochimica di una delle tre GST sequenziate a partire dal genoma del cianobatterio *Synechocystis PCC 6803*. Gli esperimenti di caratterizzazione biochimica sono stati basati sull'individuazione della corretta modalità di purificazione di questo enzima; sull'analisi delle sue proprietà cinetiche in base sia allo studio dell'attività enzimatica, in presenza di diversi cosubstrati, (CDNB, EA, EPNP, NBD-Cl e Cu-OOH), che allo studio della dipendenza dell'attività enzimatica alla concentrazione di GSH utilizzata. Sono stati condotti, inoltre, studi sulla stabilità termica dell'enzima a diverse temperature (10°C-55°C). In fine, queste analisi di tipo biochimico sono state accompagnate da studi di modeling e analisi della sequenza primaria di tale proteina mirati a definirne la struttura tridimensionale e le origini filogenetiche. In conclusione, si è cercato di capire se tale proteina fosse indotta in seguito a stress dato dall'esposizione delle cellule di *Synechocystis* alla luce UV.

Risultati e discussione

La purificazione ha dato risultati simili per tutti gli enzimi (GSTP1-1 wt, I104V, A113V e I104V/A113V), data la loro simile affinità per il GSH. Infatti, gli studi cinetici condotti sulla GSTP1-1 wt e sui suoi mutanti hanno permesso di stabilire che il sito di legame per il GSH (sito G) non è influenzato dalla presenza delle mutazioni.

Saggiando l'attività specifica dei mutanti della GSTP1-1 (I104V, A113V I104V/A113V) in presenza di tre differenti co-substrati (CDNB, EA, NBD-Cl) non sono state trovate differenze rilevanti, fatta eccezione per il mutante I104V (*B) che ha mostrato una significativa riduzione dell'attività nei confronti del CDBN.

Inoltre, è stato possibile osservare un aumento dei valori di K_m^{CDNB} , ad indicare che la mutazione (da Ile a Val) può influenzare il legame del CDBN probabilmente a causa della differente idrofobicità o della differente grandezza tra i due residui.

Nel caso dell'EA, la Tyr108 svolge un ruolo importante nella reazione di addizione di Michael poiché stabilizza lo stato di transizione grazie al suo gruppo idrossile; per questo mutazioni a carico di residui localizzati vicino alla Tyr108 possono alterare la catalisi. In accordo con quanto detto sopra, è possibile osservare nel mutante I104V un decremento di circa 2 volte nei valori di k_{cat} .

In fine, usando l'NBD-Cl come cosubstrato, il principale cambiamento osservato nel mutante I104V è rappresentato dalla forte riduzione del valore di k_{cat} e di efficienza catalitica (da $250 \pm 12 \text{ s}^{-1} \text{ mM}$ a $37 \pm 5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}$). È stato riportato che nella reazione che si verifica usando l'NDB-Cl come cosubstrato, lo step limitante, di natura fisica, è dato dai lenti movimenti dell'elica 4 su cui sono localizzati sia il residuo Tyr108 che Ile104 (Caccuri *et al.*, 1996). Tale rigidità è data dalla possibile presenza di un legame idrogeno tra il gruppo idrossile della Tyr108 e l'atomo di ossigeno dell'NBD-Cl; infatti, la perdita di tale legame nel mutante Y108F comporta un aumento di circa 8 volte del valore di k_{cat} (Lo Bello *et al.*, 1997).

La stabilità termica della GSTP1-1 wt e delle sue varianti all'eliche (I104V, A113V e I104V/A113V) è stata saggiata incubando i vari enzimi a differenti temperature (10-55°C) per 15 minuti. I nostri studi non indicano alcuna riduzione dell'attività enzimatica, anche protrando l'esperimento fino alle 24h il risultato, per tutte le varianti alleliche. Solamente dopo una breve incubazione a 50°C abbiamo osservato una minore termostabilità del mutante 104 rispetto all'enzima wt, in accordo con esperimenti precedentemente condotti (Johansson *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda l'interazione tra il CHL e la GSTP1-1 wt e i suoi mutanti, nel corso del lavoro da noi condotto sono stati effettuati studi cristallografici (Parker M, dell'università di Melbourne) che ci hanno permesso di osservare come questo agente chemioterapico si vada a collocare nel sito-H dell'enzima, secondo le stesse modalità in tutti i mutanti e nell'enzima wt.

L'analisi del genotipo della GST M1-1 e T1-1, condotta su un campione di 183 individui di cui 157 occupazionalmente esposti al benzene e 24 controlli, ha dimostrato che il gene polimorfico GST M1 è

assente nel 45 % circa degli individui, mentre il gene polimorfico GST T1 è assente nel 10% circa degli stessi individui

Il nostro progetto prevede, oltre alla genotipizzazione della GSTT1 e GSTM1 descritta precedentemente, anche l'analisi dei polimorfismi della GSTP1-1 negli stessi soggetti oltre ad un'analisi di tipo fenotipico. La prima verrà eseguita sfruttando le tecniche della PCR e del sequenziamento genico. La seconda mediante saggio di attività enzimatica direttamente su lisato di eritrociti, dopo centrifugazione per rimuovere la membrana sia in presenza di CDNB (substrato della GST P1-1) che di EPNP (substrato preferenziale della GST T1-1).

Le analisi condotte sulla GST short ci permettono di ottenere una prima caratterizzazione di questo enzima.

In primo luogo è stato possibile osservare una buona similarità di sequenza con le GSTI e GSTIII di *Zea mays* particolarmente a carico dei residui presenti nel sito G. Inoltre, dalle analisi condotte sull'attività specifica dell'enzima in presenza di differenti cosubstrati (CDNB, EA, EPNP, Cu-OOH e NBD-Cl) è stato possibile osservare una buona attività perossidasi dell'enzima. Dagli studi di stabilità termica risulta che la GST short è molto più termolabile della GSTP1-1 umana, infatti la sua attività si riduce già a partire dai 40°C e diventa più bassa dell'88% a 50°C. Anche in questo caso la bassa stabilità dell'enzima a partire da temperature inferiori rispetto a quelle mostrate dalla GSTP1-1 umana potrebbe essere attribuita alla sua diversa struttura.

In fine, per quanto riguarda l'analisi dei livelli di GSTP1-1 in linee cellulari prostatiche mediante tecnica di Western Blotting, la presenza della banda corrispondente alla GSTP1-1 risulta essere particolarmente evidente nelle cellule iperplastiche benigne (BPH) che rappresentano il nostro controllo positivo. Si tratta, infatti, di cellule che presentano un certo grado di iperplasia ma che non sono tumorali; per questo motivo risulta evidente la presenza dell'enzima GSTP1-1 il cui promotore non è metilato. Nelle linee cellulari tumorali del gruppo G2, associato ad una prognosi positiva per il paziente, la banda di espressione della GSTP1-1 risulta presente ma con un'intensità minore rispetto a quella presente nelle linee cellulari iperplastiche benigne. Inoltre, in base agli studi da noi condotti, ad un maggiore livello di aggressività del tumore (linee cellulari del gruppo G1, associate ad una peggiore prognosi per il paziente) corrisponde una sempre minore espressione della banda relativa alla GSTP1-1 che, infatti, risulta del tutto assente nelle linee cellulari tumorali metastatiche, LNCaP (controllo negativo).

Ulteriori analisi di western blotting condotte andando ad analizzare la presenza delle GSTT1-1, GSTM2-2 e GSTA1-1, ci hanno permesso di escludere che la scomparsa della GSTP1-1 fosse in qualche modo compensata dalla comparsa di GST appartenenti ad altre classi.

In fine, i valori di Attività Specifica, calcolati usando GSH 1 mM e CDNB 1mM, risultano progressivamente più bassi passando dalle linee cellulari iperplastiche benigne (HBP) fino a diventare nulli nelle linee cellulari tumorali metastatiche, LNCaP ad ulteriore conferma di quanto osservato mediante Western Blotting.

ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GST_s) are considered part of a coordinated defence strategy, together with other GSH-dependent enzymes, the cytochrome P450s (Phase I enzymes) and some membrane transporters (Phase III) such as MRP1 and MRP2, to remove from the cell the products of oxidative stress generated after interaction of reactive oxygen species, that escape the first line of defense, with cellular macromolecules such as DNA, lipids and proteins.

Glutathione S-transferases (EC 2.5.1.18) catalyze the conjugation of glutathione (GSH) with a variety of toxic compounds (carcinogens, anticancer drugs, reactive oxygen species and products of cellular metabolism) that contain an electrophilic atom, i.e. carbon, nitrogen or sulphur. In mammals, there are three major families of proteins that exhibit glutathione transferase activity: two of these, the cytosolic and mitochondrial GSTs, comprise soluble enzymes, while the third family are microsomal (MAPEG) and are referred to as membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (Hayes et al., 2005). The human cytosolic GSTs are dimeric proteins; each subunit contains a very similar binding site for GSH (G-site) and a second one for the hydrophobic co-substrate (H-site). Structural differences at the H-site confer a certain degree of substrate selectivity. The human cytosolic GSTs can be grouped into at least seven gene-independent classes on the basis of their amino acid sequence and immunological properties: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega, and Zeta

Cytosolic GSTs display polymorphisms in humans, and this is likely to contribute to interindividual differences in responses to xenobiotics. A lot of studies suggest that combinations of polymorphisms in Mu, Pi, and Theta class GST contribute to diseases development.

In the first part of this work we analyzed three common polymorphisms in the GSTP1, GSTT1, and GSTM1 genes either decrease or abolish GST enzyme activity: the GSTP1 allelic variants, that differ at either a single codon position (Ile104 (HGSTP1*A), Val104 (HGSTP1*B), Val113 HGSTP1*D) or at two different positions (Val104/Val113 (HGSTP1*C)), and the homozygous deletions of the GSTT1 or GSTM1 gene that lead to an absence of enzymatic activity.

The commonly used anti-cancer drug chlorambucil is the primary treatment for patients with chronic lymphocytic leukaemia. Chlorambucil has been shown to be detoxified by human glutathione transferase Pi (GST P1-1), an enzyme that is often found over-expressed in cancer tissues. The allelic variants of GST P1-1 are associated with differing susceptibilities to leukaemia and differ markedly in their efficiency in catalysing glutathione (GSH) conjugation reactions. Here, we perform detailed kinetic studies of the allelic variants with the aid of three representative co-substrates. We show that the differing catalytic properties of the variants are highly substrate-dependent. We show also that all variants exhibit the same temperature stability in the range 10 °C to 55 °C. We have determined the crystal structures of GST P1-1 in complex with chlorambucil and its GSH conjugate for two of these allelic variants that have different residues at positions 104 and 113. Chlorambucil is found to bind in a non-productive mode to the substrate-

binding site (H-site) in the absence of GSH. This result suggests that under certain stress conditions where GSH levels are low, GST P1-1 can inactivate the drug by sequestering it from the surrounding medium. However, in the presence of GSH, chlorambucil binds in the H-site in a productive mode and undergoes a conjugation reaction with GSH present in the crystal. The crystal structure of the GSH–chlorambucil complex bound to the *C variant is identical with the *A variant ruling out the hypothesis that primary structure differences between the variants cause structural changes at the active site. Finally, we show that chlorambucil is a very poor inhibitor of the enzyme in contrast to ethacrynic acid, which binds to the enzyme in a similar fashion but can act as both substrate and inhibitor.

In another part of this work we determined in the peripheral blood lymphocytes of 157 workers exposed to benzene, using 25 individuals not exposed as external controls, the presence of polymorphic genes GSTT1 and GSTM1 and the distribution of GSTP1 allelic variants. We have also evaluated the glutathione transferases (GST) activities and the levels of glutathionylated hemoglobin in the RBC of the same samples. Because this study is in progress again, we can't establish the final conclusions.

During my Phd project I have also analyzed the presence of GSTP1-1 enzyme in prostatic cancer cells lines. In contrast to frequent overexpression of GST-pi observed in many types of cancer, the vast majority of primary human prostate tumors contain no detectable GST pi. So, this enzyme is abundant in normal prostate basal epithelial cells, but basal cells are lost during development of invasive cancer. Absence of GST pi expression in human prostate cancer is accompanied by hypermethylation of regulatory sequences within the GST pi gene, whereas no such hypermethylation is present in normal tissues or benign prostatic hyperplasia (HPB). So we employed Western blot analysis and specific activity assays to measure GST pi expression in different prostatic cancer cells lines selected on the basis of their tumor staging. We have analyzed HBP lines (positive controls), G1 cells lines (associated with a negative prognosis), G2 cells lines (associated with good prognosis) and LNCaP (negative controls). At the end of this study we observed that the most relevant expression of GST pi was detectable in HPB cells, but also in G2 and G1 cells is possible to note a very low presence of this enzyme.

The last part of my project comprehend the purification and the enzymatic characterization of a new GST, called GST short, sequenced by the cyanobacteria *Synechocystis sp PCC 6803* genome. Cyanobacteria represent a group of widely distributed prokaryotes performing oxygenic photosynthesis similar to plants. This, together with their generally accepted role as progenitors of plant plastids, and their ease of genetic manipulation, has made them extremely useful in studies of environmental gene regulations and the mechanism of oxygenic photosynthesis.

In according to its phylogenetic origin, GST short presents a very similar G-site sequence with the sequence previously described for GSTI and GSTIII of *Zea mays*. It is also active towards several classical substrates, but at the same moderate rates that have been observed for other glutathione transferases derived from prokaryotes. Particularly, it was possible observe a strong peroxidase activity. We have also

analyzed the GST short thermal stability respect to hGSTP1-1 (10°-55°C) and the results indicate that the cyanobacterial enzyme is less resistant at this temperatures than human enzyme probably because its different structure.

The cloning, expression and characterization of this cyanobacterial glutathione transferase is also described . The possible significance of the observed catalytic properties is discussed in the context of structural organization and glutathione transferase evolution.

ABBREVIAZIONI

GST: glutatione trasferasi

GSH: glutatione

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzene

EA: Acido Etacrinico

NBD-Cl: 4-chloro-7-nitrobenzofurazano

Cu-OOH: Cumene idroperossido

CHL: Clorambucile

INTRODUZIONE

1. Le Glutazione Trasferasi

1.1 GST: definizione e proprietà generali

Le Glutazione Trasferasi sono una famiglia di enzimi ubiquitari e ampiamente distribuiti nell'organismo umano. Questi enzimi sono implicati nei processi di detossificazione cellulare catalizzando l'attacco nucleofilo del glutatione ridotto al gruppo elettrofilo di numerosi composti tossici, siano essi xenobiotici o di origine endogena. Tra i substrati esogeni per le GST ci sono pesticidi, farmaci, intermedi industriali e carcinogeni; questi substrati elettrofili comprendono epossidi, alogenuri alchilici e arilici, esteri, alcheni attivati, chinoni e composti carbonilici α,β -insaturi (Hayes & Pulford, 1995; Mannervik & Danielson, 1988). Per quanto riguarda i composti di origine endogena, essi sono rappresentati prevalentemente da prodotti dello stress ossidativo. In aggiunta alla loro attività trasferasica, alcune isoforme mostrano anche un'attività glutatione perossidasiica selenio-indipendente, che consente loro di catalizzare la riduzione degli idroperossidi lipidici nei corrispondenti alcoli (Ketter *et al.*, 1990). Altri isoenzimi esibiscono, invece, un'attività isomerasica aggiuntiva nei riguardi di vari composti insaturi come i Δ^5 -3-chetosteroidi, l'acido maleilacetico ed il maleilacetone (Mannervik, 1986). Inoltre, le GST sono anche in grado di legare composti endogeni quali i leucotrieni e le prostaglandine, intervenendo sia nel loro catabolismo, tramite la classica reazione di coniugazione con il GSH, sia nel loro processo di biosintesi (Meyer *et al.*, 1996).

In aggiunta a queste attività enzimatiche, le glutazione trasferasi possiedono anche una funzione non catalitica molto importante che consiste nella capacità di legare una vasta gamma di sostanze chimiche "non-substrato": da questo deriva il loro nome iniziale di "ligandine" (Litwack *et al.*, 1971). Questi enzimi, infatti, possono legare covalentemente ed in maniera irreversibile tutta una serie di metaboliti reattivi rappresentati da carcinogeni, agenti chemioterapici, insetticidi, erbicidi, idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e azocoloranti. Questa interazione provoca la perdita dell'attività enzimatica, ma nonostante ciò, risulta essenziale in quanto serve a proteggere le cellule da sostanze tossiche che, altrimenti, potrebbero interagire col DNA ed altre macromolecole, danneggiandole (Hayes & Pulford, 1995).

Inoltre, le glutazione trasferasi sono anche in grado di trasportare all'interno delle cellule, legandole non covalentemente, molte sostanze organiche tra cui ormoni steroidei e tiroidei, bilirubina, acidi biliari, acidi grassi, eme, antibiotici e numerosi farmaci (Listowsky, 1993), il che fa ritenere che queste proteine, oltre alla funzione enzimatica e di deposito, possiedano anche funzioni di trasportatori intracellulari.

Infine, le GST intervengono nella modulazione di vie di trasduzione del segnale, sia indirettamente, grazie al loro coinvolgimento nel metabolismo dei lipidi, alcuni dei quali agiscono come molecole-segnale

intracellulari, sia direttamente, regolando l'attività di proteine come la Jun chinasi ed altre chinasi coinvolte nella via apoptotica (Hayes *et al.*, 2005).

1.2 Classificazione ed Evoluzione

Si distinguono tre diverse famiglie di GST:

Citosoliche: proteine solubili, attive in forma dimerica, in cui ciascuna subunità ha una lunghezza compresa tra i 199 e i 244 aa. Sulla base della loro similarità di sequenza, nei mammiferi si distinguono 7 classi di GST citosoliche denominate Alpha, Mu, Theta, Pi, Omega, Zeta e Sigma.

Mitocondriali: ad essa appartiene un enzima, denominato Kappa, trovato nei mitocondri e nei perossisomi e strutturalmente distinto dalle GST citosoliche.

Microsomiali o MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism): sono componenti integrali di membrana in frazioni cellulari mitocondriali e microsomiali; questa famiglia è suddivisa in quattro sottogruppi a cui appartengono diversi enzimi. Alcuni membri di questo gruppo coniugano il GSH come le GST citosoliche, ma le GST microsomiali sono proteine legate alla membrana non correlate alle GST solubili.

La nomenclatura delle GST è basata sulla similarità di sequenza e la suddivisione in classi con le sequenze più strettamente correlate. Membri di una stessa classe possono avere più del 90% di identità di sequenza; sulla base di questo tutti i geni che codificano per le GST di una data classe si trovano sullo stesso cromosoma (Tabella 1).

Tabella . 1. Glutazione trasferasi solubili umane, classi, e localizzazione cromosomica dei loro geni. Tratta e modificata da Mannervik B. *et al.* 2005.

<i>Enzima</i>	<i>Classe</i>	<i>Gene</i>	<i>Localizzazione cromosomica</i>
GSTA1-1	Alpha	GSTA1	6p12
GSTA2-2	Alpha	GSTA2	6p12
GSTA3-3	Alpha	GSTA3	6p12
GSTA4-4	Alpha	GSTA4	6p12
GSTA5-5	Alpha	GSTA5	6p12
GSTM1-1	Mu	GSTM1	1p13
GSTM2-2	Mu	GSTM2	1p13
GSTM3-3	Mu	GSTM3	1p13
GSTM4-4	Mu	GSTM4	1p13
GSTM5-5	Mu	GSTM5	1p13
GSTP1-1	Pi	GSTP1	11q13
GSTT1-1	Theta	GSTT1	22q11.2
GSTT2-2	Theta	GSTT2	22q11.2
GSTZ1-1	Zeta	GSTZ1	14q24.3
GSTO1-1	Omega	GSTO1	10q24.3
GSTO2-2	Omega	GSTO2	10q24.3
PGD2/GSTS1-1	Sigma	PGD2	4q22.3

Oltre alle GST ben caratterizzate dei mammiferi, sono state studiate anche GST provenienti da altri organismi sia eucariotici che procariotici (Sheehan *et al.*, 2001) quali :

piante
insetti
funghi
procarioti

1.3 GST nelle piante

Studi di allineamento di sequenza hanno portato, originariamente, all'identificazione di tre differenti gruppi di GST nelle piante, denominati GST di tipo I (include enzimi con attività detossificante verso gli erbicidi), II (GST Zeta) e III (comprendente una GST inducibile dall'auxina) (Marrs, 1996; Droog *et al.*, 1993).

Studi successivi (Edwards *et al.*, 2000) hanno portato ad una suddivisione di questi enzimi in due classi: Phi (tipo I) e Tau (tipo III). Gli enzimi di tipo II sono inclusi nella classe Zeta e quelli di tipo IV nella classe Theta.

Studi cristallografici condotti sulle GST di svariate piante hanno evidenziato un'omologia con le GST animali, fatta eccezione per un residuo nella regione N-terminale dell'enzima che risulta essere una Y nelle GST animali e una S in quelle di piante e nelle GST di classe Zeta e Theta di altri organismi (Board *et al.*, 1997).

Oltre alle GST della pianta *Arabidopsis thaliana* (Reinemer *et al.*, 1996), anche le GST di tipo I e di tipo III di *Zea mays* sono state abbondantemente studiate. Nella GST I (Fig. 1) ad esempio, in cui è possibile riconoscere due monomeri di 214 residui ciascuno e divisibili in un dominio N-terminale e uno C-terminale, è stato identificato un residuo di F nella posizione 35 del sito attivo (che nelle altre piante è solitamente occupata da un residuo di leucina) il cui ruolo potrebbe essere quello di formare un core idrofobico in grado di ospitare substrati aromatici come il CDNB con una maggiore affinità.

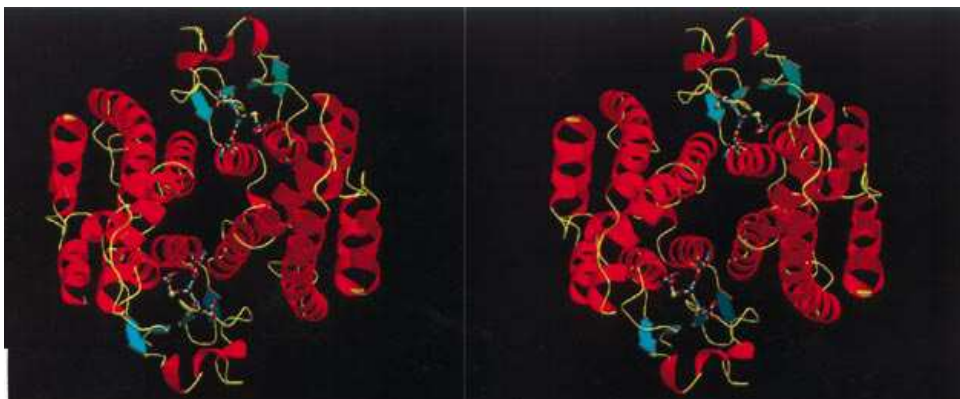


Fig 1. Rappresentazione del dimero della GST-I di *Zea mays*.(da Neufeind *et al.*, 1997)

Nella GST III è stato, invece, possibile distinguere all'interno di ciascun monomero, un piccolo dominio N-terminale (residui 1-77) con una struttura del tipo $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, ed un grande dominio C-terminale (residui 92-220) tutto ad α eliche. I due domini risultano essere connessi tra loro da una regione di 14 aa; inoltre, è stata individuata una regione compresa tra i residui 33 e 44 con una elevata flessibilità la cui funzione potrebbe essere quella di modulare l'affinità dell'enzima per il substrato.

1.4 GST nei procarioti

Alcuni studi, hanno portato ad identificare l'origine del metabolismo del glutatione nei batteri (data la sua elevata presenza in cianobatteri, fototrofi Gram negativi ed alcuni Gram positivi). A partire da questa evidenza, sono stati condotti una serie di studi di allineamento multiplo (Vuilleumier, 1996) che hanno evidenziato un elevato grado di conservazione tra i residui presenti nelle GST di classe Alpha, Mu e Pi e quelli presenti negli enzimi batterici. Ulteriori analisi di tipo catalitico condotte utilizzando il CDNB come cosubstrato, hanno invece permesso di dedurre la scarsa attività trasferasica nelle GST batteriche alle quali è stato comunque possibile attribuire altre funzioni grazie alla cristallizzazione delle GST di *Proteus mirabilis* e di *E.coli* (Fig.2).

La GSTB1-1 è l'isoforma meglio caratterizzata tra le tre isolate da *P.mirabilis*. Essa è dotata di una buona attività nei confronti di substrati tipici come il Cu-OOH, l'EA e l'EPNP e presenta, inoltre, un residuo di Cys all'interno del sito G in posizione 10 (che va a sostituire i comuni residui di Tyr o di Ser) portando alla formazione di un ponte disolfuro tra il suo gruppo tiolico e il GSH; tale disolfuro presenta un'elevata reattività scambiando molto rapidamente il GSH presente nel suo sito attivo con quello presente nel pool esterno (Caccuri et al., 2002). Durante la transitoria co-esistenza di due molecole di GSH nel sito G, l'enzima rimane in una forma ossidata che non gli permette di reagire con il centro elettrofilo del secondo substrato. Il fatto che la Cys 10 sia un residuo essenziale nella GSTB1-1 così come nella tioredoxina mentre è assente nelle GST evolute, ha permesso di indicare la GSTB1-1 come enzima di transito tra la superfamiglia delle GST e quella delle ossidoreduttasi (glutaredoxina e tioredoxina). Un'ipotesi è che nel corso dell'evoluzione, la sostituzione del residuo di Cys con uno di Tyr abbia portato alla perdita dell'attività reduttasica in favore di quella di coniugazione.

Per quanto riguarda le GST di *E.coli*, esse sembrano essere codificate da un cluster di otto geni, di cui solo due sembrano dare dei prodotti definiti: il gene *gst* (che codifica per una proteina la cui funzione non è ancora ben nota) (Nishida et al., 1996) e il gene *spsA* (che codifica per una proteina probabilmente implicata nei meccanismi di downregolazione dell'attività RNA polimerasica in condizioni di carenza di nutrienti).

Studi di allineamento multiplo condotti sulle otto sequenze geniche identificate in *E.coli* hanno permesso di identificare una regione di circa 17 residui, di cui la maggior parte presenti nel dominio N-terminale,

altamente conservati e implicati nel preservare gli elementi chiave della struttura tridimensionale.

Solo alcuni dei residui conservati sono localizzati nell'interfaccia tra le due subunità, questo proprio a conferma del fatto che i 17 residui indicati sono maggiormente implicati nella conservazione della struttura terziaria piuttosto che in quella quaternaria.

Infine, due di questi residui (G66 ed E65), si trovano nel sito di legame con il GSH e interagiscono con l' α -carbossile e l' α -ammide del residuo γ -glutammico, ad indicare che gli omologhi possono legare il GSH o altri ligandi simili.

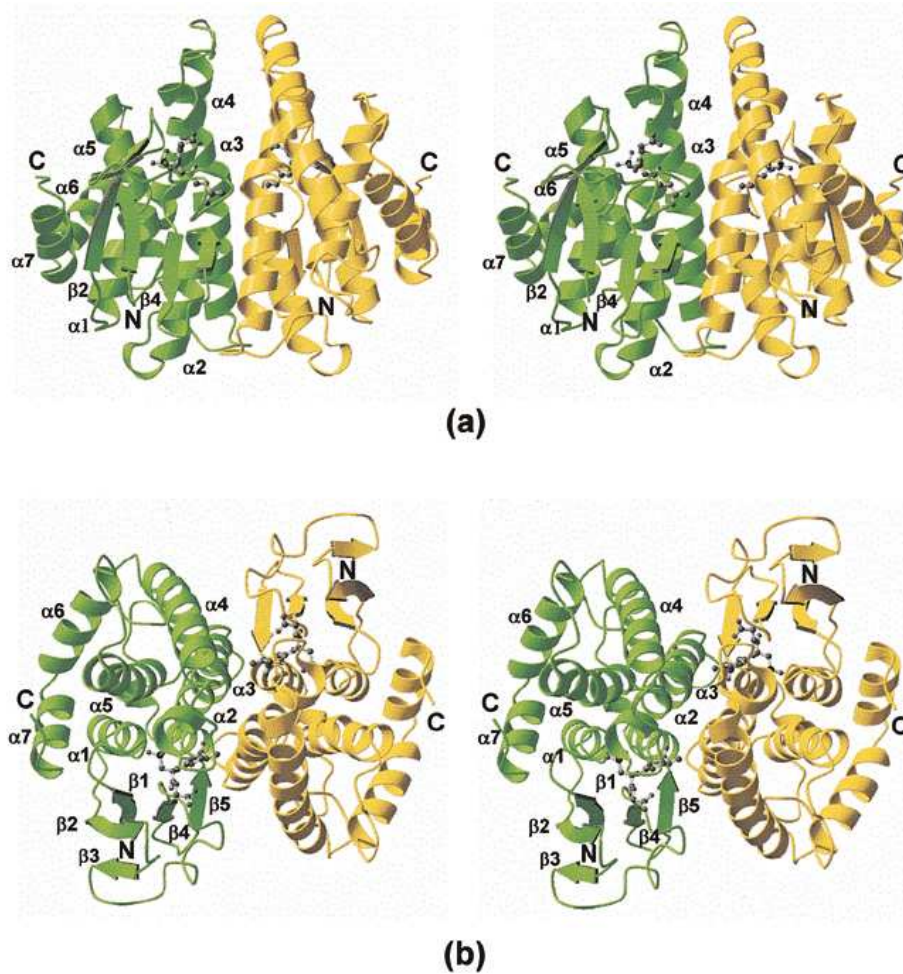


Fig. 2. Rappresentazione della GST di *E.coli*, in complesso con il glutatione sulfonato. (da Nishida *et al.*, 1998)

1.5 Le GST citosoliche

Proteine attive in forma omo- ed etero-dimerica, con un peso molecolare per monomero compreso tra i 20 kD e i 30 kD.

Nei mammiferi sono state identificate sette classi di GST citosoliche sulla base non solo della loro struttura primaria, ma anche della specificità di substrato e delle caratteristiche immunologiche (Abdalla *et al.*, 2002). Alle sette famiglie individuate nei mammiferi, Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Theta (θ), Omega (ω) e Zeta (ζ), (Mannervik *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1991; Meyer & Thomas 1995; Board *et al.*, 1997, 2000), se ne aggiungono altre, denominate Beta (β), Delta (δ), Epsilon (ϵ), Lambda (λ), Phi (ϕ) e Tau (τ), identificate in batteri, insetti e piante (Sheehan *et al.*, 2001; Edwards & Dixon, 2004).

Sebbene i membri di famiglie diverse presentino una omologia di sequenza inferiore al 30%, tra quelli della stessa famiglia il valore sale tra il 40% e l'80% (Hayes & Pulford, 1995; Armstrong, 1997); in particolare la regione N-terminale è quella che sembra essere maggiormente conservata, probabilmente in quanto parte del sito attivo di questi enzimi. In questa regione è infatti presente un aminoacido importantissimo per l'attività catalitica di questi enzimi, (rappresentato da un residuo di tirosina per la classi Alpha, Mu, Pi e Sigma; da un residuo di serina per le classi Theta e Zeta e da un residuo di cisteina per le classi Omega e Beta), in quanto capace di stabilizzare la forma anionica del glutatione (GS^-) mediante la formazione di un legame idrogeno con il gruppo tiolico (SH) del glutatione stesso (Sheehan *et al.*, 2001).

Nell'uomo sono state identificate almeno 16 subunità diverse, ma strutturalmente correlate, di GST citosoliche, dal cui mescolamento derivano numerosi isoenzimi differenti (Hayes *et al.*, 2005). La formazione di omo- ed etero-dimeri rappresenta un modo per ottenere un gran numero di isoenzimi a partire da un numero limitato di geni (Sheehan *et al.*, 2001); inoltre, la presenza di tanti isoenzimi permette di catalizzare la stessa reazione con numerosi substrati diversi (Vargo *et al.*, 2004).

1.6 Funzione catalitica delle GST

Le glutatione trasferasi giocano un ruolo fondamentale nell'ambito di un meccanismo di difesa cellulare integrato in risposta allo stress chimico e ossidativo (Hayes and McLellan, 1999; Hayes and Pulford, 1995). Precisamente, tali enzimi agiscono nella cosiddetta fase II dopo l'intervento del sistema del citocromo P-450, il principale responsabile delle reazioni della fase I, tra le quali la più importante sembra essere quella di ossigenazione (Guengerich F. P., 1990). In questo modo la fase I produce un metabolita più solubile in acqua e meno tossico che può essere escreto direttamente, ma che spesso viene utilizzato come substrato per le reazioni della fase II. Queste ultime prevedono la coniugazione del metabolita attivato ad un composto endogeno polare come il glutatione (GSH), l'acido glucuronico o la glicina. Nella maggioranza delle specie la reazione che avviene più frequentemente nella fase II è rappresentata dalla coniugazione con il GSH, catalizzata

dalle GST (Sheehan *et al.*, 2001). Non sempre, però, i composti substrato delle GST richiedono l'attivazione da parte del citocromo P-450; infatti, alcuni sono attivati dalla cicloossigenasi (Marnett, 1994), altri dall'interazione con i radicali liberi (Trush and Kensler, 1991), altri ancora possono derivare direttamente dall'ambiente esterno, ad esempio in seguito ai processi di combustione (Klaassen, 1996). In ogni caso, le GST realizzano la loro funzione di protezione catalizzando l'attacco nucleofilo del GSH ridotto, sotto forma di anione tiolato (GS⁻), al centro elettrofilo di un'ampia varietà di composti non polari, endogeni e xenobiotici (Armstrong, 1991):



Il proseguimento della reazione richiede l'ingresso del secondo substrato nel sito attivo; questo evento porta alla formazione del complesso ternario enzima, glutatione e composto elettrofilo (complesso σ). La reazione può avvenire come sostituzione nucleofila, ad esempio per composti aromatici come il CDNB, o come addizione di Michael per composti carbonilici α,β -insaturi come il 4-idrossinonenale (4-HNE, prodotto della perossidazione lipidica delle membrane) e l'acido etacrinico (Sheehan *et al.*, 2001).

Il risultato di questa coniugazione è una sostanza più solubile in acqua e quindi più facilmente eliminabile.

L'eliminazione dei glutatione-coniugati dalla cellula rappresenta la fase III del processo di detossificazione ed avviene ad opera di una serie trasportatori trans-membrana, tra cui le proteine MRP (multidrug resistance-associated protein) che sono tutte membri della famiglia C dei trasportatori ABC (Kavallaris, 1997), la glicoproteina P170 (Gottesman and Pastan, 1993) e ATPasi come la pompa GS-X (Figura 3).

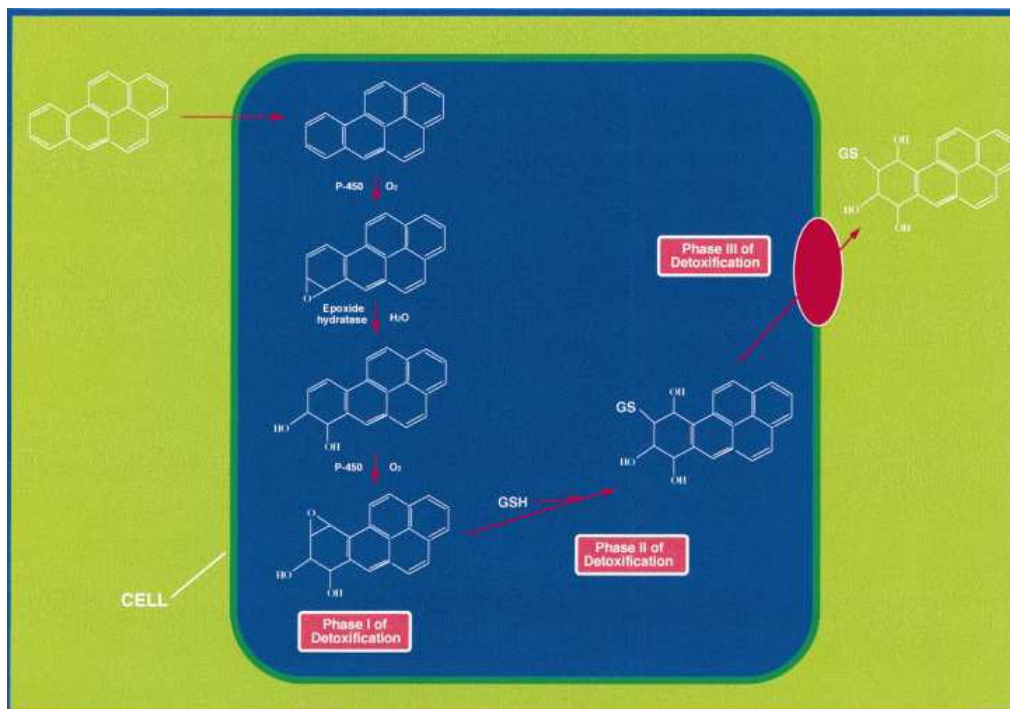


Figura 3. Detossificazione enzimatica di un composto xenobiotico. Il Benzopirene penetra nella cellula, diffondendo attraverso la membrana plasmatica, ed entra in contatto con gli enzimi di fase I (citocromo P450 e epossido idratasi) che lo trasformano in un substrato carcinogenico e mutagenico. A questo punto gli enzimi di fase II (GST) catalizzano la coniugazione del composto con il GSH rendendo il coniugato eliminabile grazie all'azione di una pompa ATP-asi come la GS-X. (tratto da Sheehan *et al.*, 2001).

Nei mammiferi, una volta fuori dalla cellula, i GSH-coniugati vengono trasportati ai reni, metabolizzati ad acidi mercapturici ed infine escreti con le urine. Essi possono essere anche convertiti a mercaptani e glucuronilati o metilati prima dell'escrezione (Pickett & Lu, 1989).

In alcuni casi, però, la coniugazione con il GSH rende questi composti più tossici, per incompleta detossificazione (tiolisi), per coniugazione reversibile o per formazione di metaboliti più attivi. Questa capacità delle GST di produrre metaboliti reattivi viene sfruttata nelle terapie anticancro per localizzare i tumori che overesprimono una particolare transferasi (Lyttle *et al.*, 1994).

Oltre che come transferasi, alcune isoforme di GST funzionano anche come perossidasi selenio-indipendenti, utilizzando il GSH come fonte di elettroni per ridurre gli idroperossidi. Questa attività contribuisce alla detossificazione dei metaboliti dannosi che originano dalla perossidazione lipidica delle membrane in seguito a stress ossidativo.

1.7 Struttura quaternaria delle GST

Le GST sono proteine attive in forma dimerica (etero- e omo-dimeri) le cui subunità si associano a formare una proteina globulare caratterizzata da una grande cavità centrale che si apre verso il sito attivo ed il solvente. Ogni subunità è composta da due domini: un dominio N-terminale (dominio I) che adotta un ripiegamento simile alla tioredoxina, e un dominio C-terminale (dominio II) tutto ad α -eliche. In ciascuna subunità sono presenti un sito di legame per il glutatione (sito-G) e un sito di legame per i substrati idrofobici (sito-H) che può legare un'ampia varietà di composti elettrofili (Mannervik *et al.*, 1978). Il sito G, altamente conservato, è formato principalmente dai residui del dominio N-terminale, mentre il sito H, i cui residui variano considerevolmente tra i vari enzimi garantendo una diversa specificità di substrato tra le varie classi, da quelli del dominio C-terminale.

Sebbene tutte le GST solubili presentino un ripiegamento peptidico complessivamente molto simile, ogni classe esibisce delle caratteristiche uniche, soprattutto a livello del sito attivo e del dominio C-terminale (Armstrong, 1997; Wilce *et al.*, 1994; Dirr *et al.*, 1994). Per gli enzimi di classe Alpha e Theta, il dominio C-terminale forma una struttura ad α -elica ben definita che protegge il sito H e gioca un ruolo importante nella catalisi attraverso il controllo del rilascio del prodotto. Per gli enzimi di classe Mu il dominio C-terminale forma un Ω -loop che copre parzialmente il sito attivo. Un'altra caratteristica importante degli enzimi di classe Mu e di classe Pi riguarda il segmento che unisce il filamento β_2 all'elica α_2 . Negli enzimi di classe Mu questo segmento forma un loop (mu-loop) esteso, esposto al solvente, che copre parzialmente il sito attivo. Il segmento corrispondente negli enzimi di classe Pi è una corta elica considerata parte dell'elica α_2 . L'elica α_2 , formata dai residui 36-52, è altamente flessibile nelle GST di classe Pi e influenza l'attività catalitica dell'enzima (Fig 4).

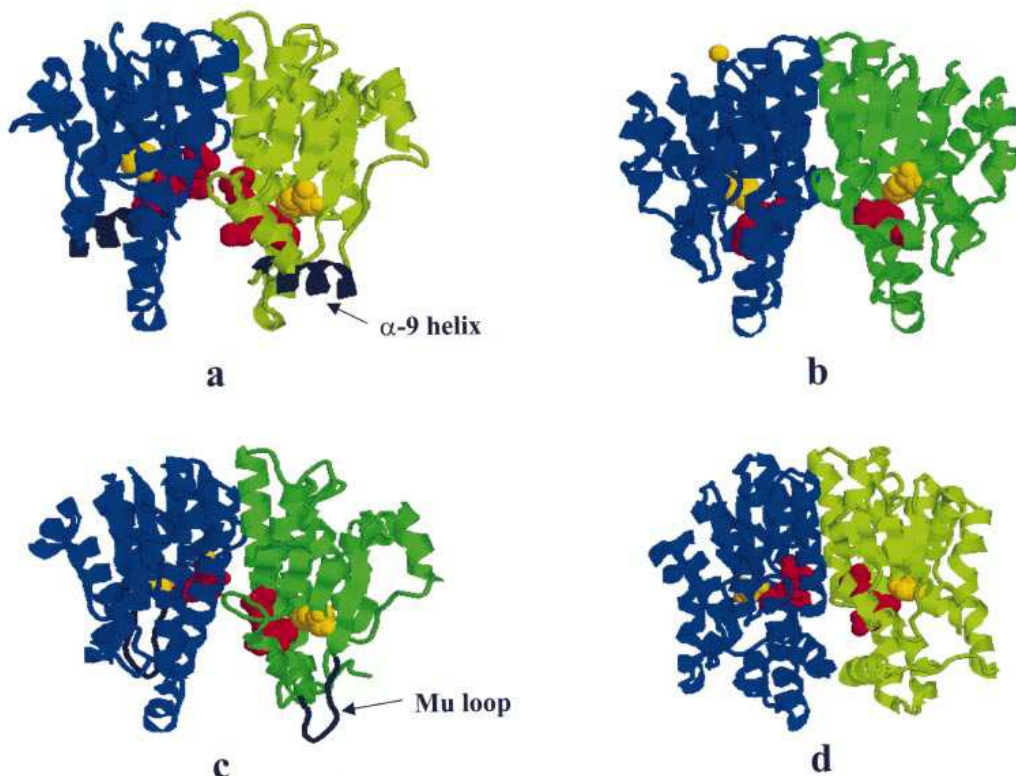


Fig. 4 . Struttura cristallografica delle GST di mammifero. In rosso è evidenziato il ligando, in giallo il residuo di Tyr o Ser mentre in nero sono indicate le cratteristiche specifiche per le diverse classi. a) hGST Alpha; b) hGST Pi; c) rGST Mu; d) hGST Theta. (tratta da Sheehan *et al.*, 2001)

1.7.1 Residui importanti del sito G

Sulla base di studi di mutagenesi sito-diretta è stato possibile definire i residui fondamentali nel legame delle GST con il GSH. Tra questi sono stati identificati Arg 13, Lys 44, Gln 51, Gln 64, Trp 38 e Asp 98 (Wiedersen *et al.*, 1992; Nishihira *et al* 1992; Kong *et al.*, 1993). È stato inoltre osservato che il residuo Asp 98 non è collocato nel sito G, ma nel monomero adiacente (Figura 5).

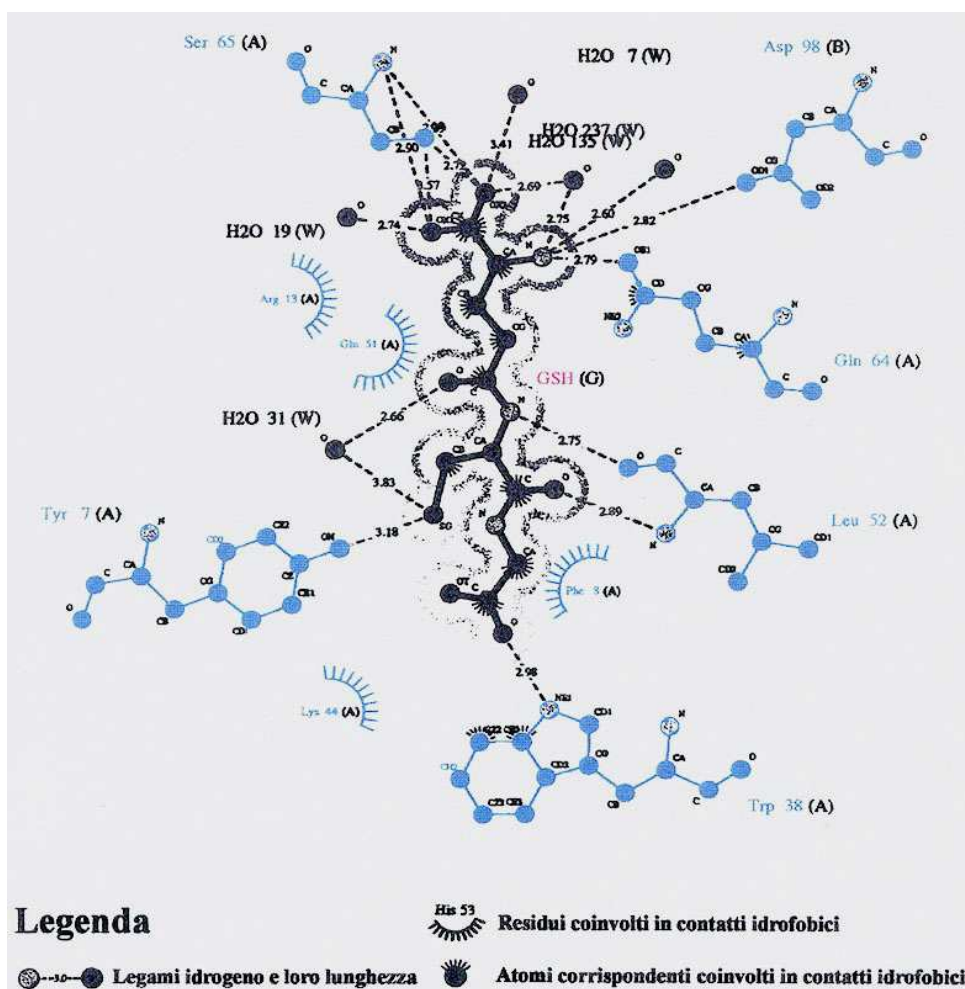


Figura 5. Interazioni tra i residui del sito G delle GST e il GSH. Tratta da Kong *et al* (1993).

1.7.2 Residui importanti del sito H

I residui coinvolti nelle interazioni con i substrati elettrofili risultano meno noti di quelli presenti nel sito G. Nonostante ciò, appare evidente l'importanza del sito H data la sua capacità di conferire a ciascuna classe di GST una propria specificità di substrato.

Tra i residui facenti parte di questo sito un ruolo di particolare rilievo è occupato dalla Tyr 108, presente nella GST P1-1 nei pressi dell'elica $\alpha 4$, che mostra avere una funzione diversa a seconda del substrato utilizzato nel corso della reazione (Lo Bello *et al.*, 1997).

Sempre nella GST P1-1 è stato identificato un altro residuo, collocato alla base del sito H, che sembra giocare un ruolo importante nella stabilizzazione del prodotto di reazione prima della sua uscita dal sito H; questo residuo è rappresentato dalla Val 10 (Micaloni *et al.*, 2000). In particolare, gli studi condotti da Micaloni e collaboratori hanno permesso di stabilire che il carattere apolare della catena laterale del residuo Val 10 le permette di stabilire interazioni di Van der Waals con alcuni substrati, tra cui EA e il CDNB, permettendone il posizionamento ottimale e l'uscita come prodotti dal sito attivo (Figura 6).

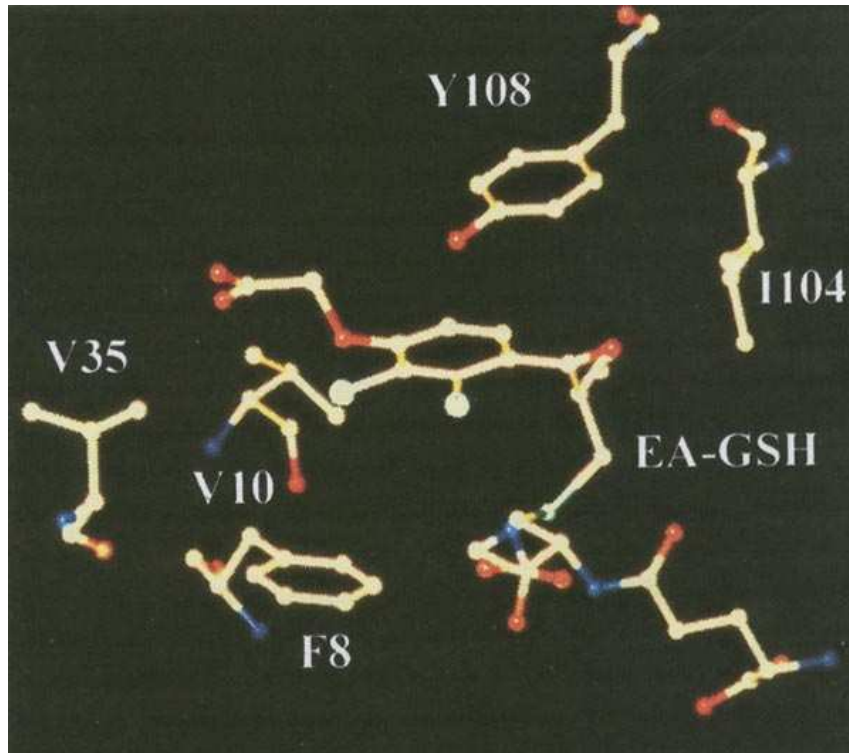


Figura 6. Immagine del sito H in cui i residui che lo compongono sono impegnati nel legame con l'Acido Etacrिनico.

1.8 Ruolo biologico delle GST_s

Le GST costituiscono parte importante di un meccanismo cellulare integrato di risposta allo stress chimico e ossidativo, che coinvolge diversi sistemi di detossificazione interdipendenti tra loro, in cui è probabile che la GST possa modulare l'induzione di altri enzimi. La capacità di fornire un'adeguata protezione alla cellula da una vasta gamma di insulti chimici, a molti dei quali siamo quotidianamente esposti, risiede nel fatto che i singoli geni delle GST_s sono regolati ciascuno in modo differente e ciascuno codifica una proteina dotata di attività catalitica specifica.

Gli xenobiotici vanno annoverati tra i principali composti tossici a cui può essere esposto un organismo e sono quelli verso i quali si sono sviluppati, nel corso dell'evoluzione, vari meccanismi di detossificazione. Gli xenobiotici vengono definiti come composti estranei all'organismo che non possiedono funzioni nutrizionali o biologiche; di solito sono lipofili e, insieme ai loro derivati, costituiscono una complessa minaccia chimica per le cellule.

Gli enzimi detossificanti utilizzano una vasta gamma di substrati, sono inducibili e spesso sono presenti ad alte concentrazioni negli organi che si trovano più a contatto con l'esterno, come i polmoni, o che sono coinvolti direttamente nel metabolismo di queste sostanze, come il fegato. Gli enzimi detossificanti hanno preferenza per composti lipofili non polari che possono essere discriminati dagli intermedi polari biosintetizzati nelle cellule.

Il sistema di detossificazione enzimatica può essere diviso in tre fasi: la fase I consiste nell'addizione di un gruppo polare funzionale allo xenobiotico e si ottiene tramite reazioni di ossidazione, riduzione, idratazione o idrolisi. Le reazioni di ossigenazione sono le più importanti e sono spesso rappresentate dall'idrossilazione. Le reazioni della fase I sono catalizzate dal sistema del Citocromo P450 che è localizzato nel reticolo endoplasmatico e comprende una superfamiglia genica. Nei mammiferi esso è costituito da tre componenti, citocromo P450, NADPH citocromo P450 reduttasi e citocromo b5. La reazione catalizzata da questo sistema coinvolge l'incorporazione di un atomo di ossigeno molecolare nel composto xenobiotico, mentre l'altro atomo viene ridotto ad acqua utilizzando NADPH. Le reazioni di riduzione sono rappresentate principalmente da nitro- ed azo-riduzioni e le idrolisi includono idrolisi di esteri, amidi ed epossidi catalizzate da esterasi, amidasi ed epossido idrolasi. La fase I produce un metabolita più reattivo, solubile in acqua e meno tossico che può essere escreto direttamente ma che spesso serve come substrato per le reazioni di fase II.

Le reazioni della fase II consistono nella coniugazione dei metaboliti prodotti dalla fase precedente ad un composto endogeno come il GSH, l'acido glucuronico, la glicina, ecc. Gli enzimi della fase II includono le glutatione trasferasi, le transacetilasi, le epossido idrolasi e le UDP-glucuronil trasferasi. La fase II ha per risultato il rendere più solubile il metabolita e l'introdurvi una parte idrofila per cui, una volta eliminato dalla cellula, esso non può più rientrare al suo interno attraverso la

membrana plasmatica. Nei mammiferi i metaboliti della fase II vengono successivamente utilizzati nella fase III della detossificazione.

La fase III comporta l'eliminazione dei metaboliti xenobiotici dalla cellula; essi vengono trasportati attivamente o pompati fuori da ATPasi transmembrana. Si ritiene che la porzione endogena del coniugato, come per es. il GSH, agisca come sito di riconoscimento per queste pompe che sono così in grado di trasportare un elevato numero di composti strutturalmente diversi, una volta che essi sono stati legati al GSH. Le proteine della fase III più conosciute sono la glicoproteina P170, che trasporta i coniugati del GSH (GS-X) e la proteina associata alla resistenza a diversi farmaci (MRP).

Una volta fuori dalla cellula i metaboliti vengono trasportati ai reni, trasformati ulteriormente e poi escreti con le urine. Un singolo composto xenobiotico può tuttavia essere convertito enzimaticamente in diversi derivati, ognuno dei quali può acquisire proprietà tossiche per la cellula. Agenti alchilanti, arilanti e acilanti, così come i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno, possono essere formati dalle reazioni di bioattivazione enzimatica, aumentando così il danno chimico provocato da particolari xenobiotici.

Alti livelli di espressione di GST sono associati ad una aumentata tolleranza della cellula a sostanze chimiche tossiche, mentre la mancata o ridotta espressione dell'enzima è associata ad una aumentata suscettibilità a diverse forme tumorali. Se da un lato un aumento dell'espressione dell'enzima risulta vantaggioso per la cellula, dall'altro l'overespressione di GST nei tumori può essere svantaggiosa, in quanto associata con la resistenza a svariati agenti antineoplastici.

Il ruolo fisiologico delle GST_S non sembra comunque essere univoco. Oltre al coinvolgimento nel processo di detossificazione dagli xenobiotici, questa categoria di enzimi è risultata legata a molti meccanismi di "controllo" cellulare; si è visto infatti che la GST di classe Pi, insieme alla β -tubulina e all'istone H2b, interagisce in modo specifico con la transglutaminasi tissutale (tTG) (Piredda *et al.*, 1999), che è coinvolta nella modificazione post-trascrizionale di molte proteine mediante la realizzazione di un legame crociato tra un gruppo carbossiamminico dell'enzima e un gruppo amminico primario di molte proteine substrato. L'interazione della tTG con la GST P1-1 può portare alla modificazione post-trascrizionale dell'enzima in questione, com'è suggerito dalla presenza di multimeri della P1-1 in cellule overesprimenti la tTG.

Un ruolo importante nella regolazione del meccanismo apoptotico è stato attribuito alle glutatione trasferasi di classe Theta. La proteina Bax rappresenta un'induttore apoptotico dei mammiferi, letale quando espresso nel lievito o nelle piante, in quanto diminuisce i livelli di GSH intracellulare e diminuisce il potenziale delle membrane mitocondriali, oltre a numerosi altri danni. Il più potente inibitore dell'attività di Bax è la BI-GST/GPX, un membro della classe Theta delle GST. Questo isoenzima possiede una debole attività perossidasiica tale da convertire H₂O₂ in H₂O mediante l'ossidazione del glutatione ridotto che lo stesso enzima provvede a mantenere ad alte concentrazioni nella cellula.

Da questo quadro emerge che le GST_S sono enzimi multifunzionali deputati a vari aspetti della difesa cellulare.

1.9 GST P1-1

Tra le GST la GST P1-1 è quella che maggiormente ha attratto l'attenzione degli studiosi in quanto la sua espressione sembra essere correlata a trasformazioni maligne, resistenza ai farmaci antitumorali e minor sopravvivenza di pazienti colpiti da diverse patologie. Il gene per la GST P1-1 è stato mappato su una piccola regione del cromosoma 11q13 in cui sono localizzati alcuni proto-oncogeni e geni associati al cancro, tra cui *bcl1/prad1*, *int2*, *hstf1* e *sea*. Alcuni di questi geni sembrano essere co-amplificati insieme al gene della GST P1-1 nel corso di alcuni tumori (Lammie *et al.*, 1991; Saint-Ruf *et al.*, 1991). Inoltre, il genotipo GST P1 è stato associato a differenze nelle risposte ai chemioterapici e diversa suscettibilità al cancro; esso risulta poi over-espresso in un'ampia varietà di tumori, compresi quelli delle ovaie, del seno, del pancreas, del colon e i linfomi (Tew, 1994).

Tale enzima, che appartiene alla famiglia delle GST citosoliche e che, come le altre glutatione trasferasi, è attivo in forma dimerica, è stato estratto per la prima volta dalla placenta (da cui il nome GST P), ma è ampiamente espresso in numerosi organi quali reni, milza, epidermide ed eritrociti. La sua struttura si è dimostrata ben conservata in diversi organismi (quali uomo e topo) e le principali differenze sono state individuate nel sito attivo, a livello del sito H e, in particolare, a carico del residuo in posizione 104.

1.10 GSTP1-1 e Tumore della prostata

La GST P1-1 è, tra i membri della famiglia delle GST, la più espressa nelle linee cellulari tumorali (Doroshov *et al.*, 1995). In modo particolare, tali linee cellulari contengono livelli aumentati di GSTP1-1 rispetto al tessuto sano (Eaton *et al.*, 1999; Tsuchida *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1989), e la sua espressione è, generalmente, inversamente proporzionale alla prognosi e alla risposta ad agenti chemioterapici (Nishimura *et al.*, 1998).

Il tumore della prostata è tra le principali cause di morte maschile in Europa e in USA. (Foster *et al.*, 1999). In questi paesi, l'incidenza di cancro alla prostata è del 30% negli uomini di età superiore ai 50 anni e arriva fino all'80% negli uomini al disopra degli 80 anni di età. In totale nel 2000 sono stati riscontrati 18.500 nuovi casi negli Stati Uniti. (Landis *et al.*, 1999).

Una delle caratteristiche del tumore della prostata è il suo variabile livello di aggressività. Per questo motivo ha suscitato un grande interesse lo studio di nuovi marcatori prognostici in grado di distinguere tra le forme iperplastiche benigne, quelle metastatiche e quelle ormone-resistenti (che risultano essere fatali). La neoplasia prostatica intra epiteliale (PIN), o displasia intraduttale della prostata, è considerata una lesione pre-maligna che in accordo con Bostwick and Brawer (1987), può progredire a carcinoma invasivo. Tale lesione colpisce dotti e acini ed è definita come proliferazione delle cellule luminali e può portare rapidamente ad adenocarcinoma invasivo. Al contrario di quanto accade nella maggior parte dei tumori umani, nel tumore della prostata la GSTP1-1 sembra essere assente (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1998), mentre risulta presente nelle

cellule epiteliali basali del tessuto sano le quali vengono perse durante lo sviluppo del tumore invasivo (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997).L'assenza di espressione della GSTP1-1 nel tessuto tumorale risulta associata ad una ipermetilazione del promotore della proteina stessa, processo che non si verifica nel tessuto sano o nell'iperplasia benigna (Lee *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999). In modo particolare, alcuni studi suggeriscono che la GSTP1-1 giochi un ruolo molto importante nella progressione tumorale essendo persa nelle prime fasi di questo processo (Li M *et al.*, 2003)

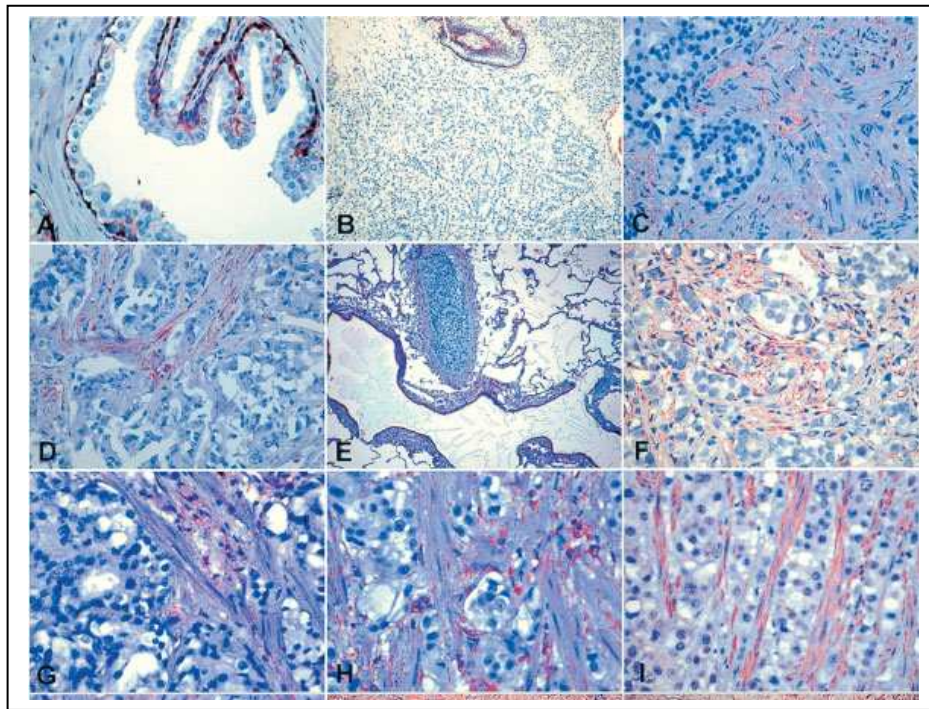


Fig. 7. Analisi immunoistochimiche (IHC) e di immunofluorescenza in campioni in paraffina per la GSTP e marcatori stromali.

A: GST pi IHC di prostata sana (controllo positivo); (B) controllo negativo con ghiandole normali al centro come controllo positivo; (C) e (D)GST pi IHC di tumore prostatico ormone indipendente che mostra colorazione delle cellule stromali; (E) tumore prostatico intravascolare con metastasi polmonari (al centro) negative per la GSTP all'IHC e circondate da zone positive per la GSTP in polmoni sani; (F) e (G) campioni di "Channel TURP" da paziente con tumore prostatico ormone indipendente positivo per la GSTP nelle cellule stromali ma non in quelle tumorali; (H) colorazione della vimentina in una sezione adiacente a quella mostrata in (G). Tale colorazione suggerisce che la GSTP è espressa in fibroblasti reattivi e/o miofibroblasti; (I) colorazione dell' alpha actina di una regione adiacente a quella mostrata in (G). (Tratta e modificata da Li *et al.*, 2003).

1.11 Polimorfismi nelle GST citosoliche

A partire dagli anni '80 sono stati identificati numerosi polimorfismi a carico delle GST (Hayes *et al.* 2000). Tali polimorfismi contribuiscono a definire le differenze interindividuali in risposta a numerosi composti xenobiotici, compresi farmaci e chemioterapici.

I primi studi in tale campo miravano a valutare se vi fosse un maggiore rischio di sviluppare alcuni tipi di tumore, quali quelli del seno, della prostata, del polmone o il tumore colon-rettale, in individui privi dei geni per la GSTM1-1 e/o per la GSTT1-1 (definiti, rispettivamente, omozigoti per gli alleli GSTM1*0 e/o GSTT1*0). Successivamente, la scoperta delle varianti alleliche della GST P1-1 ha portato alla necessità di vagliare l'ipotesi che una maggiore suscettibilità ad alcune patologie potesse dipendere da una combinazione dei polimorfismi di classe Mu, Pi e Theta delle GST.

Ad oggi sono noti polimorfismi per la maggior parte delle GST citosoliche (Tabella 2).

Tabella 2. Polimorfismi delle GST citosoliche umane. Tratta e modificata da Hayes *et al.* (2000).

CLASSE	GENE	ALLELE ^a	Alterazione nel gene o nel nucleotide ^b	Proteine aminoacidi influenzati ^c	o
<i>Alpha</i>	GSTA2	GSTA2*A	C335, A629	Thr ¹¹² , Glu ²¹⁰	
		GSTA2*B	G335, C629	Ser ¹¹² , Ala ²¹⁰	
<i>Mu</i>	GSTM1	GSTM1*A	G519	Lys ¹⁷³	
		GSTM1*B	C519	Asn ¹⁷³	
		GSTM1*0	Delezione gene	No proteina	
	GSTM3	GSTM1*1x2	Duplicaz. Gene	Overespressione	
		GSTM3*A	Wt	Proteina wt	
<i>Pi</i>	GSTP1	GSTM3*B	Delez.3bpintrone6	Strutt.prim.inalter.	
		GSTM4*A	Wt	Wt	
		GSTM4*B	Cambiam. introni	Invariata	
		GSTP1*A	A313,C341,C555	Ile ¹⁰⁵ ,Ala ¹¹⁴ ,Ser ¹⁸⁵	
		GSTP1*B	G313,C341,T555	Val ¹⁰⁵ ,Ala ¹¹⁴ ,Ser ¹⁸⁵	
		GSTP1*C	G313,T341,T555	Val ¹⁰⁵ ,Val ¹¹⁴ ,Ser ¹⁸⁵	
		GSTP1*D	A313, T341	Ile ¹⁰⁵ ,Val ¹¹⁴	
<i>Theta</i>	GSTT1	GSTT1*A	Gene unico	Prot. Unica	
		GSTT1*0	Delez. genica	No proteina	
<i>Zeta</i>	GSTZ1	GSTZ1*A	A94,A124,C245	Lys ³² ,Arg ⁴² ,Thr ⁸²	
		GSTZ1*B	A94,G124,C245	Lys ³² ,Gly ⁴² ,Thr ⁸²	
		GSTZ1*C	G94,G124,C245	Glu ³² ,Gly ⁴² ,Thr ⁸²	
		GSTZ1*D	G94,G124,T245	Glu ³² ,Gly ⁴² ,Met ⁸²	

^a L'allele designato come "GSTM1*1x2" rappresenta individui che possiedono una copia addizionale dei geni GSTM1*A e/o GSTM1*B.

^b La numerazione dei nucleotidi nelle varianti alleliche si basa sulla loro posizione sul cDNA a partire dalla "A" del codone di inizio. ^c La numerazione degli aminoacidi comprende la Metionina iniziale.

All'interno della famiglia Alpha, sono state riportate marcate variazioni interindividuali nell'espressione dei geni GSTA1 e GSTA2 (comprese occasionali assenze di proteina) (Board PG 1981; Hayes JD *et al.* 1989); inoltre sono state riscontrate mutazioni puntiformi nella subunità GSTA2 a livello degli aminoacidi in posizione 112 e 210 (Rhoads DM *et al.* 1987; Röhdranz E. *et al.* 1992).

Nel caso delle GSTM1, sono stati individuati sia casi di duplicazione che di deplezione genica (Widersten M. *et al.* 1991; Xu S. *et al.* 1998); queste variazioni sembrano essere responsabili di una differenza di attività nei confronti dei perossidi.

Per la GSTP1 sono state identificate quattro varianti alleliche che differiscono a livello degli aminoacidi 104 e 113 (Ali Osman F. *et al.* 1997; Harries L.W. *et al.* 1997; Watson MA *et al.* 1998). Gli enzimi contenenti la Val in posizione 104 presentano una efficienza nei confronti dei dioli epossidi degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) circa 7 volte maggiore degli enzimi con Ile nella stessa posizione; al contrario, tali enzimi hanno un'affinità inferiore nei confronti del CDNB (Hayes *et al.* 2000). L'influenza del residuo 104 sulle proprietà catalitiche dell'enzima dipende dalla sua collocazione nei pressi del sito attivo (sito H). Al contrario, il residuo 113 non è situato in questa sede: è quindi ipotizzabile che una mutazione in tale posizione tenda ad amplificare gli effetti della mutazione in posizione 104.

Il gene GSTT1 della classe Theta è depresso nel 10%-20% degli individui (Pemble S. *et al.* 1994; Rebbeck T. M., 1997; Strange R. C., Fryer A., 1999); negli individui Theta nulli, la perdita del gene comporta una ridotta capacità dell'enzima a coniugare il GSH con alcuni substrati quali il Dibromoetano (DBE), il Diclorometano (DCM), l'etilene ossido (EO) e il metil bromuro (MB) (Sherhatt P. J. *et al.* 1997; Guengerich F. P. *et al.* 1995).

Varianti alleliche sono state identificate anche per le GST di classe Zeta: esse differiscono nella capacità di metabolizzare dicloroacetato e fluoroacetato (Blackburn A. C. *et al.* 1999).

1.11.1 Conseguenze biologiche dei polimorfismi delle GST

La presenza di polimorfismi negli enzimi glutatione-S-trasferasi comporta importanti alterazioni nel metabolismo di molti substrati, compresi carcinogeni e agenti chemioterapici (Ali Osman *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998); di conseguenza, sembra che questi polimorfismi giochino un ruolo rilevante nella suscettibilità al cancro e nella risposta ai chemioterapici (Perera, 1996; Anderer *et al.*, 2000).

A tal proposito sono stati condotti alcuni studi per valutare l'associazione tra la presenza di polimorfismi e l'insorgenza di tumori dovuti all'assunzione di tabacco o legati alla dieta. Nel primo caso è stato osservato che individui Mu nulli presentano un maggior rischio di sviluppare tumori ai polmoni (Rebbeck, 1997; Strange, Fryer, 1999); nel secondo caso, invece, Mathias e collaboratori (1999) hanno dimostrato che individui Theta nulli sono associati ad una peggiore prognosi nel caso di tumori di estensione T3/T4 o in fase di differenziazione G3 del tratto digestivo, soprattutto a livello oro-faringeo.

Ancora, è stata osservata una correlazione tra i polimorfismi delle GST e la sopravvivenza di pazienti affetti da leucemia, cancro del seno e cancro metastatico colon-rettale (Ambrosone *et al.*, 2001; Sweenwy *et al.*, 2000).

1.11.2 Polimorfismi della GST P1-1 e loro principali conseguenze biologiche

Come detto in precedenza, per la GST P1-1 sono stati individuati dei polimorfismi caratterizzati da singole sostituzioni nucleotidiche a livello dell' esone 5 (A¹⁴⁰⁴G) e dell'esone 6 (C²²⁹⁴T), che portano, rispettivamente, alle sostituzioni aminoacidiche Ile¹⁰⁴Val e Ala¹¹³Val, (Ali-Osman *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998). Dalla sostituzione di questi singoli nucleotidi derivano 4 possibili differenti varianti alleliche (Tab. 3).

Tabella 3. Polimorfismi della GST P1-1 umana

<i>Allele</i>	<i>Nucleotidi</i>
*A	Ile ¹⁰⁴ Ala ¹¹³
*B	Val ¹⁰⁴ Ala ¹¹³
*C	Val ¹⁰⁴ Val ¹¹³
*D	Ile ¹⁰⁴ Val ¹¹³

Le variazioni alleliche provocano un cambiamento sterico al sito di legame per il substrato che porta ad una modificazione funzionale substrato dipendente (Ali-Osman *et al.*, 1997; Hu X, *et al.*, 1997; Pandya *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 1999; Hu X, *et al.*, 1997).

In un lavoro pubblicato nel 1997, Ali-Osman *et al.* hanno presentato graficamente, mediante tecniche computerizzate, gli effetti che le variazioni aminoacidiche presenti nelle diverse varianti della GST P1-1 hanno sulla struttura del peptide risultante, in particolare per quanto riguarda il sito H. In particolare, le distanze tra Tyr 108 e Val 10 e tra Tyr 108 e Val 35 diminuiscono passando dalla forma *A alla *B e alla *C. Inoltre, nella GSTP1*B e nella GSTP1*C, il gruppo metilico della Val 104, vicino alla Tyr 108, risulta più strettamente associato al sito H rispetto al secondo gruppo metilico di Ile 104 nella GSTP1*A. L'orientazione del gruppo metilico di Val 104 nella GSTP1*B e nella GSTP1*C verso la Tyr 108, causa un decremento della distanza della Val 104 sia verso la Val 10 che la Val 35, e provoca un restringimento della regione delineata dai residui Tyr 108, Val 10 e Val 35.

La sostituzione di Ile 104 con la meno ingombrante Val 104, provocherebbe un'apertura della regione delineata dai residui Tyr 7, Tyr 10 e Phe 8. Così la distanza tra le catene laterali dei residui Tyr 7 e Val 10 sarebbe minore nella GSTP1*A che nelle altre, mentre la distanza tra i residui Tyr 7 e Tyr 108 e tra Tyr 7 e Phe 8 sarebbe maggiore.

Tra le principali conseguenze biologiche a carico dei polimorfismi della GST P1-1, di particolare importanza risultano essere quelle

riguardanti la suscettibilità ai tumori e lo sviluppo di chemioresistenza. L'efficacia degli agenti chemioterapici, particolarmente di quelli che portano alla formazione di intermedi elettrofilici o di radicali liberi, dipende dalla loro capacità di interagire con le macromolecole cellulari (Yarbro *et al.*, 1996). Le lesioni indotte da questi farmaci sul DNA, soprattutto i mono-addotti del DNA e i legami intramolecolari, se non riparate, possono portare la cellula a morte bloccando la replicazione o la trascrizione del DNA stesso. Nei tumori questo evento rappresenta l'effetto terapeutico; nei tessuti sani, invece, è il principale effetto tossico e/o carcinogenico associato all'uso di chemioterapici. A tal proposito numerosi studi hanno evidenziato che il locus genico della GST P1-1 umana è polimorfico e codifica per proteine con una diversa capacità di metabolizzare substrati elettrofili, compresi, appunto, molte sostanze chemioterapiche tra cui, ad esempio, gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH), (+)-*anti*-benzo(a)pyrene, (+)-*anti*-chrysene diolo epossido (Hu X. *et al.*, 1997), e il 5-methylchrysene (Hu X. *et al.*, 1998).

È stato riportato che la GSTP1*A gioca un ruolo importante nell'acquisizione della resistenza al cis-platino mediando la formazione di coniugati platino-GSH (Goto *et al.*, 1999).

Pazienti omozigoti per l'allele GSTP1*B presentano una ridotta capacità di detossificare gli agenti chemioterapici a base di platino (Stoelmacher *et al.*, 2002). La sostituzione Ile104Val nell'allele GSTP1*B comporta una sostanziale riduzione dell'attività catalitica dell'enzima e una ridotta capacità di detossificazione negli individui che la portano (Watson *et al.*, 1998). L'isoforma GSTP1*C, la variante allelica dominante nelle cellule di glioma maligno, sembra conferire agli individui che la portano una minore incidenza del cancro del seno (Maugard *et al.*, 2001).

In un lavoro pubblicato nel 1999 (Srivastava *et al.*, 1999) è stata esaminata la capacità delle varianti alleliche della GST P1-1 umana di catalizzare la coniugazione del GSH con il Thiotepa, un agente alchilante utilizzato in chemioterapia. Gli agenti alchilanti sono tra i chemioterapici maggiormente utilizzati; essi interagiscono con il DNA direttamente o attraverso intermedi che si formano per attivazione metabolica o degradazione chimica spontanea. Questi farmaci si legano covalentemente con i residui nucleofili del DNA stabilendo con esso dei legami crociati intra- o inter-molecolari. Gli atomi di ossigeno e azoto presenti nelle basi del DNA e nei legami fosfodiesterici tra le basi sono i principali bersagli dell'alchilazione.

L'aumentata coniugazione del glutatone da parte delle Glutathione-S-trasferasi sembra essere un meccanismo importante per lo sviluppo della resistenza delle cellule tumorali agli agenti alchilanti. In particolare, lo studio condotto da Srivastava e collaboratori rivela una significativa differenza delle varianti alleliche della GST P1-1 nel metabolizzare il thiotepa, suggerendo che i polimorfismi della GST P1-1 umana possono essere considerati un elemento importante nello sviluppo della resistenza agli agenti alchilanti da parte delle cellule tumorali. Infatti, l'efficienza catalitica dell'enzima wild type della GST P1-1 (I104/A113) risulta essere circa 1.9 volte più alta del mutante GSTP104Val, e circa 2.6 volte maggiore del doppio mutante (I104V/A113V).

Da alcuni anni a questa parte si è diffuso l'uso di programmi terapeutici che prevedono l'associazione dei chemioterapici con la

radioterapia e che garantiscono una maggiore possibilità di sopravvivenza ai pazienti su cui vengono attuati. Tuttavia, nel lungo termine, questi pazienti hanno un aumentato rischio di sviluppare tumori secondari alla terapia stessa; tra questi la leucemia mieloide acuta (AML) è il più comune (Kaldor *et al.*, 1990; Travis *et al.*, 1996; Travis *et al.*, 1999; Travis *et al.*, 2000;). Il rischio di sviluppare una leucemia mieloide acuta associata alla terapia (t-AML) a dieci anni dal trattamento è stato stimato essere dell'1.5% per il tumore del seno, del 7.9% per i linfomi non Hodgkins, dell'8.5% per il tumore alle ovaie e del 3.8% per i linfomi di Hodgkins (Diamandidou *et al.*, 1996; Greene *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1985; Brusamolino *et al.*, 1998). Diversi studi hanno portato a sospettare che alcuni chemioterapici, tra cui la cyclofosfamida, il melfalan, l'adriamicina e il clorambucile, promuovano lo sviluppo della leucemia nell'uomo. Inoltre, è stato osservato che le cellule staminali CD34⁺ del midollo osseo, che rappresentano la popolazione cellulare target delle trasformazioni leucemiche, possono essere protette dagli effetti citotossici di queste sostanze mediante traduzione del gene GST π , (Kuga *et al.*, 1997; Niitsu *et al.*, 1998; Matsunaga *et al.*, 2000). Queste osservazioni hanno portato alcuni studiosi a chiedersi se le GST possano proteggere le cellule staminali del midollo osseo dall'insorgenza della t-AML; a tal proposito Allan e collaboratori (Allan *et al.*, 2001), hanno ipotizzato che le variazioni polimorfiche delle GST possano alterare la suscettibilità a questa patologia. Per questo hanno analizzato soggetti che avevano sviluppato una leucemia mieloide acuta a seguito di trattamenti chemioterapici per valutare, all'interno di questa popolazione, la distribuzione dei polimorfismi di GSTM1, GSTT1 e GSTP1. Al termine di questo studio Allan ed il suo gruppo hanno osservato che i soggetti presentanti la mutazione 104Val sono due volte più suscettibili allo sviluppo della t-AML rispetto ai soggetti con Ile in posizione 104. Questo potrebbe dipendere dalla ridotta attività dell'enzima mutato nei confronti degli agenti chemioterapici in questione e, di conseguenza, dal maggiore effetto citotossico esercitato da questi sulle cellule.

1.11.3 Polimorfismo genetico della GST M1-1

Il polimorfismo della GSTM1-1 è stato individuato inizialmente come attività specifica verso il substrato trans-stilbene ossido nei leucociti e sembra avere un'origine genetica (Sorsa *et al.*, 1996). L'enzima GSTM1-1 detossifica attivamente composti carcinogeni come il benzo(a)pirene, gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH), l'aflatossina B1 (Shi M *et al.*, 1999) ed altri metaboliti presenti nel fegato, dove la GSTM1-1 è espressa (Sorsa *et al.*, 1996). La classe Mu include cinque geni: GSTM1, M2, M3, M4, M5. Il gene codificante per l'enzima GSTM1-1 umano è stato localizzato sul cromosoma 1. Nella popolazione umana ci sono tre diversi alleli per il gene GSTM1: uno è nullo (GSTM1*0) a causa della delezione del gene e non mostra attività verso il trans-stilbene ossido (Seidegard *et al.*, 1988) e altri epossidi (Hayes *et al.*, 1995). Le altre due varianti alleliche, GSTM1a-1a e GSTM1b-1b, differiscono in una singola coppia di basi in posizione 534 (GSTM1a-1a → G534, GSTM1b-1b → C534) e codificano proteine aventi una variazione aminoacidica in posizione 173 (GSTM1a-1a →

Lys¹⁷³, GSTM1b-1b → Asn¹⁷³); queste due forme della GST di classe Mu hanno stessa attività catalitica verso il trans-stilbene ossido (Widersten *et al.*, 1991).

La mancanza dell'enzima GSTM1-1 è considerata un fattore di rischio per l'insorgenza del cancro ai polmoni (Hirvonen *et al.*, 1993), alla pelle (Heagerty *et al.*, 1994), alla vescica (Bell *et al.*, 1993) e al colon (Zhong *et al.*, 1993) a causa della ridotta efficienza nel legame dei substrati genotossici (Mc Williams *et al.*, 1995).

Poiché la GSTM1-1 catalizza il metabolismo di un gran numero di composti potenzialmente genotossici, molti studi sugli effetti di questo polimorfismo genetico hanno riguardato la formazione di addotti di DNA e l'insorgenza di danni citogenetici. Alti livelli di addotti PAH-DNA sono stati trovati in campioni di polmone di donatori (fumatori) aventi genotipo GSTM1-1 *null*, rispetto ad individui con genotipo GSTM1-1 positivo (Butkiewicz *et al.*, 2000). Recentemente è stato scoperto che il numero di addotti di DNA presenti nella placenta umana di individui con genotipo GSTM1-1 *null* è elevato se paragonato a quello di individui con genotipo GSTM1-1 positivo (Sorsa *et al.*, 1996).

Individui con genotipo GSTM1-1 *null* presentano, inoltre, elevati livelli di addotti di proteine, del tipo 3- e 4-amminobifenil emoglobina oppure aflatossina B1-albumina (Sorsa *et al.*, 1996); la presenza di un numero così elevato di addotti è indice di una ridotta detossificazione degli intermedi reattivi.

Il polimorfismo genetico dell'enzima GSTM1-1 influenza il processo di detossificazione degli epossidi che si formano nel metabolismo dell'1,3-butadiene. La frequenza di "Sister chromatid Exchanges" (SCE), dopo trattamento *in vivo* di linfociti di individui con genotipo GSTM1-1 *null* con l'1,2-epossi-3 butene, è superiore rispetto a quella trovata per i linfociti di individui con genotipo GSTM1-1 positivo; è stato inoltre osservato un aumento di SCE nei linfociti di fumatori aventi genotipo GSTM1-1 *null* (Sorsa *et al.*, 1996).

Diversi studi hanno mostrato che in individui GSTM1-1 *null*, elevati livelli di metaboliti bioattivati sono presenti nei polmoni, dove la mancanza della proteina influenza la capacità di detossificare i carcinogeni (Sorsa *et al.*, 1996).

1.11.4 Polimorfismo genetico della GST T1-1

I geni che codificano per gli enzimi umani GSTT1-1 e GSTT2-2 sono localizzati sul cromosoma 22, in posizione 22q11.2 (Webb *et al.*, 1996). I geni GSTT1 e GSTT2 sono stati clonati e sequenziati nel ratto, nell'uomo e nel topo; nell'uomo sono separati da 50 kb e mostrano una struttura simile, essendo composti da 5 esoni.

Il gene GSTT1 umano è lungo 8.1 kb e codifica per una subunità di 25.300 Da, mentre il gene umano GSTT2 è di 3.7 kb e codifica per una sequenza di 244 aminoacidi (Coggan *et al.*, 1998). Diversi studi hanno rivelato l'esistenza di un polimorfismo genetico per il gene GSTT1, che risulta deleto nel 10-20% della popolazione Europea fino ad arrivare al 65% nella popolazione Orientale (Nelson *et al.*, 1995).

La delezione dell'intero gene o di parte di esso risulta nella perdita di attività enzimatica. Il genotipo con la delezione omozigote del gene

GSTT1 è detto “GSTT1-*null*“, mentre il genotipo che presenta almeno una copia del gene è indicato come “GSTT1-positivo” (Kempkes *et al.*, 1996).

Negli individui con genotipo GSTT1-1 *null* (allele GSTT1*0) la perdita del gene GSTT1 comporta una ridotta abilità di coniugare il GSH con dibromoetano (DBE), diclorometano (DCM), l’etilene oxide (EO) e il metil bromide (MB) (Guengerich *et al.*, 1995; Sherratt *et al.*, 1997).

In base alla capacità di coniugare il GSH al DBE, la popolazione viene generalmente suddivisa in fenotipi “coniugatori” (individui GSTT1*A/*A) e “non-coniugatori” (individui GSTT1*0/*0) (Hallier *et al.*, 1993). Tra i primi distinguiamo soggetti eterozigoti, che mostrano un’abilità intermedia di GSH-coniugazione (bassi-coniugatori), ed omozigoti con un’elevata velocità di coniugazione (alti-coniugatori). Al contrario, i fenotipi “non coniugatori” non presentano attività verso il 1,2-epossi-3-(*p*-nitrofenossi)propano (EPNP), il substrato standard per le GST di classe Theta, e pertanto non sono in grado di coniugare il GSH al DBE (Thier *et al.*, 1998).

Recentemente è stato scoperto un nuovo polimorfismo associato con il fenotipo “non-coniugatori”. Una singola sostituzione nucleotidica, 310A>C, altera il residuo 104 localizzato al centro dell’ α elica 4, trasformandolo da treonina in prolina; l’introduzione del residuo di prolina genera una distorsione nella conformazione della proteina. Questa nuova variante allelica è stata denominata GSTT1*B. Da uno studio condotto su una popolazione di 497 Svedesi è emerso che la frequenza dell’allele attivo GSTT1*A è pari a 0.65, mentre la frequenza degli alleli non funzionali GSTT1*0 e GSTT1*B è di 0.34 e 0.01, rispettivamente (Warholm *et al.*, 2002).

La GSTT1-1 è coinvolta nel metabolismo di importanti prodotti chimici industriali, chiamati alcani alogenati e epossidi alifatici, comunemente usati nelle vernici e nella sintesi di materie plastiche e di farmaci. In particolare, il DCM e il DBE sono carcinogeni nell’uomo e sono metabolizzati tramite ossidazione da parte del citocromo P450 2E1, oppure per coniugazione al GSH mediata dalla GSTT1-1; in entrambi i casi si producono degli intermedi reattivi dannosi per il DNA (Sherratt *et al.*, 1998), come la formaldeide che potrebbe reagire con le guanine.

Individui con genotipo GSTT1-1 *null* esposti all’1,3-butadiene hanno una frequenza di “Sister chromatid Exchanges” (SCE) nei linfociti più alta rispetto ad individui con genotipo GSTT1-1 positivo (Shi M. *et al.*, 1999). Nei linfociti umani è stata inoltre osservata, *in vitro*, una variabilità nella suscettibilità per lo sviluppo di SCE dopo esposizione all’1,2:3,4-diepossibutano, un metabolita epossidico dell’1,3-butadiene (Sorsa *et al.*, 1996): la frequenza di SCE in individui con genotipo GSTT1-1 *null* esposti è superiore a quella di individui con genotipo GSTT1-1 positivo. Il polimorfismo genetico GSTT1-1 non ha effetti, invece, sullo sviluppo di SCE causati da un altro metabolita epossidico dell’1,3-butadiene, il 3,4-epossi-1,2-butanediolo (Sorsa *et al.*, 1996). Considerati insieme, il polimorfismo genetico GSTM1-1 influenza l’induzione di SCE da parte dell’1,2-epossi-3-butene, mentre il polimorfismo genetico GSTT1-1 influenza l’induzione di SCE ad opera dell’1,2:3,4-diepossibutano.

Gli effetti del polimorfismo GSTT1 sono stati oggetto di studi epidemiologici volti a determinare se nell’uomo la presenza o meno del fenotipo GSTT1-1 *null* è associata alla suscettibilità al cancro, in

relazione all'esposizione verso sostanze tossiche. In generale, nella popolazione Europea gli individui fumatori con genotipo GSTT1-*null* sono considerati ad alto rischio per lo sviluppo di tumori all'apparato respiratorio; diversi studi, inoltre, hanno dimostrato che la presenza del genotipo GSTT1-GSTM1 *doppio null* aumenta di 3 volte, rispetto al genotipo GSTT1-GSTM1 doppio positivo, il rischio di tumori (Jourenkova-Mironova *et al.*, 1999).

La GSTT1-1 sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo del cancro alla cavità orale e alla laringe in Cina e in India, dove il genotipo GSTT1-*null* ha la frequenza più alta nel mondo e dove sono diverse le abitudini alimentari ed il modo di fumare. Al contrario, il gene GSTM1 è un importante fattore di rischio di cancro nei paesi industrializzati, dove il consumo di alcol e carne è alto, la frequenza del genotipo GSTT1-*null* è bassa e il fumo di sigaretta è la più comune fonte di esposizione (Nair *et al.*, 1999). Molti studi suggeriscono che individui privi dell'enzima GSTT1-1 potrebbero essere ad alto rischio di tumore in diversi organi e tessuti, come polmoni, intestino, cervello, globuli rossi, fegato e reni (Landi, 2000).

La GSTT1-1 umana è la più efficiente delle glutatione transferasi nella denitrosazione e inattivazione del reagente antitumorale 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), un farmaco citostatico usato nel trattamento di melanomi, carcinomi al polmone, linfomi e tumori al cervello (Wasserman *et al.*, 1975). Tale composto, una volta introdotto nell'organismo, viene idrolizzato e genera ioni cloroetilcarbonio che producono legami crociati a livello del DNA a doppio filamento e bloccano la mitosi, esercitando in questo modo il loro effetto antitumorale; la GSTT1-1 agisce da enzima detossificante catalizzando la denitrosazione mediante coniugazione del BCNU al GSH e prevenendo, così, la formazione di specie alchilanti (Weber *et al.*, 1993).

Il polimorfismo genetico GST1-1 sembra giocare, quindi, un ruolo fondamentale nella variabilità del metabolismo di composti alogenati a basso peso molecolare e di epossidi reattivi. E' stato dimostrato, *in vitro*, che la presenza della GSTT1-1 è sia un fattore protettivo che un fattore di rischio per i danni causati da questo tipo di composti, a seconda che la GSTT1-1 sia coinvolta in reazioni di bioattivazione o bioinattivazione.

1.12 Clorambucile

Il clorambucile è un agente alchilante a base di azoto usato nel trattamento primario della leucemia linfocitica cronica, la più comune leucemia nei paesi occidentali. (Foon *et al.*, 1990) Esso sembra svolgere la sua funzione citotossica mediante formazione di legami interstrand di DNA che possono portare la cellula a morte per apoptosi. . Nella leucemia linfocitica cronica il 60-80% dei pazienti che ricevono un trattamento con il clorambucile tendono a sviluppare, nel tempo, una resistenza al farmaco.(Foon *et al.*, 1990). E' stato proposto che il clorambucile fosse un substrato della GSTP1-1 mediante studi che comparano la formazione del complesso GSH-CBL in presenza e in assenza di GSTP1-1. Questi studi hanno mostrato un elevato incremento nella formazione del coniugato in presenza dell'enzima purificato (Ciaccio *et al.*, 1990). Un ulteriore studio ha riportato che le varianti alleliche della GSTP1-1 possono differire significativamente con

l'enzima wt nella capacità di formare il prodotto di coniugazione GSH-CBL, indicando questi polimorfismi come potenziali responsabili dello sviluppo della farmaco resistenza (Pandya *et al.*, 2000).

In alcuni studi i pazienti sono stati trattati con Acido Etacrinico, EA, (inibitore della GSTP1-1 studiato come potenziale farmaco nel trattamento di alcuni tumori) in associazione al clorambucile presentando un buon livello di remissione tumorale, ma notevoli effetti collaterali. Tra questi si ha un elevato livello di tossicità dose-dipendente legato alla diuresi che comporta squilibrio elettrolitico, iperglicemia, ipocalcemia e ipomagnesemia piuttosto severi che rendono impossibile proseguire con trials di fase I (Tew *et al.*, 1997) Per questo si stanno svolgendo ulteriori studi volti a sviluppare inibitori con elevata specificità e con effetti collaterali ridotti (Figura 8).

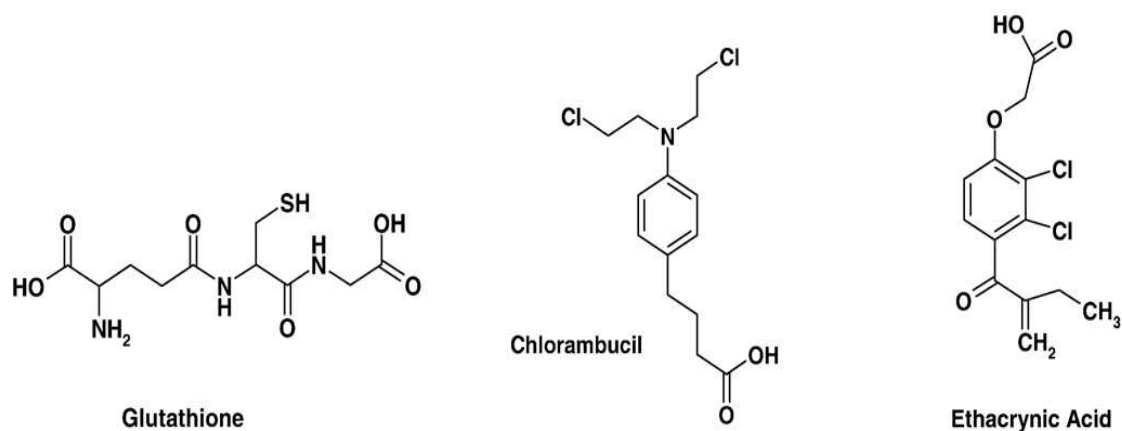


Fig.8. Struttura chimica del GSH, CBL e EA.(Da Parker *et al.*, 2008)

1.13 Benzene

Il benzene è riconosciuto ormai da molto tempo come carcinogeno, per questo motivo la sua presenza nei posti di lavoro è stata portata ad un limite massimo di 1ppm, sia negli Stati Uniti che nei paesi dell'Unione Europea (EU, 1997). L'esposizione occupazionale a questa sostanza si verifica specialmente nei settori che lavorano a stretto contatto con petrolio, benzina o altri fattori. Tra queste categorie ci sono fattorie, raffinerie o strutture industriali impegnate nella produzione di composti chimici organici .

Il benzene è un composto ubiquitariamente presente nell'ambiente, in particolare come prodotto del petrolio (Snyder *et al.*, 1993) e del fumo di sigarette (Best *et al.*, 2001). Proprio per la loro esposizione a questo composto durante le ore di lavoro, i vigili sono stati inclusi in numerosi studi di tipo epidemiologico. (Fustinoni *et al.*, 2005; Verdina *et al.*, 2001; Chanvaivit *et al.*, 2007;)

L'esposizione al benzene è stata associata con numerosi effetti dannosi per la salute, quali malattie ematologiche, ed è stato riconosciuto come agente carcinogeno di primo livello (WHO, 1993). L'esposizione

occupazionale prolungata nel tempo è associata con anemia, pancitopenia, aplasia (ASTDR, 1997), leucemia mieloide acuta (Lan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 1996; Verma and Tombe, 1999), sindrome mielodisplastice e linfoma non Hodgkin (Hayes *et al.*, 1997; Sorhan *et al.*, 2005). L'esposizione al benzene si verifica generalmente per inalazione e la misura di benzene nell'urina o nel sangue è utilizzata come marker di una recente esposizione (Weisel *et al.*, 1996; Ashley *et al.*, 1994). Gli effetti del benzene sulla salute sono mediati da intermedi genotossici e citotossici che inducono danni al DNA (Erexson *et al.*, 1985; Yager *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004).

Il metabolismo del benzene inizia nel fegato dove alcuni enzimi lo convertono in diversi metaboliti tra cui fenolo, idrochinone, acido *s*-fenilmercapturico e acido *trans,trans*muconico. Poichè gli ultimi due sono escreti nelle urine, sono comunemente utilizzati come marcatori di esposizione (Weisel *et al.*, 1996). Il metabolismo del benzene avviene in due fasi: nella prima gli enzimi di fase I, tra cui il citocromo P450 2E1 (CYP2E1), lo trasformano in intermedi metabolici quali fenolo e idrochinone (Seaton *et al.*, 1994). Tali intermedi raggiungono il midollo osseo dove la mieloperossidasi (MPO) li converte in chinoni tossici. La detossificazione di questi chinoni può avvenire via NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi-1 (NQO1) o via Glutazione trasferasi.

NQO1 è responsabile della riduzione dei benzochinoni a di-idrochinoni meno tossici (Ross *et al.*, 2000), prevenendo così i danni ossidativi (Nebert *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 1999), mentre la coniugazione con il glutatione operata dalle GST è responsabile della produzione di composti meno tossici (Snyder *et al.*, 1993; Ross, 1996), sebbene talvolta questa reazione possa portare alla formazione di composti tossici (Bratton *et al.*, 2000). Sia la Glutazione trasferasi T1 (GSTT1) che la Glutazione trasferasi M1 (GSTM1) sono implicate nella detossificazione del benzene ossido (Snyder *et al.*, 1993; Ross, 1996). L'assenza del gene di queste proteine comporta la perdita dell'attività enzimatica (Alves *et al.*, 2002; Seidegard *et al.*, 1988; Sprenger *et al.*, 2000). Tali delezioni sono state precedentemente associate a diverse forme di leucemia, compresa la leucemia mieloide acuta (Bolufer *et al.*, 2006).

1.14 Cianobatteri

I cianobatteri o alghe blu-verdi, considerati progenitori dei cloroplasti vegetali. (Bryant *et al.*, 1986). sono tra le forme di vita più antiche della terra. Sono un gruppo di organismi ubiquitari in natura e capaci di sopravvivere a variazioni di temperatura, luce e concentrazione chimica. (Rippka *et al.*, 1979). Questi organismi formano uno dei principali phyla di eubatteri e uno dei maggiori gruppi di batteri Gram-negativi. Come gli altri batteri Gram-negativi, hanno un envelope costituito da una membrana plasmatica esterna e uno strato di peptidoglicani. Inoltre, presentano un sistema di membrane interno, detto sistema tilacoidale, che permette il passaggio di energia ed è la sede sia della fotosintesi che della respirazione.

I cianobatteri attuano la fotosintesi ossigenica combinando i meccanismi tipici della fotosintesi delle piante con quelli della

respirazione basata sul sistema del citocromo c ossidasi (Peschek *et al.*, 2004).

Poiché i cianobatteri sono stati i primi organismi a produrre ossigeno molecolare (O₂), essi hanno necessariamente evoluto un sistema per difendersi dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) come i radicali superossidi (O₂⁻), i radicali ossidrilici (OH[·]) e il perossido di idrogeno (H₂O₂). Per una efficiente rimozione dei ROS questi microrganismi, così come gli altri hanno sviluppato una serie di strategie tra cui la produzione di enzimi detossificanti.

1.14.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Il cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803 è diventato un sistema modello per numerosi studi molecolari e biochimici, compresi studi sulla fotosintesi (Gombos *et al.*, 1992), risposta allo stress (Hagemann *et al.*, 1990) analisi riguardanti l'heat shock (Suzuki *et al.*, 2001).

L'intero genoma è stato sequenziato e sono stati identificati 3168 geni. (Nakamura *et al.*, 1998).

Il sequenziamento dell'intero genoma ha permesso di assegnare sulla base delle omologie di sequenza putativi ruoli funzionali alle diverse proteina codificate, tuttavia molte di queste proteine devono ancora essere caratterizzate da un punto di vista biochimico e fisiologico.

In particolare sono state individuate tre putative glutatione trasferasi (sll0067, sll1147 e sll1545), le cui sequenze sono sotto riportate, di cui non è ben chiaro l'attività con il GSH.

sll0067

MIKLYGAPQRSASIIQWYLEELSLPYEFVNVNLKEGEHRQAPYLAINPFGKVP AIAD
GNFHLWESGAILLYLAEKASTIPADAQARALVNQWILFANSTLANGLFIEAVREKEM
PRLQSQLEKILGRSPFILGEKFSVVDVAVGSILAYVPIMLKLNFDDYPAVAAYVQGL
VQRPAFAQSIGAR

sll1147

MTKTELLWPALITALATMLYLVLVINVGRARAKYGVMPATTGNEDFERVLRVQYNT
LEQLAFFLPGLWLFAYIRDPTIAAILGAVWLLGRILYAWGYYQAAEKRMVGFALGSL
SSMILVVGALLSILWQLRQLSQF

sll1545

MLELHQFELSQYSEKVRILIDFKGLDYRTVEVVPGVQGLDLLRLSGQTKVPVLKDG
IVIADSTEIALYLDRKYPENSLPHDPVQRGQCLLMEEWADESIGLKGRVAMVGALN
QNPGLRASILPKQTPGIFKNLVS AVPPAMLDLLGSGVGGFFGGDAVKEAMRGLHQDLEA
LTLILQHQPYLIGDRPTLADLTVAALSMVIKIPGGNYLNIAQELKGGKIPGLADNSA
YSAFFWRDRLYREYRRSHQQDNNQNGSGSSNNSPTTITIE

PROGETTO DI RICERCA

Il mio percorso di dottorato è stato articolato in diversi progetti tutti volti a definire il ruolo di alcune GST citosoliche umane (GSTP1-1, GSTM1-1 e GSTT1-1) e dei loro polimorfismi, rispetto all'insorgenza di fenomeni di farmaco resistenza in seguito a trattamento con alcuni farmaci chemioterapici (quali il clorambucile), alla maggiore suscettibilità all'azione di sostanze definite cancerogene (come il benzene) e al ruolo svolto nella progressione di linee tumorali prostatiche. Di rilevante importanza è stata, inoltre, la caratterizzazione di una nuova GST (GST short) la cui sequenza è stata identificata nel genoma del cianobatterio *Synechocystis* PCC 6803.

In letteratura sono presenti numerosi lavori, soprattutto di carattere epidemiologico, che mettono in luce una possibile associazione tra i polimorfismi della GSTP1-1 (Ile104Val, Ala113Val e Ile104Val/Ala113Val) e il manifestarsi di alcuni fenomeni di carattere clinico-patologico. Tra questi, di particolare importanza risultano essere quelli riguardanti la suscettibilità ai tumori e lo sviluppo di fenomeni di chemioresistenza (Yarbro *et al.*, 1996) in risposta sia a trattamenti con sostanze a base di platino, (Stoelmacher *et al.*, 2002), sia a trattamenti con agenti alchilanti (Srivastava *et al.*, 1999). Inoltre, dai dati presenti in letteratura, emerge una tendenza da parte dei soggetti polimorfici nel locus del gene GST π a sviluppare tumori secondari in seguito al trattamento con chemioterapici; tra questi il più comune sembra essere la leucemia mieloide acuta, (Kaldor *et al.*, 1990; Travis *et al.*, 1996; Travis *et al.*, 1999; Travis *et al.*, 2000; Woldon *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2001). Nonostante siano state postulate numerose ipotesi riguardo ai motivi che potrebbero essere alla base di questi fenomeni, non è stata ancora evidenziata una precisa causa molecolare che li giustifichi.

A tal proposito, la prima parte del mio progetto di dottorato si propone di analizzare da un punto di vista cinetico la funzionalità delle varianti alleliche della GST P1-1 e di valutarne l'attività in risposta al trattamento con alcune sostanze chemioterapiche. Per raggiungere questo obiettivo, i mutanti I104V, A113V e I104V/A113V sono stati clonati, espressi in cellule di *E.coli* TOP10 e purificati mediante cromatografia per affinità al glutatione. Le proteine ottenute dalla purificazione sono state utilizzate sia per la caratterizzazione biochimica in presenza di diversi cosubstrati (CDNB, EA, NBD-Cl), sia per effettuare prove di termostabilità a diverse temperature (10°C-55°C), sia per valutare l'effetto inibitore di un diffuso agente chemioterapico, il clorambucile.

Inoltre, nel corso di questo lavoro è stato possibile determinare, mediante cristallografia a raggi X, l'interazione del clorambucile con il sito attivo di queste varianti alleliche in modo da valutare l'eventuale variazione di legame tra l'enzima wt e i suoi mutanti.

Un secondo punto preso in considerazione nel corso del mio progetto di dottorato è stato quello relativo allo studio dei polimorfismi, non solo della GSTP1-1, ma anche delle GSTT1-1 e della GSTM1-1, specialmente nelle loro forme polimorfiche più diffuse (date dalla delezione dei geni GSTM1 e GSTT1). In modo particolare la nostra attenzione si è focalizzata sul ruolo che tali polimorfismi potrebbero

avere in soggetti occupazionalmente esposti al benzene. L'esposizione al benzene è stata associata a numerosi effetti dannosi per la salute, quali malattie ematologiche, e il benzene è stato riconosciuto come agente carcinogeno di primo livello (WHO, 1993). L'esposizione occupazionale prolungata nel tempo è, inoltre, associata con anemia, pancitopenia, aplasia, leucemia mieloide acuta (Lan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 1996; Verma and Tombe, 1999), sindrome mielodisplastice e linfoma non Hodgkin (Hayes *et al.*, 1997; Sorhan *et al.*, 2005). Gli effetti del benzene sulla salute sono mediati da intermedi genotossici e citotossici che inducono danni al DNA (Erexson *et al.*, 1985; Yager *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004).

In modo particolare la scelta di studiare l'effetto dei polimorfismi dei geni GSTM1 e GSTT1 nasce dall'evidenza che entrambi questi enzimi sono implicati nella detossificazione del benzene ossido (Snyder *et al.*, 1993; Ross, 1996). L'assenza del gene di queste proteine comporta, inoltre, la perdita dell'attività enzimatica (Alves *et al.*, 2002; Seidegard *et al.*, 1988; Sprenger *et al.*, 2000). Tali delezioni sono state precedentemente associate a diverse forme di leucemia, compresa la leucemia mieloide acuta (Bolufer *et al.*, 2006).

A tale proposito sono stati condotti studi di genotipizzazione per i geni GSTT1, GSTM1 e GSTP1 (anche se l'analisi di quest'ultimo non è stata ancora terminata) su DNA estratto da campioni di sangue intero prelevati, e opportunamente trattati, da soggetti occupazionalmente esposti al benzene e da soggetti usati come controllo. Queste analisi sono state accompagnate da studi di carattere fenotipico volti a saggiare l'attività specifica degli enzimi GSTP1-1 e GSTT1-1, condotti su campioni eritrocitari appartenenti agli stessi soggetti di cui sopra, utilizzando i substrati specifici per questi enzimi (rispettivamente, CDNB e EPNP). Anche in questo caso le analisi sono ancora in fase di svolgimento.

La terza parte del mio dottorato è stata basata sullo studio della GSTP1-1 in linee cellulari tumorali immortalizzate di prostata a diverso grado patologico.

In particolare l'interesse rivolto verso questo tipo di tumore nasce dal fatto che esso rappresenta una tra le principali cause di morte maschile in Europa e in USA. (Foster *et al.*, 1999). In questi paesi, infatti, la sua incidenza è del 30% negli uomini di età superiore ai 50 anni e arriva fino all'80% negli uomini al disopra degli 80 anni di età. In totale nel 2000 sono stati riscontrati 18.500 nuovi casi negli Stati Uniti. (Landis *et al.*, 1999).

Inoltre, al contrario di quanto accade nella maggior parte dei tumori umani, nel tumore della prostata la GSTP1-1 sembra essere assente (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1998), mentre risulta presente nelle cellule epiteliali basali del tessuto sano le quali vengono perse durante lo sviluppo del tumore invasivo (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997). Tale assenza di espressione nel tessuto tumorale risulta associata, come detto prima, ad una ipermetilazione del promotore della proteina stessa, processo che non si verifica nel tessuto sano o nell'iperplasia benigna (Lee *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999). In questo contesto i nostri studi sono consistiti nella coltura di linee cellulari immortalizzate della prostata e nella valutazione dell'alterazione di espressione della GSTP1-

1 sia mediante tecnica del Western Blotting, sia mediante saggio dell'attività enzimatica.

In fine, una parte importante del mio dottorato è stata impiegata nella caratterizzazione biochimica di una delle tre GST sequenziate a partire dal genoma del cianobatterio *Synechocystis PCC 6803*. Questo cianobatterio è diventato un sistema modello per numerosi studi molecolari e biochimici, compresi studi sulla fotosintesi (Gombos *et al.*, 1992), risposta allo stress (Hagemann *et al.*, 1990) analisi riguardanti l'heat shock (Suzuki *et al.*, 2001). Il suo genoma è stato interamente sequenziato e sono stati identificati 3168 geni (Nakamura *et al.*, 1998) tra cui tre putative GST. Tra queste la nostra attenzione si è focalizzata sullo studio della GST short, la cui sequenza è riportata di seguito:

sll0067

MIKLYGAPQRSASIIQWYLEELSLPYEFVNVNLKEGEHRQAPYLAINPFGKVP AIAD
GNFHLWESGAILLYLAEKASTIPADAQARALVNQWILFANSTLANGLFIEAVREKEM
PRLLOSLEKILGRSPFILGEKFSVVDVAVGSILAYVPIMLKLNFDDYPAVAAYVQGL
VQRPAFQASIGAR

Gli esperimenti di caratterizzazione biochimica sono stati basati sull'individuazione della corretta modalità di purificazione di questo enzima; sull'analisi delle sue proprietà cinetiche in base sia allo studio dell'attività enzimatica, in presenza di diversi cosubstrati, tipicamente usati nella caratterizzazione delle principali GST citosoliche umane, (CDNB, EA, EPNP, NBD-Cl e Cu-OOH), che allo studio della dipendenza dell'attività enzimatica alla concentrazione di GSH utilizzata. Sono stati condotti, inoltre, studi sulla stabilità termica dell'enzima a diverse temperature (10°C-55°C). In fine, queste analisi di tipo biochimico sono state accompagnate da studi di modeling e analisi della sequenza primaria di tale proteina mirati a definirne la struttura tridimensionale e le origini filogenetiche. In conclusione, si è cercato di capire se tale proteina fosse indotta in seguito a stress dato dall'esposizione delle cellule di *Synechocystis* alla luce UV: per questo motivo, tali cellule sono state fatte crescere in condizioni di stress per diversi tempi di incubazione e, successivamente, analizzate mediante Western Blotting diretto contro la GST short.

2. RISULTATI

2.1 STUDI SULLE VARIANTI ALLELICHE DELLA GSTP1-1

2.1.1 Attività specifica e proprietà cinetiche delle varianti alleliche della GSTP1-1 in presenza di specifici cosubstrati.

Tutti i mutanti sono stati espressi in *Escherichia coli* e purificati mediante cromatografia per affinità al GSH come l'enzima wt.

Saggiando l'attività specifica dei mutanti della GSTP1-1 (I104V, A113V I104V/A113V) in presenza di tre differenti co-substrati (CDNB, EA, NBD-CI) non sono state trovate differenze rilevanti, fatta eccezione per il mutante I104V (*B) che ha mostrato una significativa riduzione dell'attività nei confronti del CDNB, rispetto all'enzima wt (Tabella 6).

Tabella 6. Attività specifica della GSTP1-1 wt e delle sue varianti alleliche (I104V, A113V e I104V/A113V) in presenza dei differenti cosubstrati

<i>Enzimi</i>	<i>Substrati</i>		
	<i>Attività Specifica</i> ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)		
	CDNB	EA	NBD-CI
GST P1-1	110±10	1.7±0.01	3.7±0.1
I104V	60±8	1.8±0.03	2.5±0.08
A113V	110±10	1.4±0.01	4±0.12
I104V/A113V	70±6	2.5±0.04	3±0.09

Studi condotti precedentemente all'interno del nostro laboratorio, utilizzando gli stessi cosubstrati menzionati precedentemente, avevano indicato l'importanza della mutazione della Tyr in posizione 108, un residuo localizzato nel sito H della GSTP1-1 umana. Poiché il residuo Ile104, presente in una delle varianti alleliche analizzate, è localizzato anch'esso all'interno del sito H vicino al residuo di Tyr 108 (-3 Å), abbiamo deciso di utilizzare per i nostri studi gli stessi cosubstrati.

I risultati delle analisi condotte, sono indicati nella tabella 7.

Tabella 7. Analisi cinetiche allo stato stazionario degli enzimi GSTP1-1, I104V, A113V, I104V/A113V in presenza di specifici cosubstrati.

<i>Substrate</i>	<i>Enzyme</i>	K_m^{GSH} (mM)	K_m^{cosub} (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m^{cosub} (s ⁻¹ mM ⁻¹)
CDNB	GST P1-1	0.15±0.03	1.2±0.1	79±3	66±3
	I104V	0.11±0.03	2.9±0.4	52±2	18±2
	A113V	0.13±0.002	1.4±0.09	79±2	56±2
	I104V/A113V	0.08±0.01	2.3±0.09	48±3	21±3
EA	GST P1-1	0.17±0.05	0.21±0.02	3.2±0.2	15±2
	I104V	0.17±0.02	0.08±0.003	1.8±0.3	22.5±3
	A113V	0.21±0.04	0.09±0.009	1.3±0.5	14±2
	I104V/A113V	0.20±0.01	0.06±0.01	2.3±0.6	38±2
NBD-Cl	GST P1-1	0.008±0.002	0.004±0.001	1.0±0.2	250±12
	I104V	0.007±0.001	0.007±0.003	0.26±0.8	37±5
	A113V	0.014±0.008	0.011±0.009	1.3±0.09	118±7
	I104V/A113V	0.003±0.0004	0.002±0.0002	0.52±0.5	260±10

Tra i mutanti analizzati, l'effetto principale, usando il CDNB come cosubstrato, è stato osservato a carico del mutante I104V. Infatti è possibile notare un significativo incremento nel valore di K_m^{CDNB} (2.9mM) e un decremento di circa 3 volte del valore di efficienza catalitica ($18±2$ s⁻¹ mM⁻¹ invece di $66±3$ s⁻¹ mM⁻¹); per quanto riguarda il valore di k_{cat} si può osservare solo una lieve riduzione mentre la K_m^{GSH} non risulta essere influenzata dalla presenza della mutazione.

Utilizzando l'EA come co-substrato abbiamo osservato effetti simili sui mutanti I104V e A113V i quali hanno mostrato un forte decremento dei valori di k_{cat} e della K_m^{EA} rispetto all'enzima wt, mentre l'efficienza catalitica non risulta influenzata.

In fine, in presenza di NBD-Cl come co-substrato il principale effetto è stato il decremento di circa 4 volte del valore di k_{cat} mentre sia la K_m^{GSH} che la K_m^{NBD-Cl} sembrano essere influenzate solo marginalmente.

Sebbene siano stati ripostati studi cinetici in presenza di Clorambugile come cosubstrato da altri autori (Horton *et al.*, 1999), non ci è stato possibile condurre le medesime analisi data la necessità di particolari strumentazioni e la difficoltà nell'eseguire tale metodica. Infatti si tratta di un end-point assay che misura la quantità di coniugato GSH-CBL formatasi in seguito a 30 minuti di incubazione del CBL in presenza di GSH 3H marcato. Questo prodotto può quindi essere isolato utilizzando una cromatografia e quantificato mediante conta del prodotto radioattivo.

2.1.2 Stabilità termica delle varianti alleliche della GSTP1-1

La stabilità termica della GSTP1-1 wt e delle sue varianti all'eliche (I104V, A113V e I104V/A113V) è stata saggiata incubando i vari enzimi a differenti temperature (10-55°C) per 15 minuti. Come mostrato in figura 1 c'è una lieve riduzione dell'attività di ciascun enzima intorno ai 45°C. Il tempo di incubazione dei vari enzimi a questa temperatura è stato inoltre prolungato per intervalli di 1 h fino a raggiungere le 24h di incubazione, senza variazione nei valori di attività. (i dati non sono presenti). Tuttavia, a temperature superiori è possibile osservare delle variazioni nel comportamento del mutante I104V. Infatti, in seguito a 15 minuti di incubazione dell'enzima a 50°C si nota un'attività residua del 55.8% rispetto al 65.3% presentato dall'enzima wt. Queste variazioni non sono osservate nel mutante A113V che presenta un comportamento molto simile a quello dell'enzima wt, mentre il doppio mutante presenta un valore di attività, in seguito ad incubazione a 50°C, intermedio rispetto a quello presentato dai singoli mutanti (Fig. 12).

Il differente comportamento del mutante I104V rispetto all'A113V può essere spiegato dalla collocazione del residuo 104 sull'elica 4, una regione flessibile implicata nella catalisi enzimatica. Al contrario, il residuo 113 è localizzato lontano dal sito attivo e, quindi, la sua mutazione non influenza la stabilità termica dell'enzima.

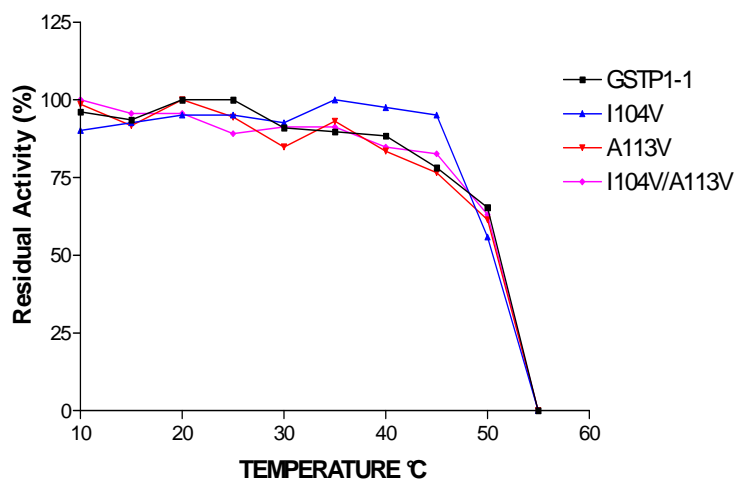


Fig 12. Stabilità termica degli enzimi GSTP1-1, I104V, A113V e I104V/A113V.

2.1.3 Studi di inibizione delle varianti alleliche della GSTP1-1

E' stato dimostrato da studi precedenti che il clorambucile può essere coniugato al GSH in presenza della GSTP1-1 wt e delle sue varianti alleliche (Pandya *et al.*, 2000). Noi abbiamo cercato di capire, mediante studi di IC_{50} , condotti usando il CDNB come cosubstrato, se questo farmaco antitumorale fosse un inibitore della GSTP1-1 wt o dei suoi mutanti. Come si vede dalla figura 13 i risultati indicano che il CBL non è un inibitore né dell'enzima wt né dei suoi mutanti.

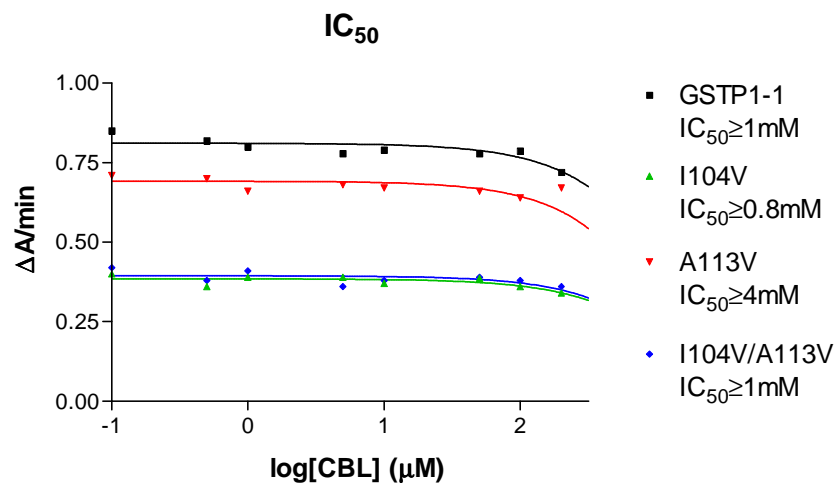


Fig.13. Studi di inibizione

2.2 Analisi del polimorfismo genetico nei geni umani GSTM1 e GSTT1

Il genotipo delle GSTT1 e della GSTM1 è stato determinato su 183 soggetti, di cui circa 157 esposti al benzene e 25 non esposti. L'analisi del polimorfismo genetico per i geni GSTM1 e GSTT1 è stata condotta simultaneamente in un singolo saggio, usando la tecnica della PCR MULTIPLEX, che prevede l'amplificazione dei geni GSTM1 e GSTT1 da DNA genomico e della β -GLOBINA come gene house-keeping, come descritto in Materiali e Metodi.

Dopo aver estratto il DNA genomico da sangue intero, utilizzando l'estrattore automatico MagNA Pure LC, è stata effettuata una verifica qualitativa per valutare l'eventuale presenza di DNasi, come mostrato in figura 14.

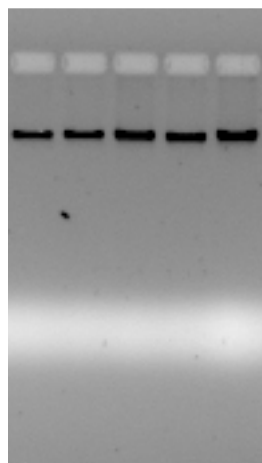


Figura 14: gel di agarosio allo 0.8% (w/v) dopo estrazione del DNA dello stesso campione

L'assenza nel gel in figura 14 delle bande di degradazione causate dalle DNasi indica la buona riuscita del processo di estrazione del DNA.

Successivamente è stata verificata l'esattezza dell'amplificazione su gel d'agarosio al 2.5% (w/v); in figura 15 sono mostrati i frammenti amplificati che comprendono una regione di 215 bp del gene GSTM1, una di 480 bp del gene GSTT1 e un'altra di 268 bp del gene della β -globina.

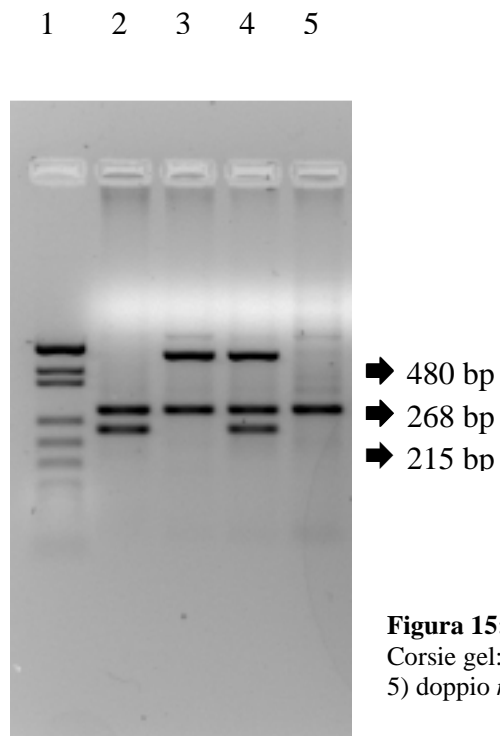


Figura 15: gel di agarosio al 2.5% (w/v) dopo PCR.
 Corsie gel: 1) markers; 2) GST T1 *null* ; 3) GST M1 *null* ; 4) wt;
 5) doppio *null*

Dall'analisi del genotipo effettuata su campioni di sangue intero di soggetti occupazionalmente esposti al benzene e di soggetti non esposti, usati come controllo, risulta che il gene GST M1 è assente nel 50% dei soggetti esaminati, mentre il gene GST T1 manca in circa 20% degli stessi campioni (tab. 8).

Tabella 8: distribuzione genotipica del polimorfismo delle GSTT1-1 e GSTM1-1 in un campione di individui esposti al benzene ed in un campione di controllo.

Genotipo	Esposti (n = 157)	Frequenza genotipica (%)	controlli (n = 25)	Frequenza genotipica (%)
Wild type	56	35.6	7	28
GST T1-1 <i>null</i>	17	10.8	1	4
GSTM1-1 <i>null</i>	71	45.2	13	52
Doppio <i>null</i>	12	7.6	4	16

2.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA GST short DI *SYNECHOCYSTIS*

2.3.1 Espressione e purificazione della GST sh

La GST short viene espressa a bassi livelli come proteina solubile in *E.coli*. Poichè l'enzima presenta una bassa affinità per il GSH, non è possibile eseguirne la purificazione utilizzando una cromatografia per affinità al GSH stesso, per questo motivo abbiamo utilizzato una colonna cromatografica con affinità per ioni metallo che sfrutta il legame con le sei istidine presenti su una coda all'N-terminale della proteina stessa. Il problema della purificazione è dato dalla formazione di corpi di inclusione che portano alla precipitazione della proteina nel pellet e, quindi, ad una sua minore presenza nel citoplasma della cellula (Fig.16).

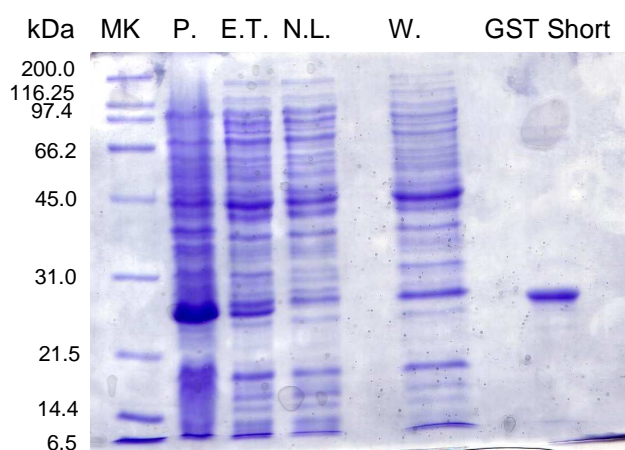


Fig. 16 Purificazione GST sh. Il gel (12.5%), mostra la presenza di bande corrispondenti alla GST sh in tutte le frazioni della purificazione: pellet (P), estratto totale (E.T.), non legato (N.L.) e lavaggio (L.) nell'ultima lane è possibile osservare la proteina purificata.

2.3.2 Attività specifica e proprietà cinetiche della GST short

I valori di attività specifica della GST sh ottenuti in presenza di differenti cosubstrati, sono mostrati nella tabella 9. L'enzima mostra una buona attività perossidasi con il cumene idroperossido, ma i valori di attività in presenza degli altri cosubstrati (CDNB, EPNP, EA e NBD-Cl) risultano essere piuttosto bassi. Per ogni substrato sono state eseguite delle attività di controllo utilizzando una delle GST citosoliche umane in modo tale da paragonare i risultati con le divergenze filogenetiche.

	hGSTP1-1	hGSTA1-1	hGSTT1-1	GST short
CDNB	100	-	-	0.15
EA	1.48	-	-	0.14
EPNP	-	-	1.5	0.11
CuOOH	-	13.5	-	2.7
NBD-Cl	-	24	-	0.11

Tab. 9. Attività specifica. La tabella mostra i valori di attività specifica ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) ottenuti usando 50 μg di GST short.

In modo particolare dalla tabella risulta che l'attività specifica della GST sh risulta estremamente più bassa di quella mostrata dalla GSTP1-1 umana in presenza di CDNB come cosubstrato e di EA come cosubstrato. In presenza di EPNP, substrato caratteristico per la GSTT1-1 umana, l'attività della GST short risulta essere circa 12 volte inferiore rispetto a quella mostrata dall'enzima umano usato come controllo. Infine si può osservare una fortissima riduzione nei valori di attività specifica della GST short, in presenza di NBD-Cl come cosubstrato, rispetto alla GSTA1-1 umana, mentre nei confronti del Cu-OOH la differenza tra questi due enzimi risulta essere di sole 5 volte.

Il valore della K_m^{GSH} (Figura 17) indica una bassa affinità dell'enzima verso questo substrato. Inoltre, è stato calcolato il valore di k_{cat} sulla base della V_{max} ottenuta usando una classica equazione di Michaelis Menten (Tab. 10).

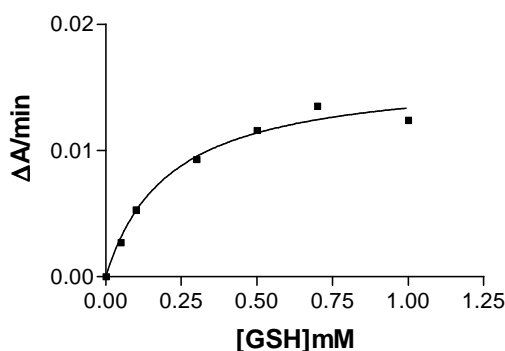


Fig.17. Dipendenza dell'attività enzimatica della GSTsh dalla concentrazione di GSH, ottenuta usando 50 μg di proteina purificata.

Enzima	V_{max} ($nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	Km^{GSH} (μmol)	k_{cat}/Km^{GSH} ($mM^{-1}\ s^{-1}$)
GST short	0.016	0.013	0.21	0.062

Tab. 10. Parametri cinetici della GST short in presenza di concentrazioni variabili di GSH. Le attività sono state eseguite utilizzando una concentrazione costante di CDNB (1mM) e variando la concentrazione di GSH (0.05-1mM) in tampone fosfato 0.1 M pH 6.5 a 340 nm.

Dalla tabella risultano particolarmente evidenti i bassi valori di k_{cat} e di efficienza catalitica.

2.3.3 Stabilità termica

Gli studi di stabilità termica mostrano un comportamento simile della GST sh rispetto alla GSTP1-1 umana, usata come controllo, alle temperature iniziali. Tuttavia, intorno ai 40°C è possibile osservare un decremento del 20% dell'attività della GST sh, che diventa ancora più evidente tra i 45°C (35%) e i 50°C (88%) fino ad un totale annullamento dell'attività stessa a 55°C. Al contrario, l'attività della GSTP1-1 umana rimane stabile fino ai 40°C, si reduce del 22% intorno ai 45°C, del 50% a 50°C fino ad arrivare a 0 a 55°C come nel caso della GST short (Fig. 18).

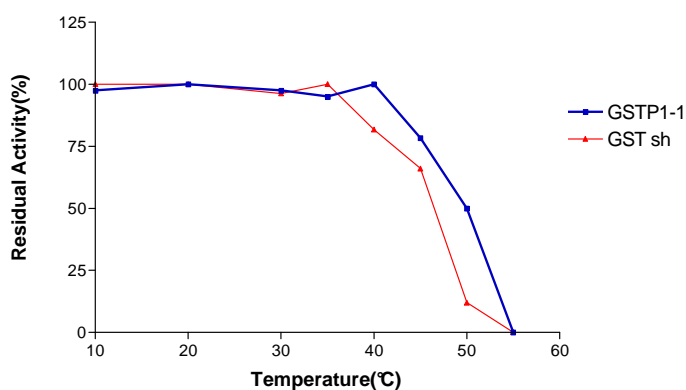


Fig.18 Stabilità termica. Le attività sono state eseguite a 340 nm e 25°C in tampone fosfato 0.1M pH 6.5 in presenza di GSH 1 mM e CDNB 1 m.

2.3.4 Estrazione delle proteine solubili da *Synechocystis* sp. PCC 6803

Cellule di *Synechocystis* sono state fatte crescere in condizioni di stress indotto dalla luce e successivamente raccolte in seguito a differenti tempi di esposizione (da t0 a 7 giorni). I campioni sono stati quindi sottoposti a SDS/PAGE e Western Blotting per identificare la presenza della proteina di interesse (GST short) nel citosol delle cellule. La figura 19 mostra il pattern di espressione proteica nel *Synechocystis* ai diversi tempi di incubazione. I dati riguardanti il Western Blotting non sono mostrati poichè devono essere ulteriormente investigati.

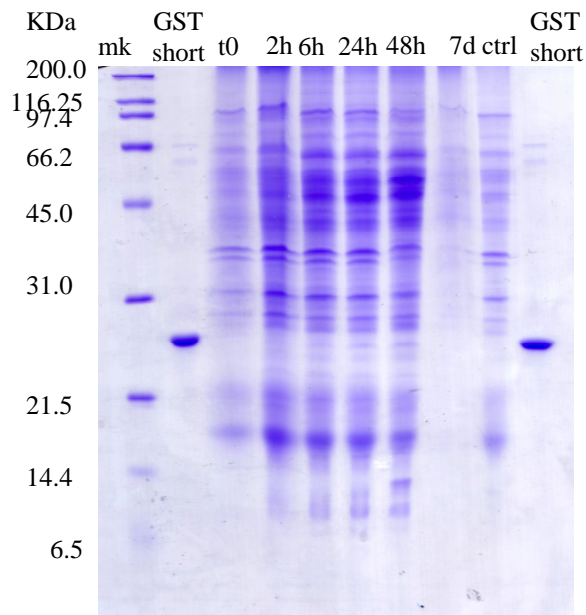


Figure 19. SDS/PAGE 13.5%. Espressione di protein in campioni a differenti tempi di esposizione alla luce: t0, t2h, t6h, t24h, t48h, 7giorni, ctrl (7 giorni senza esposizione alla luce).

2.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA GSTP1-1 IN LINEE CELLULARI TUMORALI DELLA PROSTATA

2.4.1 Studi di Western Blotting condotti sulle linee cellulari di prostata

Le analisi sono state condotte su numerose linee cellulari immortalizzate di prostata e i risultati ottenuti sono stati normalizzati per il gruppo di appartenenza delle stesse linee cellulari.

Come si può vedere dalla Fig 20, la presenza della banda corrispondente alla GSTP1-1 risulta essere particolarmente evidente nelle cellule iperplastiche benigne (BPH) che rappresentano il nostro controllo positivo. Si tratta, infatti, di cellule che presentano un certo grado di iperplasia ma che non sono tumorali; per questo motivo risulta evidente la presenza dell'enzima GSTP1-1 il cui promotore non è metilato. Nelle linee cellulari tumorali del gruppo G2, associato ad una prognosi positiva per il paziente, la banda di espressione della GSTP1-1 risulta presente ma con un'intensità minore rispetto a quella presente nella lane corrispondente alle linee cellulari BPH (pannello B). Dalla figura risulta inoltre evidente come ad un maggiore livello di aggressività del tumore (linee cellulari del gruppo G1, associate ad una peggiore prognosi per il paziente, e linee cellulari tumorali metastatiche, LNCaP) corrisponda una sempre minore espressione della banda relativa alla GSTP1-1 che, infatti, risulta del tutto assente nella lane corrispondente alle linee cellulari tumorali metastatiche, LNCaP (controllo negativo).

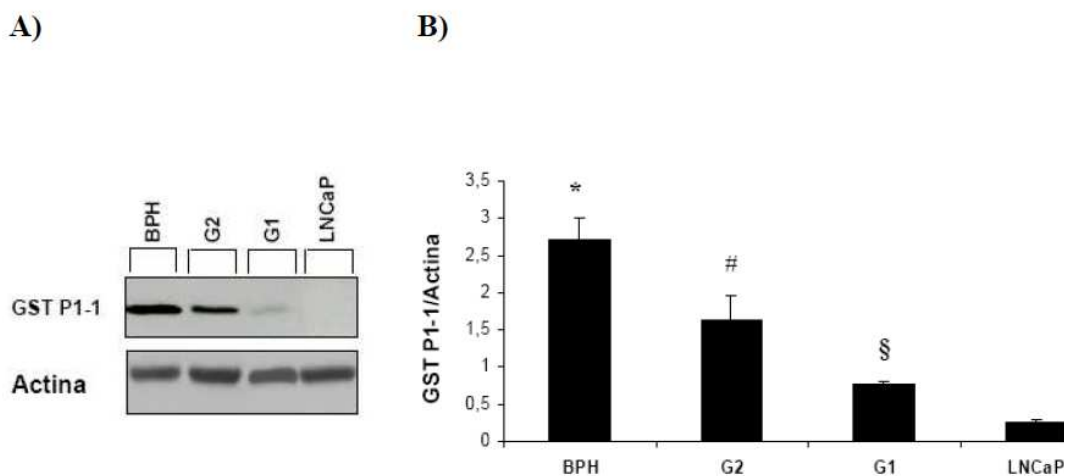


Fig. 20. A) Blotting anti-GSTP1-1 in cellule prostatiche a diverso grado patologico. B) Analisi densitometrica e statistica del Blotting anti GSTP1-1 nelle stesse linee cellulari.

Durante il nostro studio abbiamo, inoltre, cercato di capire se la progressiva scomparsa della GSTP1-1 nell'estratto delle diverse linee cellulari prostatiche, fosse in qualche modo compensata dalla comparsa di GST appartenenti ad altre classi. A tale scopo sono stati condotte analisi di Western Blotting nelle stesse linee cellulari prese in esame per la GSTP1-1 andando però ad evidenziare l'eventuale comparsa di bande corrispondenti alle GSTT1-1, GSTM2-2 e GSTA1-1. La figura 21 ribadisce la presenza in intensità variabile della GSTP1-1 nelle diverse linee cellulari, ma non evidenzia alcuna banda relativa a nessuna delle altre GST prese in esame.

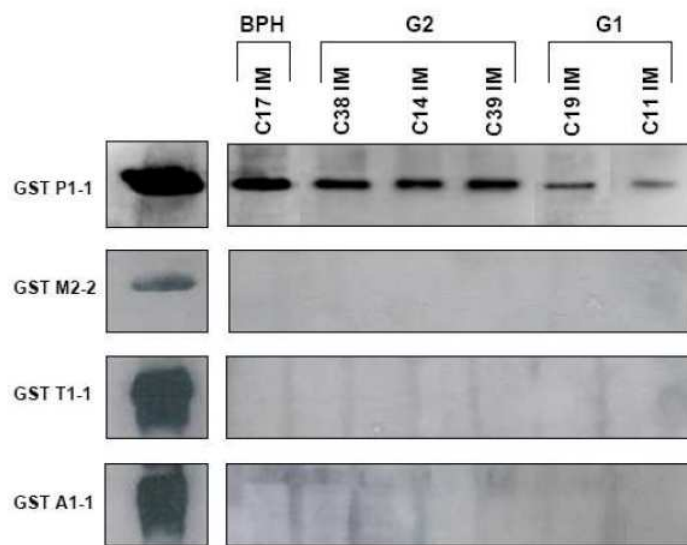


Fig. 21 Western Blotting anti GSTP1-1, GSTM2-2, GSTT1-1 e GSTA1-1 in linee cellulari tumorali a diverso stadio patologico

2.4.2 Analisi dell'attività specifica della GSTP1-1 in linee cellulari tumorali prostatiche

I dati ottenuti dagli studi di Western Blotting sono stati avvalorati da quelli derivanti dai calcoli di Attività Specifica effettuati sulle stesse linee cellulari. Come si nota in Figura 22, infatti, i valori di Attività Specifica, calcolati (come descritto in materiali e metodi) usando GSH1 mM e CDNB 1mM, risultano progressivamente più bassi passando dalle linee cellulari iperplastiche benigne (HBP) fino a diventare nulli nelle linee cellulari tumorali metastatiche, LNCaP, (dati non mostrati).

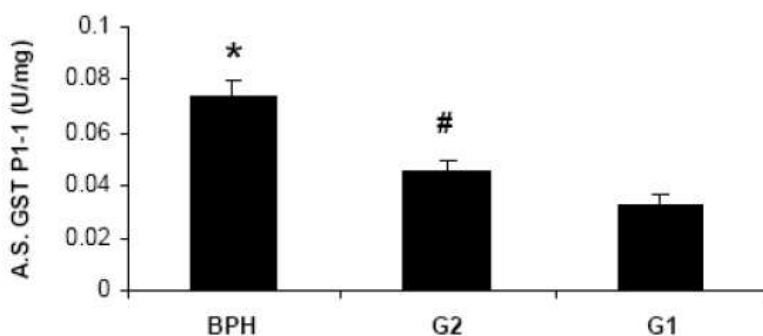


Fig. 22. Analisi densitometrica e statistica dell'attività specifica della GSTP1-1 saggiata nelle cellule prostatiche immortalizzate a diverso grado patologico. L'attività delle linee BPH è significativamente maggiore rispetto alle linee G1 e G2 ($p < 0.05$ vs G1 e G2). L'attività delle linee G2 è ancora significativamente più alta rispetto alle linee G1 ($p < 0.05$ vs G1).

3 DISCUSSIONE

3.1 Studi condotti sulla GSTP1-1 e sui suoi mutanti I104V, A113V e I104V/A113V

La purificazione ha dato risultati simili per tutti gli enzimi (GSTP1-1 wt, I104V, A113V e I104V/A113V), data la loro simile affinità per il GSH. Infatti, gli studi cinetici condotti sulla GSTP1-1 wt e sui suoi mutanti hanno permesso di stabilire che il sito di legame per il GSH (sito G) non è influenzato dalla presenza delle mutazioni.

Studi cristallografici condotti precedentemente sulla GSTP1-1 in complesso con il S-hexyl GSH (Reinemer *et al.*, 1992) o con l' EA (Oakley *et al.*, 1997) hanno permesso di collocare il residuo Ile104 nel sito-H, vicino alla Tyr108 ($\approx 3 \text{ \AA}$) e il residuo Ala113 nella regione N-terminale, completamente al di fuori del sito attivo ($\approx 18 \text{ \AA}$). Tale struttura ci aiuta a spiegare i cambiamenti che si osservano nei parametri cinetici principalmente a carico del mutante I104V, mentre di più difficile interpretazione risultano le variazioni osservate per il mutante A113V in presenza dell'EA come cosubstrato, proprio a causa della distanza tra il residuo 113 e il sito attivo dell'enzima. Altri studi suggeriscono che la mutazione I104V possa alterare l'intera struttura geometrica del sito-H dell'enzima oppure che possa, attraverso un "effetto sfera secondario", influenzare il ruolo della Tyr108 (Zimniak *et al.*, 1994) Come riportato da lavori precedenti (Lo Bello *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998) inoltre, l'effetto delle mutazioni può variare a seconda del meccanismo e del substrato usati dallo stesso enzima. Per esempio, il CDNB è il substrato classico nella reazione di coniugazione con il GSH ed è stato dimostrato che il fattore limitante per questa reazione è di natura fisica, (Ricci *et al.*, 1996), e che la Tyr108 non influenza questo meccanismo catalitico (Lo Bello *et al.*, 1997). Nel caso del mutante I104V la k_{cat} risulta quasi completamente inalterata dalla presenza della mutazione, mentre è possibile osservare un aumento dei valori di K_m^{CDNB} , ad indicare che la mutazione (da Ile a Val) può influenzare il legame del CDNB probabilmente a causa della differente idrofobicità o della differente grandezza tra i due residui.

Nel caso dell'EA, la Tyr108 svolge un ruolo importante nella reazione di addizione di Micheal poiché stabilizza lo stato di transizione grazie al suo gruppo idrossile; per questo mutazioni a carico di residui localizzati vicino alla Tyr108 possono alterare la catalisi. In accordo con quanto detto sopra, è possibile osservare nel mutante I104V un decremento di circa 2 volte nei valori di k_{cat} .

In fine, usando l'NBD-Cl come cosubstrato, il principale cambiamento che si osserva nel mutante I104V è la forte riduzione del valore di k_{cat} e di efficienza catalitica (da $250 \pm 12 \text{ s}^{-1} \text{ mM}$ a $37 \pm 5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}$). E' stato riportato che nella reazione che si verifica usando l'NDB-Cl come cosubstrato, lo step limitante, di natura fisica, è dato dai lenti movimenti dell'elica 4 su cui sono localizzati sia il residuo Tyr108 che Ile104 (Caccuri *et al.*, 1996). Tale rigidità è data dalla possibile presenza di un legame idrogeno tra il gruppo idrossile della Tyr108 e l'atomo di

ossigeno dell’NBD-Cl; infatti, la perdita di tale legame nel mutante Y108F comporta un aumento di circa 8 volte del valore di k_{cat} (Lo Bello *et al.*, 1997). Anche nel mutante I104V la sostituzione dell’Ile con Val sembra influenzare tale valore, probabilmente rinforzando il legame tra il substrato e l’elica⁴. In conclusione, tra le varianti alleliche, i principali cambiamenti catalitici avvengono a carico del mutante I104V, suggerendo un ruolo fondamentale di questo residuo nella catalisi o nel legame con il substrato anche rispetto al residuo Tyr108.

Studi precedenti condotti sulla stabilità termica delle varianti alleliche della GSTP1-1 (Ali-Osman *et al.*, 1997; Zimniak *et al.*, 1994) hanno indicato una minore stabilità del mutante 104 (corrispondente alla variante allelica HGSTP1*B) rispetto all’enzima wt (HGSTP1*A) alla temperatura di 45°C. I nostri studi, condotti alle stesse temperature, non supportano questi dati. Infatti, in seguito ad incubazione di tutti gli enzimi per 1h a 45°C non abbiamo osservato alcuna riduzione dell’attività enzimatica e; anche protraendo l’esperimento fino alle 24h il risultato, per tutte le varianti alleliche, si è mostrato inalterato. Solamente dopo una breve incubazione a 50°C abbiamo osservato una minore termostabilità del mutante 104 rispetto all’enzima wt, in accordo con esperimenti precedentemente condotti (Johansson *et al.*, 1998). Sulla base di questi ultimi risultati, sorge la questione se la termostabilità delle varianti alleliche possa essere considerata un fattore rilevante nella spiegazione della loro differente suscettibilità all’insorgenza di alcuni tumori, come indicato in alcuni studi epidemiologici.

Per quanto riguarda l’interazione tra il CHL e la GSTP1-1 wt e i suoi mutanti, nel corso del lavoro da noi condotto sono stati effettuati studi cristallografici (Parker M, dell’università di Melbourne) che ci hanno permesso di osservare come questo agente chemioterapico si vada a collocare nel sito-H dell’enzima. Come si può vedere dalla figura 23b quando il clorambucile è coniugato con il GSH il suo gruppo cloro etile punta in direzione opposta rispetto a quanto accade in assenza di GSH, mentre gli anelli aromatici rimangono nello stesso piano.

Il legame del clorambucile nel complesso CHL-GSTP1-1, invece, ricorda il tipo di legame non produttivo osservato nello stesso enzima per l’EA in assenza di GSH (Oakley *et al.*, 1997). Infatti, in entrambi i casi, l’anello aromatico del farmaco, si posiziona tra l’anello aromatico delle catene laterali dei residui Phe8 e Tyr108 e la sua flessibile coda carbossilica punta verso il sito attivo (Fig. 23c). Gli anelli aromatici del CHL e dell’EA risultano in posizione simile, sebbene su piani differenti e non si osservano particolari movimenti delle catene laterali vicine. Inoltre, mentre per il legame EA-GSH con l’enzima GSTP1-1 si possono riconoscere due modalità: IN in cui l’anello aromatico dell’EA si orienta principalmente verso la catena laterale della Tyr108 e OUT in cui tale anello aromatico si posiziona tra la Phe8 e la Tyr108. (Fig. 23d) (Oakley *et al.*, 1997), il clorambucile adotta esclusivamente la modalità OUT.

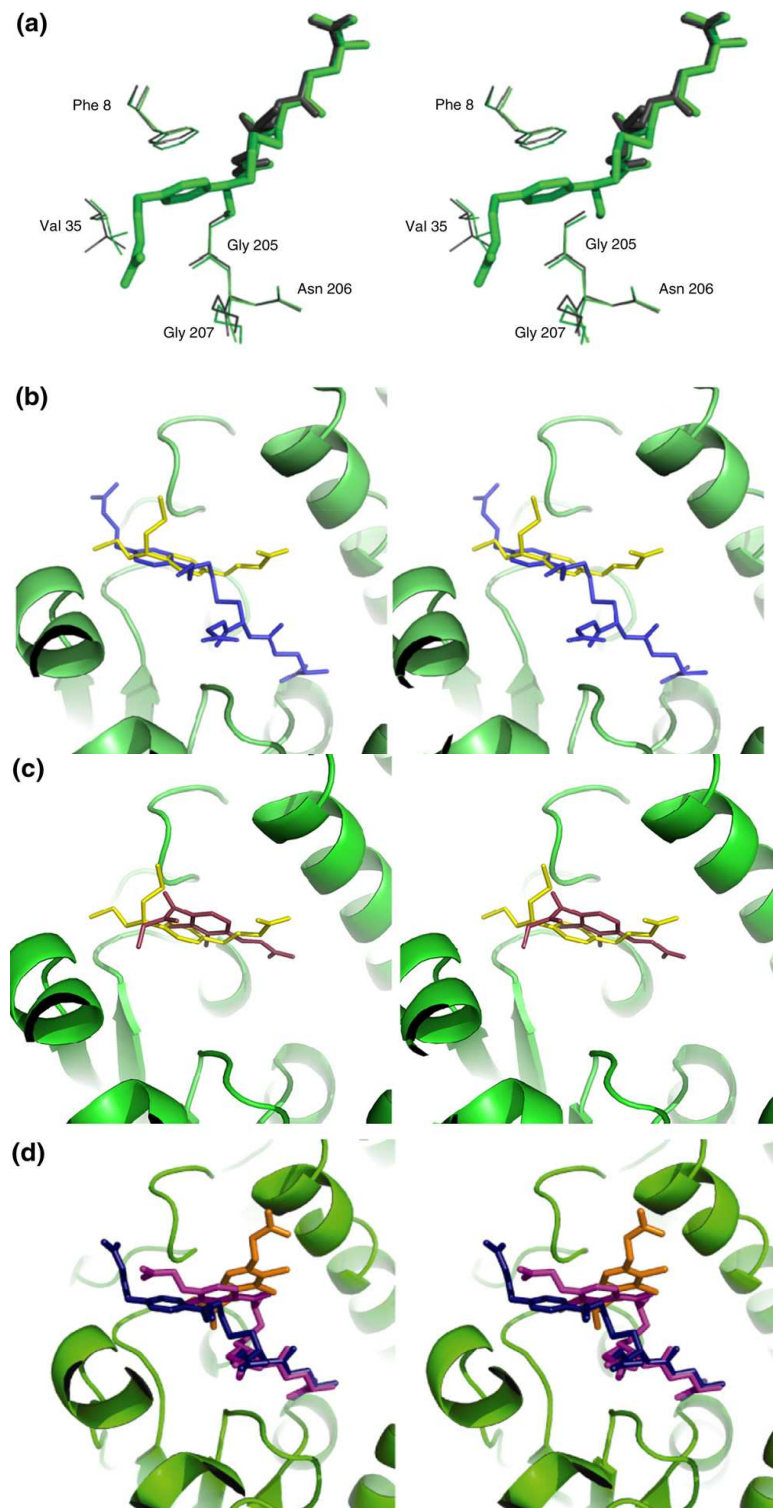


Fig.23. Sovrapposizione di strutture. (a) GSH legato alla GST in grigio e coniugato clorambucile-GSH legato alla GST in verde. (b) Coniugato Clorambucile-GSH in blu e clorambucile in giallo. (c) EA legato in maniera non produttiva in rosso e clorambucile legato in maniera non produttiva in giallo. (d) EA-GSH legato in modalità IN in arancione, EA-GSH legato in modalità OUT in rosa e CHL-GSH legato in modalità OUT in blu (da Parker *et al.*, 2008).

Al contrario di quanto osservato in altri studi (Ji *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 1999) che indicano una variazione di legame tra la GSTP1-1 e il substrato prevalentemente in seguito a mutazione del residuo 104 da Ile a Val (probabilmente a causa della riorganizzazione del network di molecole di acqua nelle vicinanze del residuo e alla ridotta libertà conformazionale dell'Ile rispetto alla Val che può assumere due distinte conformazioni) noi non abbiamo osservato significative variazioni né nel modo in cui il CHL si lega al sito attivo né nel network di molecole di acqua presenti nello stesso sito, tra l'enzima GSTP1-1 wt e la variante *C (I104V/A113V). Questi risultati suggeriscono che il residuo 104 influenza le modalità di legame solo per alcuni substrati.

Per quanto riguarda il residuo 113, la sua distanza dal sito attivo dell'enzima, rende difficile capire come esso possa influenzare l'attività enzimatica. Hu e collaboratori hanno ipotizzato che il residuo 113, localizzato tra l'elica 4 e l'elica 5 e posizionato all'apertura di un canale al solvente nell'interfaccia tra le due subunità, possa formare una tasca idrofobica con la regione complementare e simmetrica dell'altra subunità (Hu *et al.*, 1997). Tale tasca potrebbe controllare l'accesso del substrato e, quindi, l'idrofobicità e le dimensioni del residuo 113 potrebbero contribuire a determinare la specificità di substrato dell'enzima. Tuttavia, gli studi cristallografici da noi condotti sull'enzima wt e sui suoi mutanti, non supportano questa tesi.

Le strutture presentate in questo studio, forniscono delle strategie per lo sviluppo di nuovi inibitori della GSTP1-1 che potrebbero inibire la detossificazione del clorambucile o di simili farmaci alchilanti da parte dell'enzima. Per prima cosa, la mancanza di variazioni strutturali tra le varianti alleliche della GSTP1-1 suggerisce che potrebbe essere sviluppato un farmaco con uguale efficacia verso tutte le varianti.

Tuttavia, la differente reattività qui riportata tra le varianti alleliche in presenza dei diversi cosubstrati, indica che alcuni nuovi composti potrebbero presentare diversi livelli di inibizione nei confronti dei diversi mutanti.

Secondariamente, potrebbero essere sintetizzati dei nuovi inibitori in cui le regioni alchilanti del CHL, che reagiscono con il GSH e creano dei crosslink con il DNA, vengano sostituite con regioni in grado di controllare le interazioni con l'enzima. Lo scopo dovrebbe essere quello di creare nuove molecole che non siano substrati per l'enzima e che non reagiscano in maniera aspecifica con altre molecole, quali il DNA.

Inoltre, poiché il CHL è un inibitore povero della GSTP1-1 e dei suoi mutanti e crea con tali enzimi poche interazioni, maggiori sforzi dovrebbero essere condotti nei confronti degli analoghi del complesso CHL-GSH, in modo da creare composti che formino maggiori interazioni con l'enzima. In fine, le strutture presentate in questo lavoro definiscono delle interazioni tra i residui del sito attivo e il clorambucile, che potrebbero essere utilizzate per la scoperta di nuovi farmaci mediante uno screening virtuale basato sull'analisi della struttura.

3.2 Genotipizzazione della GSTM1 e della GSTT1 in campioni di DNA estratto da sangue intero

La necessità di svolgere studi di genotipizzazione in individui esposti al benzene, nasce dal fatto che numerosi studi mostrano un'associazione tra le GST e i biomarcatori di esposizione, in accordo con la funzione biologica di questi enzimi che sembrano agire nel pathway che porta alla produzione di s-PMA (s-phenylmercapturic acid). Più precisamente, la perdita della GSTT1 o della GSTM1 potrebbe prevenire il completamento di questo pathway. Allo stesso modo, i biomarcatori di effetto tendono ad essere più elevati in soggetti con una ridotta funzione delle GST a conferma dell'ipotesi secondo la quale soggetti con genotipo GSTT1 nullo o GSTM1 nullo dovrebbero essere meno resistenti agli effetti tossici del benzene (Dougherty *et al.*, 2008).

L'analisi del genotipo della GST M1-1 e T1-1, condotta su un campione di 183 individui di cui 157 occupazionalmente esposti al benzene e 24 controlli, ha dimostrato che il gene polimorfico GST M1 è assente nel 45 % circa degli individui, mentre il gene polimorfico GST T1 è assente nel 10% circa degli stessi individui. Tali frequenze sono in ottimo accordo con i dati riportati in letteratura circa la distribuzione dei suddetti geni nella popolazione caucasica (Figure 24 e 25)

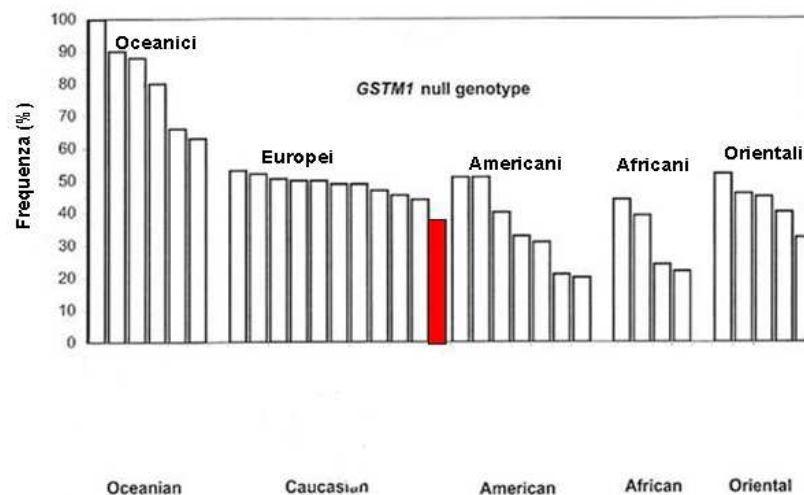


Figura 24: distribuzione delle frequenze genotipiche (tratta e modificata da Johansson A.S. & Mannervik B., 2001)

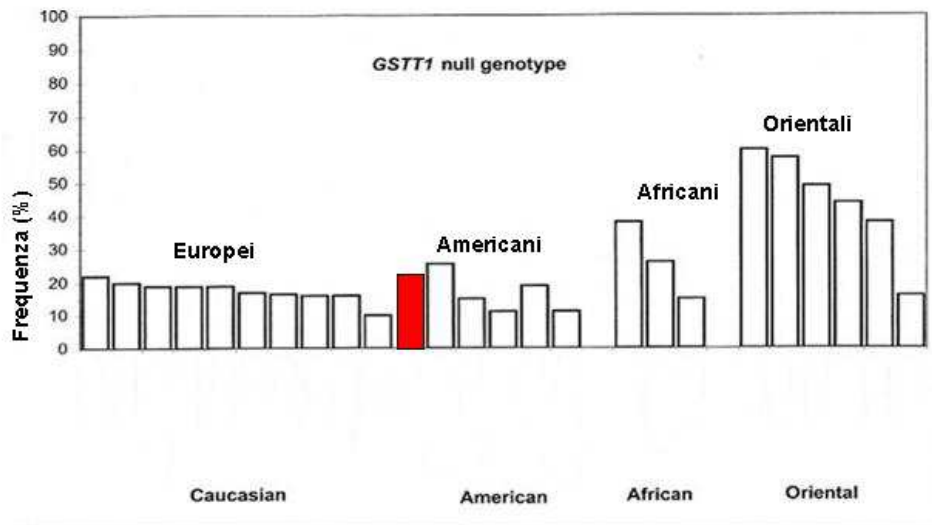


Figura 25: distribuzione delle frequenze genotipiche (tratta e modificata da Johansson A.S. & Mannervik B., 2001)

Gli studi da noi condotti sulle conseguenze dell'esposizione al benzene basati sul confronto genotipico e fenotipico tra soggetti esposti e soggetti non esposti usati come controllo sono ancora in fase di svolgimento, il che non ci consente di trarre dei risultati definitivi.

In particolare il nostro progetto prevede, oltre alla genotipizzazione della GSTT1 e GSTM1 descritta precedentemente, anche l'analisi dei polimorfismi della GSTP1-1 negli stessi soggetti oltre ad un'analisi di tipo fenotipico. La prima verrà eseguita sfruttando le tecniche della PCR e del sequenziamento genico. In particolare la PCR, che permette la sostituzione dell'Ile in Val del residuo 104 localizzato sull'esone 5 e la sostituzione da Ala in Val del residuo 113 localizzato sull'esone 6, prevede il susseguirsi di tre reazioni per ciascun campione: la prima consente l'amplificazione contemporanea dei due esoni, 5 e 6, e le altre due permettono di ottenere separatamente entrambe le mutazioni. Per questo primo passaggio abbiamo completato la prima PCR che è stata eseguita in tutti e 183 i campioni (esposti e non esposti) portando alla formazione di un'unica banda (dati non mostrati).

L'analisi fenotipica viene effettuata mediante saggio di attività enzimatica direttamente su lisato di eritrociti, dopo centrifugazione per rimuovere la membrana. L'uso di metodi spettrofotometrici (già descritti) che seguono la formazione del prodotto, sia nel caso del CDNB (substrato della GST P1-1) che nel caso dell'EPNP (substrato preferenziale della GST T1-1) ci permettono di saggiare l'attività su un gran numero di individui in ambedue i campioni. Ovviamente, risulta necessario procedere al pre-trattamento del campione e modificare la procedura di saggio allo spettrofotometro per ovviare all'interferenza

dell'Hb nell'assorbanza. Anche in questo caso sono stati condotti i primi saggi di attività specifica su alcuni dei 183 campioni presi in esame, ma l'esperimento è ancora in corso di svolgimento.

3.3 Caratterizzazione della GST short di cianobatterio

Le analisi da noi condotte sulla GST short ci permettono di ottenere una prima caratterizzazione di questo enzima le cui caratteristiche enzimatiche non sono note in letteratura.

In primo luogo i risultati ottenuti ci hanno consentito di effettuare una prima analisi filogenetica basata su processi di allineamento multiplo di sequenza. Sulla base di questi esperimenti è stato possibile osservare una buona similarità di sequenza con le GSTI e GSTIII di *Zea mays* particolarmente a carico dei residui presenti nel sito G (tab. 11)

<i>GST I</i>	<i>GST III</i>	<i>GST CYANO</i>
Ser ¹¹	Ser ¹¹	Ser ¹¹
Asn ³⁴	Asp ³⁴	Asn ³⁴
Leu ⁴⁶	Leu ⁴⁶	Leu ⁴⁶
Asn ⁴⁹	Asn ⁴⁹	Asn ⁴⁹
Pro ⁵⁰	Pro ⁵⁰	Pro ⁵⁰
His ⁴⁰	His ⁴⁰	His ⁴⁰
Lys ⁴¹	Lys ⁴¹	Lys ⁴¹
Arg ⁶⁸	Arg ⁶⁸	Gly ⁶⁸
Gn ⁵³	Gn ⁵³	Lys ⁵³
Glu ⁶⁶	Glu ⁶⁶	Glu ⁶⁶
Phe ⁵¹	Phe ⁵¹	Phe ⁵¹

Tab. 11. Confronto tra i residui presenti nel sito G delle GSTI e GSTIII di *Zea mays* e nella GST short di *Synechocystis*.

Nell'isoenzima GSTIII di mais sono stati identificati 6 residui nell'intervallo compreso tra gli aa 38-43 che sembrano essere implicati nel legame con il GSH (in verde nella tabella + Ser11). (Labrou *et al.*, 2001)

I residui più conservati tra i diversi isoenzimi del mais sono, comunque, quelli indicati in rosso nella tabella; in particolare, la Ser11: è implicata nella stabilizzazione dell'anione del glutatione tiolato (probabilmente il gruppo idrossile della serina forma un legame H con l'anione del glutatione legato), mentre i residui His40 e Lys41, essendo carichi positivamente, possono contribuire direttamente al campo elettrostatico del sito attivo: il GSH risulta così immerso in una regione elettrostaticamente positiva data dalla presenza di tre residui carichi positivamente (Arg40, Lys41, Arg68).

Sulla base di questi dati il sito attivo può essere considerato come una tasca in cui, in seguito al legame del GSH con il residuo Glu66, si ha una

“chiusura” del sito idrofobico dovuta all’interazione con i residui 40 e 41.

La classica purificazione utilizzata per la GSTP1-1 che prevede l’utilizzo di una colonna cromatografica basata sull’affinità dell’enzima per il GSH, ha dato scarsi risultati data la bassa affinità della GST short per il GSH. Il processo di purificazione è stato invece ottimizzato mediante l’uso di una colonna cromatografica basata sull’affinità per gli ioni metallo che sfrutta la presenza di una coda di istidine sulla porzione N-terminale dell’enzima.

Dalle analisi condotte sull’attività specifica dell’enzima in presenza di differenti cosubstrati (CDNB, EA, EPNP, Cu-OOH e NBD-Cl) è possibile osservare una buona attività perossidasi dell’enzima al contrario di quanto accade per le GST di *Zea mays* che, invece, mostrano una prevalente attività detossificante, specialmente nei confronti di alcuni pesticidi ed erbicidi (Sommer *et al.*, 1999)

I bassi valori di attività specifica mostrati dalla GST short rispetto alle altre GST umane con cui è stata confrontata, possono essere attribuiti alla differente struttura primaria presentata da questo enzima oltre che, naturalmente, alla differente origine filogenetica che, come detto in precedenza, rende l’enzima di cianobatterio più affine ad enzimi di origine vegetale (*Zea mays*) o batterica (*E.coli*) piuttosto che a quelli umani.

Dagli studi di stabilità termica risulta che la GST short è molto più termolabile della GSTP1-1 umana, infatti la sua attività si riduce già a partire dai 40°C e diventa più bassa dell’88% a 50°C. Anche in questo caso la bassa stabilità dell’enzima a partire da temperature inferiori rispetto a quelle mostrate dalla GSTP1-1 umana potrebbe essere attribuita alla sua diversa struttura.

Infine, le analisi condotte sul *Synechocystis*, non ci hanno permesso di dedurre in maniera definitiva la natura inducibile della proteina. Tuttavia, risulta chiaro (anche se i dati non sono mostrati nel testo) la sua mancata espressione, almeno a livelli apprezzabili mediante le normali tecniche di identificazione proteica (Western Blotting) in condizioni basali.

3.4 Analisi di espressione della GSTP1-1 in linee cellulari prostatiche a diverso grado patologico

La GST pi è tra le GST umane quella più abbondantemente espressa nelle cellule tumorali umane (Doroshov *et al.*, 1995). Moltissimi tumori e linee cellulari umane presentano, infatti, livelli incrementati di questo enzima rispetto al tessuto di origine e la sua espressione è, in molti tumori, inversamente correlata con la prognosi e la risposta ai trattamenti chemioterapici. Al contrario di quanto appena descritto per la maggior parte dei tumori umani, nei tumori prostatici i livelli di GSTP1-1 risultano essere estremamente bassi fino a diventare nulli nello sviluppo della forma tumorale invasiva (Lee *et al.*, 1994; Moskaluk *et al.*, 1997). L'assenza di questo enzima sembra, inoltre, essere associata ad una ipermetilazione del promotore della GSTP1-1, fenomeno questo che non risulta presente in tessuti normali o iperplastici benigni. Sulla base di questi dati il nostro lavoro si è focalizzato sull'analisi di linee cellulari immortalizzate di tumore alla prostata a diverso grado patologico (Nanni *et al.*, 2006). In particolare, i nostri studi sono stati condotti su linee cellulari iperplastiche benigne (HBP) usate come controllo positivo, linee cellulari tumorali immortalizzate associate ad una prognosi favorevole (G2), linee cellulari tumorali immortalizzate associate ad una prognosi sfavorevole (G1) e linee cellulari tumorali metastatiche (LNCaP).

L'attribuzione delle linee cellulari tumorali prostatiche ai gruppi con diversa prognosi, G1 e G2, è stata definita sulla base di uno screening di espressione genica effettuata con la tecnica del microarray su cellule derivate da prostatectomia di pazienti di cui, nel corso dello studio, è stato possibile seguire il decorso medico (Nanni *et al.*, 2006) (Fig. 26). Al termine di questa analisi è stato possibile individuare un gruppo di geni comunemente over-espressi o down-regolati nelle diverse linee. Tra i geni presi in esame risulta presente quello della GSTP1.

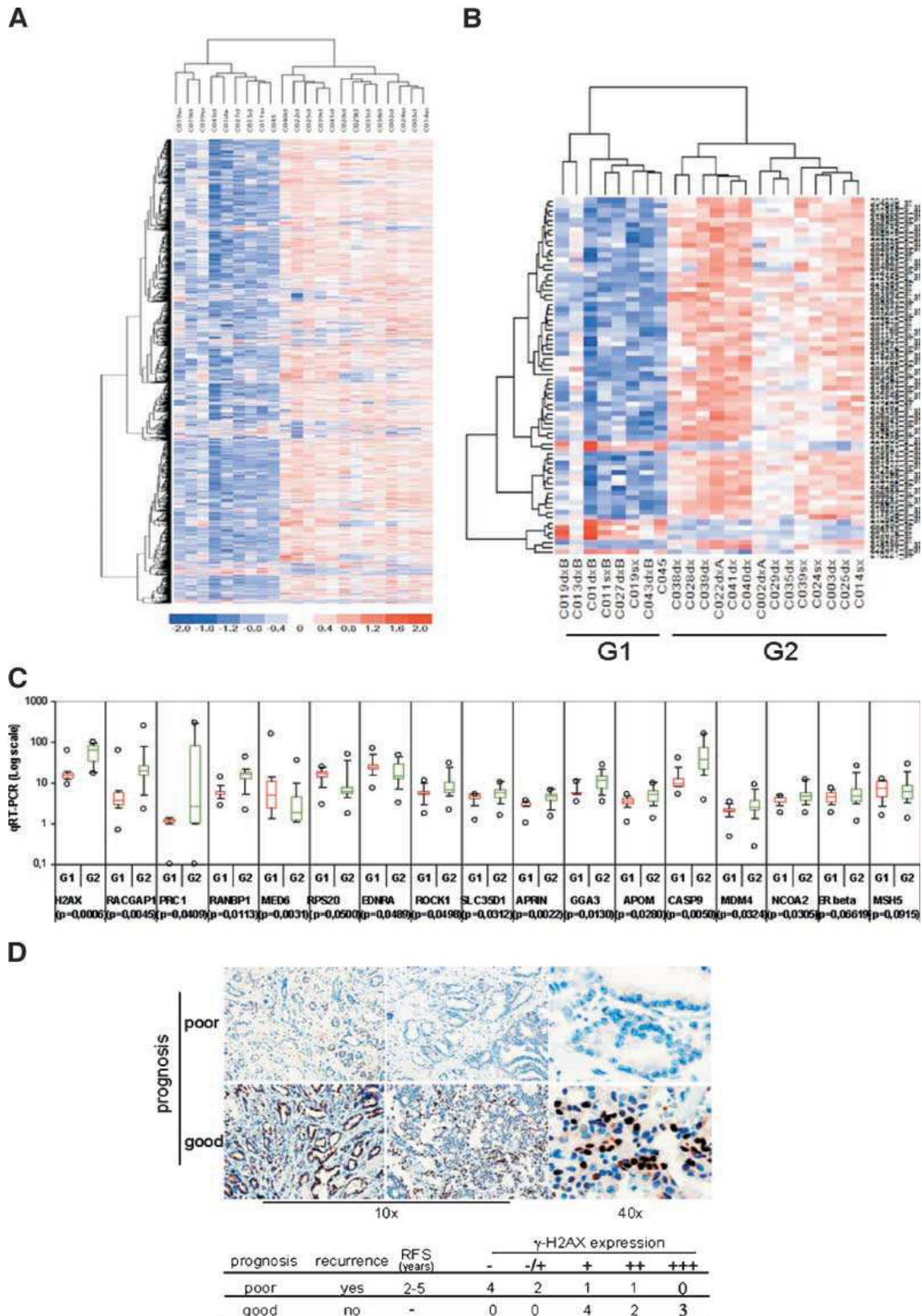


Fig. 26. Pattern di espressione genica di cellule derivate da tumore prostatico. A. Analisi del cluster di 22 culture cellulari derivate da tumour della prostata. B. Analisi di 70 geni derivati dall'intersezione delle analisi PAM e SAM fatte per due gruppi di pazienti definiti sulla base dello stato del loro follow-up. C. Analisi comparative di qRT-PCR su geni derivanti dall'intersezione di PAM/SAM o GO. D. Immunohistochemica su campioni di pazienti suddivisi in due gruppi in base alla prognosi (tratto da Nanni *et al.*, 2006)

Contrariamente a quanto detto in numerosi lavori, dalle analisi condotte nel nostro laboratorio, risulta una effettiva riduzione dei livelli di GSTP1-1, come si può notare sia dai dati derivanti dalle analisi di Western Blotting che dai saggi di Attività specifica, ma non una totale scomparsa dell'enzima fatta eccezione per le linea cellulare tumorale metastatica (LNCaP). Tali dati sono avvalorati da analisi di tipo statistico da cui deriva una significativa riduzione dei livelli di espressione della GSTP1-1 tra le linee iperplastiche benigne e quelle tumorali a prognosi favorevole, e tra queste ultime e le linee tumorali a prognosi sfavorevole. Per questo motivo i nostri studi si stanno focalizzando sull'analisi del promotore della GSTP1-1 e sui fenomeni di ipermetilazione ad esso attribuiti.

APPENDICE 1: MATERIALI E METODI

1.1 Terreni di coltura liquidi

Tutti i terreni (Tabella 4) vengono portati al volume desiderato con H₂O distillata e poi autoclavati per 20 minuti a 120°C.

Tabella 4. Terreni di coltura liquidi utilizzati

Brodo LB (Luria Bertani)	Peptone	10 gr/l
	Estratto di lievito	10 gr/l
	Nacl	5 gr/l

1.2 Terreni di coltura solidi

Agar duro: aggiungere 15 gr di agar ad 1L di LB e poi autoclavare.

1.3 Antibiotici

Tutti gli antibiotici sono filtrati utilizzando filtri sterili con pori del diametro di 0.45 µm e conservati in aliquote a -20°C. Al momento dell'utilizzo vengono sempre diluiti 1:1000.

Ampicillina (Amp): soluzione di 100 mg/ml (per la GSTP1-1 wt e i suoi mutanti) e 50 mg/ml (per la GST short) del sale sodico di ampicillina sciolto in acqua bidistillata.

Streptomicina (Strp): soluzione di 50 mg/ml di strptomycin sciolta in acqua bidistillata.

Cloramfenicolo (Cam): soluzione di 34 mg/ml di cloramfenicolo sciolto in etanolo.

1.4 Resine

La Sephadex G-25, il Sepharose 6B epossidato sono della PHARMACIA (Uppsala, Svezia).

Un'altra resina usata è la Ni-NTA Agarose, fornita dalla QIAGEN, costituita da acido nitrilotriacetico (NTA) legato allo ione metallico Ni²⁺, accoppiato alla Sepharose CL-6B.

1.5 Reagenti

I reagenti utilizzati sono i seguenti: 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ditionitrotolo (DTT), glutatione (GSH), 4-chloro-7-nitrobenzenfurazan (NBD-Cl), acido etacrinico (EA), 1,2-epossi-3-(4-nitrofenossi) propano (EPNP), cumene idroperossido (CuOOH), forniti dalla SIGMA (SIGMA Chemical Company St.Louis, MO, USA).

1.6 Preparazione delle piastre

Le piastre vengono preparate colando circa 25 ml di agar duro, precedentemente sterilizzato, a cui vengono aggiunti gli antibiotici, diluiti 1:1000, necessari per la selezione dei batteri.

1.7 Trasformazione

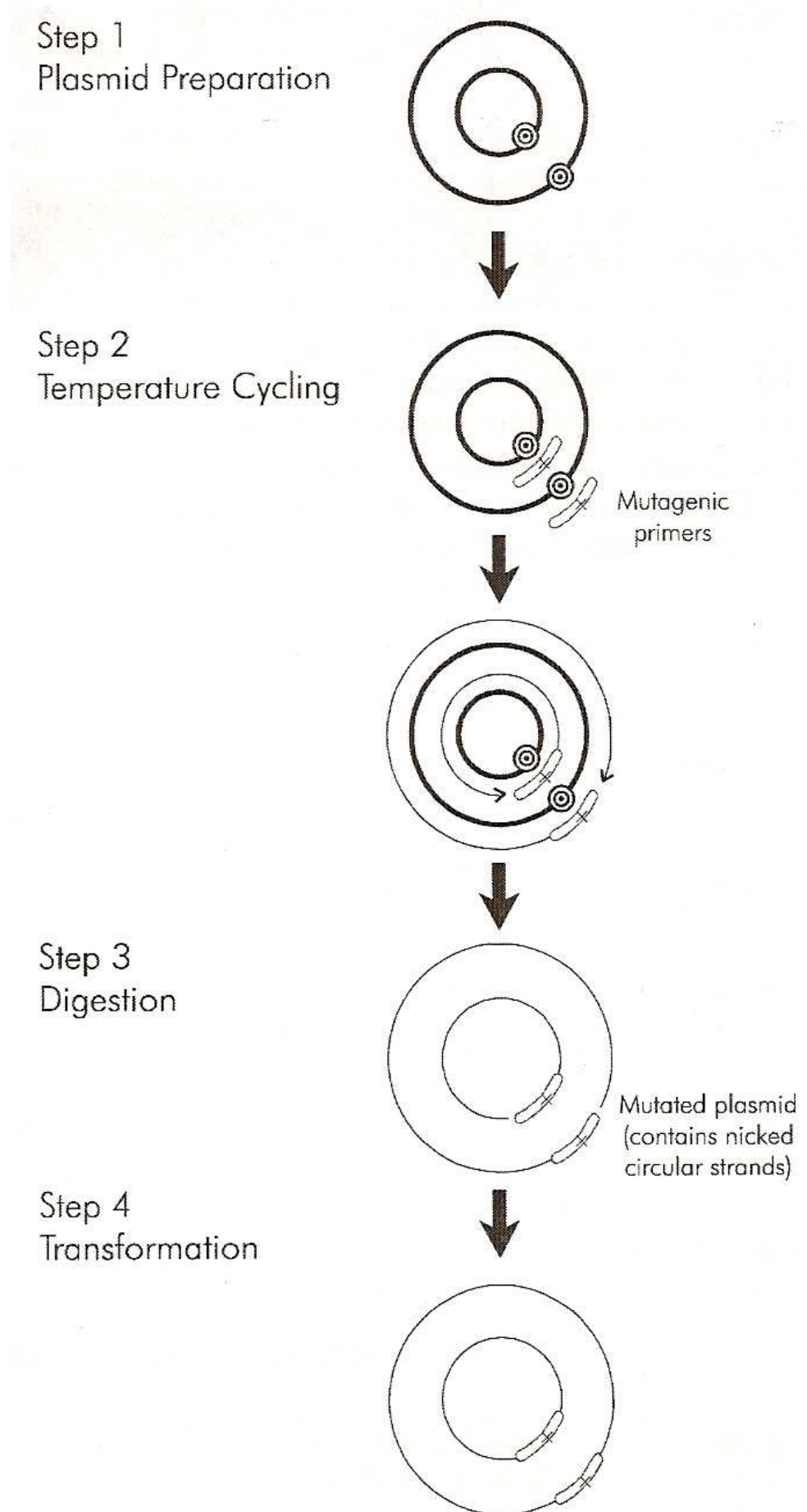
Il vettore di espressione contenente il gene per l'espressione delle proteine di interesse, è stato inserito mediante trasformazione per shock termico in cellule di *E. coli*. Ad una sospensione di 50 µl di cellule competenti si aggiungono, in provette sterili, 5-10 ng di DNA e la miscela, viene mantenuta in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente viene trasferita a 42°C per 30 secondi e immediatamente dopo nuovamente in ghiaccio. A questo punto si aggiunge 1 ml di brodo classico LB e la sospensione cellulare viene incubata a 37°C per un'ora. Terminata l'ora d'incubazione la miscela di trasformazione viene centrifugata a 4000 RPM per 5 minuti. Al termine della centrifugazione vengono eliminati circa 900 µl di super e il pellet, contenente le cellule, viene risospeso nei restanti 100 µl.

A questo punto la miscela di trasformazione viene messa su una piastra precedentemente preparata con gli antibiotici necessari per la selezione dei trasformanti e poi lasciata ad incubare over-night (18 ore) a 37°C per consentire la crescita delle colonie.

1.8 Clonaggio, Espressione e Purificazione dei mutanti I104V, A113V, I104V/A113V e della GST P1-1 wild type

Le varianti alleliche della GST P1-1, sono state ottenute utilizzando il "Quik Change™ Site-Direct Mutagenesis Kit", della Stratagene. La procedura si basa su un vettore di DNA a doppio filamento con un inserto di interesse e due primers oligonucleotidici (Fig.9) contenenti la mutazione desiderata. I primers, che si appaiano a due sequenze complementari presenti sul plasmide durante la fase di annealing della PCR, vengono estesi per azione della PfuTurbo™ DNA Polimerasi utilizzando i dNTP presenti nel Kit. In questo modo si viene a formare un plasmide mutato avente delle estremità sfalsate. I due plasmidi (quello stampo e quello mutato) vengono quindi sottoposti a digestione con l'enzima Dpn1; si tratta di una endonucleasi che riconosce la sequenza 5' -Gm6ATC- 3' presente sul DNA metilato (plasmide stampo). In questo modo il plasmide stampo viene degradato dall'azione dell'endonucleasi di restrizione mentre il plasmide mutato, che non essendo metilato non subisce alcun azione da parte di Dpn1, viene inserito in cellule di *E.coli*, XLBLUE, super-competenti, anch'esse in dotazione con il Kit, mediante trasformazione per Shock Termico (come precedentemente descritto).

Figura 9: Schema del protocollo utilizzato dal Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit' (Stratagene)



-1
GCC ACC
45

ATG CCG CCC TAC ACC GTC GTC TAT TTC CCA GTT CGA GGC CGC TGC
MET Pro Pro Tyr Thr Val Val Tyr Phe Pro Val Arg Gly Arg Cys
90

GCG GCC CTG CGC ATG CTG CTG GCA GAT CAG GGC CAG AGC TGG AAG
Ala Ala Leu Arg Met Leu Leu Ala Asp Gln Gly Gln Ser Trp Lys
135

GAG GAG GTG GTG ACC GTG GAG ACG TGG CAG GAC GGC TCA CTC AAA
Glu Glu Val Val Thr Val Glu Thr Trp Gln Glu Gly Ser Leu Lys
180

GCC TCC TGG CTA TAC GGG CAG CTC CCC AAG TTC CAG GAC GGA GAC
Ala Ser Cys Leu Tyr Gly Gln Leu Pro Lys Phe Gln Asp Gly Asp
225

CTC ACC CTG TAC CAG TCC AAT ACC ATC CTG CGT CAC CTG GGC CGC
Leu Thr Leu Tyr Gln Ser Asn Thr Ile Leu Arg His Leu Gly Arg
270

ACC CTT GGG CTC TAT GGG AAG GAC CAG CAC GAG GCA GCC CTG GTC
Thr Leu Tyr Leu Tyr Gly Lys Asp Gln Gln Glu Ala Ala Leuc Val
315

GAC ATG GTG AAT GAC GGC GTG GAG GAC CTC CGC TGC AAA TAC **ATC**
Asp Met Val Asn Asp Gly Val Glu Asp Leu Arg Cys Lys Tyr **Ile**
360

TCC CTC ATC TAC ACC AAC TAT GAG **GCG** GGC AAG GAT GAC TAT GTG
Ser Leu Ile Tyr Thr Asn Tyr Glu **Ala** Gly Lys Asp Asp Tyr Val
405

AAG GCA CTG CCC GGG CAA CTG AAG CCT TTT GAG ACC CTG CTG TCC
Lys Ala Leu Pro Gly Gln Leu Lys Pro Phe Glu Thr Leu Leu Ser
450

CAG AAC CAG GGA GGC AAG ACC TTC ATT GTG GGA GAC CAG ATV TCC
Gln Asn Gln Gly Gly Lys Thr Phe Ile Val Gly Asp Gln Ile Ser
495

TTC GCT GAC TAG AAC CTG CTG GAC TTG CTG CTG ATC CAT GAG GTC
Phe Ala Asp Tyr Asn Leu Leu Asp Leu Leu Leu Ile His Glu Val
540

CTA GCC CCT GGC TGC CTG GAT GCG TTC CCC GTG CTC TCA GCA TAT
Leu Ala Pro Gly Cys Leu Asp Ala Phe Pro Leu Leu Ser Ala Tyr
585

GTG GGG CGC CTC AGC GCC CGG CCC AAG CTC AAG GCC TTC CTG GCC
Val Gly Arg Leu Ser Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala Phe Leu Ala
630

TCC CCT GAC TAC GTG AAC CTC CCC ATC AAT GGC AAC GGG AAA CAG
Ser Pro Glu Tyr Val Asn Leu Pro Ile Asn Gly Asn Gly Lys Gln
638

*TGA GGGTTGGGGGCACTCTGAGCGGGAGGCAGAGTTTGCCTTCCTTTCTCCAGGACC
AATAAAATTTCTAAGAGAGCT (A)ⁿ

Figura 10. Sequenza nucleotidica della GST P1-1 dal codone di inizio al codone di stop,* ;in blu è indicata la coda polyA, in rosso il nucleotide in posizione 105 e in verde quello in posizione 114. (Tratta da Kano *et al.*, 1987).

Oligonucleotide	Sequenza
104Val 1°	5'CTCCGCTGCAAATAC GTCT CCCTCATCTACACC3'
104Val 2°	5'GGTGTAGATGAGGGAG ACG TATTTGCAGCGAG3'
113Val 1°	5'-CACCAACTATGAG GTGGG CAAGGATGAC-3'
113Val 2°	5'-GTCATCCTTGCC CACCT CATAGTTGGTC-3'
104/113Val 1°	5'CTGCAAATAC GTCT CCCTCATCTACACCAACTAT GAG GTGGG CAAGGATG-3'
104/113Val 2°	5'CATCCTTGCC CACCT CATAGTTGGTGTAGATGA GGGAG ACG TATTTGCA-3'

Fig. 11. Sequenze oligonucleotidiche utilizzate per la produzione dei tre mutanti della GST P1-1. Per ciascun mutante sono stati utilizzati due oligonucleotidi, tra loro complementari (1° forward; 2° reverse). Gli oligonucleotidi utilizzati per il mutante I104V sono lunghi 31bp, si estendono dal nt 300 al nt 330 e presentano al loro interno la mutazione ATC→GTC indicata in rosso; per il mutante A113V sono stati utilizzati oligonucleotidi di 25bp, che si estendono dal nt 327 al nt 352 e portano al loro interno la mutazione GCG→GTG indicata in verde; per il doppio mutante, I104V/A113V, sono stati utilizzati oligonucleotidi di 50 bp che si estendono dal nt 303 al nt 352 e che portano entrambe le mutazioni sopra indicate, evidenziate una in rosso e l'altra in verde.

Una volta ottenuti gli oligonucleotidi, sono state preparate per ciascun mutante, le miscele di reazione per la PCR:

- 5 µl di tampone di reazione 10X
- 1 µl di DNA
- 125 ng di oligonucleotide 1°
- 125 ng di oligonucleotide 2°
- 1 µl di dNTP
- 40 µl di H₂O bidistillata sterile
- 1 µl di Polimerasi (si aggiunge alla fine)

Accanto a queste miscele di reazione per i campioni, ne è stata preparata un'altra di controllo :

- 5 µl di tampone di reazione 10X
- 10 ng di pW_s 4.5 (plasmide di controllo)
- 125 ng di Primer di controllo 1
- 125 ng di Primer di controllo 2
- 1µl di dNTP
- 40 µl di H₂O bidistillata sterile.

Le miscele sono state messe in provette sterili da 0.2 ml e la PCR è stata mandata impostando i cicli indicati nella Tabella 5.

Al termine della PCR si procede con la digestione: le miscele vengono messe in ghiaccio per 2 minuti in modo che raggiungano una temperatura di circa 37°C. A questo punto da ciascuna miscela sono stati prelevati 40 µl, i restanti 10 µl sono stati conservati per il gel di agarosio, e trasferiti in provette sterili da 1.5 ml; ai 40 µl di miscela dei mutanti

viene aggiunto 1µl di enzima di restrizione (Dpn1), si mescola e si mette ad incubare per 1 ora a 37°C.

Terminata la digestione i plasmidi vengono trasformati in cellule supercompetenti, XL-1BLUE.

Tabella 5. Parametri PCR

CICLO	TEMPERATURA °C	DURATA
1°	95	30''
2°	95 (step 1) 55 (step 2) 68 (step 3)	30'' 1' 5'

Una volta ottenute le piastre di trasformazione, per ciascun mutante sono stati fatti 4 inoculi in 5 ml di terreno liquido LB in presenza di Amp 100 µg/ml. Ciascun inoculo è stato sottoposto a incubazione a 37°C over-night e, successivamente, è stato estratto il DNA dalle cellule. Il DNA estratto è stato quindi reinserito in cellule di *E.coli*, TOP10, per permettere l'espressione e la purificazione dei mutanti.

La purificazione dei tre mutanti, I104V, A113V e I104V/A113V è stata eseguita utilizzando lo stesso protocollo adoperato per la GST P1-1.

A partire dalla piastra di trasformazione, per ciascun enzima, è stata prelevata una colonia e trasferita in 25 ml di terreno liquido LB, autoclavato, contenente 25 µl di antibiotico, Amp100/Strep50. L'inoculo piccolo così ottenuto è stato portato ad agitare a 37°C over-night. Il giorno seguente da ciascun inoculo piccolo sono stati prelevati 5 ml e messi in beute contenenti 1L di terreno liquido LB (contenete 1 ml di antibiotico Amp100/Strep50) autoclavato (inoculo grande, diluizione 1:200). Le beute sono state tenute in agitazione a 37°C fino a che la densità ottica (O.D.) a 600 nm ha raggiunto un valore di circa 0.5; a questo punto a ciascuna beuta è stato aggiunto IPTG 0.5 M (119 mg di IPTG per ml di acqua distillata) in modo tale da indurre l'espressione delle proteine da parte delle cellule di *E. coli*; le beute sono state quindi riportate in agitazione a 37°C over-night.

Il giorno seguente il contenuto di ciascuna beuta è stato centrifugato a 7000 RPM per 15 minuti a 4°C; il pellet così ottenuto, contenente la componente cellulare, è stato conservato mentre il soprannatante è stato scartato. Al pellet è stato aggiunto tampone di lisi (T.Fosfato 10 mM pH 7, DTT 10 mM), in quantità di 3 ml per 1 gr di cellule, ed è stato lisato utilizzando il sonicatore. Le cellule sonicate sono state ultracentrifugate a 45000 RPM per 50 minuti a 4°C in modo da separare la componente proteica (soprannatante) dalle membrane cellulari (pellet) che devono essere scartate.

Dalla componente proteica in toto viene selezionata la GST mediante cromatografia di affinità per il GSH: il soprannatante ottenuto in seguito ad ultracentrifugazione viene, cioè, fatto passare attraverso una colonna a cui è legato GSH; le proteine che non hanno affinità per questo substrato tenderanno ad uscire subito dalla colonna; in seguito a lavaggi eseguiti con T.Fosfato 100 mM pH 7.0, utilizzato per eliminare dalla colonna quelle proteine che, pur non presentando affinità per il glutatione, vi sono rimaste intrappolate, è possibile eluire la proteina di interesse utilizzando il tampone di eluizione (NaCl 0.5 M, Na₂CO₃ 25 mM, DTT). La frazione così eluita viene raccolta in pool sulla base dei valori di ΔA/min e fatta passare su una colonna per cromatografia ad esclusione Sephadex G25 . Da qui vengono raccolte frazioni da 1 ml di cui vengono misurati A_{280nm} e attività (utilizzando GSH 1 mM e CDNB 1 mM).

1.9 Crescita cellulare e Purificazione della GST short

Una singola colonia del ceppo BL21 (DE3) pLysE di E.coli, trasformato con il plasmide di espressione pRESTC (utilizzando il metodo di trasformazione precedentemente descritto), contenente la sequenza nucleotidica della GST del *Synechocystis* sp. PCC 6803, è stata inoculata in 10 mL di terreno liquido LB contenente 50 mg/ml di Ampicillina e fatta crescere a 37°C over night . Da questa crescita sono stati prelevati 5 mL, aggiunti a 100 mL di terreno liquido LB (diluizione 1:20), sempre in presenza di antibiotico Amp 50 mg/ml, e lasciati crescere a 37°C O/N. Da quest'ultima crescita sono stati prelevati 20 mL aggiunti ad 1L di terreno LB (diluizione 1:50) e fatti crescere in agitazione a 37°C fino a che l'O.D. a 600 nm ha raggiunto un valore di circa 0.4. A questo punto viene indotta l'over espressione della proteina aggiungendo IPTG 0.1 mM e la crescita viene spostata per 4h a 26°C, in agitazione lenta. Al termine del tempo di incubazione la crescita viene centrifugata a 7000 RPM per 15 minuti. Il pellet così ottenuto viene risospeso in Lysis Buffer (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8.0; NaCl 300 mM; imidazolo 5 mM) più inibitore delle proteasi PMSF. A questo punto le cellule vengono sonicate per circa 1 minuto e ultracentrifugate a 20000 RPM per 40 minuti in modo da rimuovere il materiale insolubile dal lisato. L'estratto proteico ottenuto viene quindi caricato su una colonna Ni-NTA, precedentemente equilibrata con tampone fosfato di potassio 50 mM pH 8.0 contenente NaCl 0.3M, e la sua eluizione viene monitorata a 280 nm. Il non legato viene eliminato mediante un lavaggio con 50 mL di equilibration buffer, seguito da ulteriori lavaggi da 50 mL di equilibration buffer con imidazolo 5 mM e 20 mM. L'eluizione della proteina di interesse è avvenuta mediante lavaggio della colonna con equilibration buffer contenente imidazolo 0.25 M. Le frazioni raccolte (1 mL) di cui è stata analizzata la concentrazione a 280nm e saggiata l'attività, sono state dializzate overnight contro tampone fosfato 10mM pH 7.0, in presenza di EDTA 0.1 mM e 2-mercaptoethanol 2 mM. In seguito alla dialisi i campioni sono stati centrifugati a 15000 RPM per 10 minuti, in modo da eliminare eventuali residui di imidazolo e i valori di concentrazione e attività sono stati nuovamente saggiati. In fine, la

proteina purificata è stata controllata su gel di acrilammide SDS/PAGE al 13.5%.

1.10 Estrazione del DNA

Il DNA plasmidico contenente la regione codificante per l'enzima di interesse è stato estratto dalle cellule utilizzando il NUCLEOSPIN PLASMID della Macherey-Nagel.

Il kit contiene al suo interno :

colonnine con membrana per il legame del DNA plasmidico (NucleoSpin® Plasmid QuickPureColumn);

provette da 2 ml per la raccolta del DNA plasmidico;

tampone di risospensione (Tampone A1);

tampone di lisi (Tampone A2);

tampone di neutralizzazione (Tampone A3);

tampone etanolico (Tampone A4);

tampone di lavaggio (Tampone AW);

tampone alcalino (Tampone AE: 5 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Un'aliquota contenente da 1 ml a 5 ml di terreno liquido LB e cellule viene centrifugata per 30 sec. a 11000 g; il pellet così ottenuto, contenente le cellule da cui si vuole estrarre il DNA, è risospeso in 250 µl di Tampone A1. A questa miscela si aggiungono 250 µl di Tampone A2, si agita lentamente e, dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 300 µl di Tampone A3 e si centrifuga per 5-10 minuti a temperatura ambiente. In questo modo le cellule sono state rotte e il lisato è stato chiarificato. A questo punto il soprannatante ottenuto viene trasferito nelle colonnine, NucleoSpin® Plasmid QuickPureColumn, che vengono inserite nelle provette da 2 ml per la raccolta del DNA, e si centrifuga per 1 minuto a 11000 g.

Successivamente, si effettuano dei lavaggi della colonna; il primo, facoltativo, si esegue centrifugando per 1 minuto a 11000 g in presenza di 500 µl di Tampone AW, il secondo, necessario, richiede l'aggiunta di 600 µl di Tampone A4, che permette di eliminare eventuali contaminanti presenti, quali sali o metaboliti; si centrifuga a 11000 g per 1 minuto. Per essere sicuri di pulire bene la membranina presente nelle colonne, si effettua, a questo punto, un'ulteriore centrifugata da 2 minuti a 11000 g.

Il DNA plasmidico può essere finalmente eluito aggiungendo 50 µl di Tampone AE e centrifugando per 1 minuto a 11000 g.

1.11 Quantizzazione del DNA

Il metodo maggiormente utilizzato per quantizzare il DNA si basa sulla lettura allo spettrofotometro della quantità di radiazioni ultraviolette assorbite dalle basi del campione di interesse.

Per la quantizzazione del DNA le letture dovrebbero essere seguite a 260 nm e a 280 nm. La lettura a 260 nm permette di calcolare la concentrazione di DNA nel campione in base alla formula seguente:

$$[\text{DNA}] = A_{260\text{nm}} \cdot \text{Fattore di diluizione} \cdot \mu\text{l DNA}$$

Il rapporto tra le lettura a 260 nm e quella a 280 nm ($OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$), dà una stima della purezza del DNA. Preparazioni di DNA pure mostrano un valore di tale rapporto compreso tra 1.8 e 2.0; nel caso di contaminazione tale rapporto risulta inferiore a quello sopraindicato.

1.12 Gel di Agarosio

Per separare, purificare e identificare frammenti di DNA viene utilizzato il metodo standard dell'elettroforesi su gel di Agarosio.

Il gel di Agarosio si ottiene sciogliendo Agarose 1% in EB (ottenuto per diluizione da EB 10 X).

Agarose 1%: 1 gr di Agarose in 100 ml di EB.

EB 10X : TRIS 43 gr/L

Na₂HPO₄ 40 gr/L

EDTA 1.85 gr/L

Una volta sciolto l'Agar si aggiungono 5 μl di Etidio-Bromuro (intercalante del DNA che permette di rivelarne la presenza) e si cola su supporto orizzontale.

In fine si prepara il campione da caricare aggiungendovi il colorante in un rapporto di 2:1.

Colorante: Blu di Bromofenolo 0.25%

Saccarosio 40%

Porto a volume desiderato con H₂O bidistillata.

La corsa viene seguita per circa 30 minuti a 60 V costanti.

1.13 Determinazione dell'attività enzimatica e analisi cinetiche allo stato stazionario

L'attività della **GST P1-1** e dei mutanti **Ile104Val**, **Ala113Val** e **Ile104Val/Ala113Val** è stata saggiata allo spettrofotometro seguendo il metodo descritto da Habig e Jacoby (1981). Appropriati volumi di enzima sono stati aggiunti ad una soluzione con volume finale di 1 ml contenente tampone fosfato di potassio 0.1 M pH 6.5, GSH 1 mM e CDNB 1 mM. La formazione del coniugato GSH-CDNB ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm ed a 25 °C, utilizzando uno spettrofotometro Cary 4000, dotato di dispositivo di termostatazione delle cuvette.

Tipicamente, per ogni dosaggio sono state utilizzate quantità di 1 μg di enzima. Per quanto riguarda le analisi cinetiche, esse sono state condotte andando ad analizzare l'effetto della variazione della concentrazione di GSH sull'attività enzimatica in presenza dei diversi

co-substrati (CDNB, NBD-Cl, EA), e l'effetto della variazione della concentrazione dei co-substrati stessi sull'attività.

La dipendenza della velocità enzimatica dalla concentrazione del CDNB è stata determinata utilizzando concentrazioni fisse di GSH (1 mM) e concentrazioni variabili di CDNB (0.1 mM-2 mM) in tampone fosfato 0.1 M, pH 6.5 e utilizzando 1 µg di enzima. Le letture sono state fatte a 340 nm e a 25°C. La dipendenza della velocità enzimatica dalla concentrazione di GSH è stata invece analizzata utilizzando concentrazioni fisse di CDNB (1 mM), in presenza di concentrazioni variabili di GSH (0.02 mM-1 mM).

Per quanto riguarda l'NBD-Cl, ($\epsilon = 14.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 419 nm), la dipendenza della velocità enzimatica dal co-substrato è stata saggiata misurando l'attività a concentrazioni fisse di GSH (0.5 mM) e concentrazioni variabili di NBD-Cl (0.0025 mM-0.5 mM) in tampone acetato di sodio 0.1 M pH 5.0 e utilizzando 5 µg di enzima. Le letture sono state fatte a 419 nm e a 25°C. La dipendenza della velocità enzimatica dal GSH è stata invece valutata mantenendo costante la concentrazione di NBD-Cl (0.2 mM) e variando quella di GSH (0.002 mM-0.5 mM).

Infine, la dipendenza della velocità enzimatica dall'Acido Etacrinico, ($\epsilon = 5.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 270 nm), è stata valutata, sia per la GST P1-1 che per i mutanti Ile104Val, Ala113Val e Ile104Val/Ala113Val, mantenendo costante la concentrazione di GSH (1 mM) e variando la concentrazione di EA (0.05 mM- 0.5 mM) in presenza di tampone fosfato 0.1 M, pH 6.5 e utilizzando 50 µg di proteina. Le letture sono state eseguite a 270 nm e a 25°C. La dipendenza della velocità enzimatica dal GSH, è stata quindi saggiata mantenendo costante la concentrazione di EA (0.5 mM) e variando quella di GSH (0.04 mM-1 mM).

Per la **GST sh** La dipendenza della velocità enzimatica dalla concentrazione del GSH è stata determinata utilizzando concentrazioni fisse di CDNB (1 mM) e concentrazioni variabili di GSH (0.05 mM-1 mM) in tampone fosfato 0.1 M, pH 6.5 e utilizzando 50 µg di enzima. Le letture sono state fatte a 340 nm e a 25°C.

1.14 Attività specifica

GST P1-1, I104V, A113V, I104V/A113V. L'attività specifica di questi enzimi è stata determinata con tre differenti cosubstrati (CDNB, NBD-Cl, EA) utilizzando uno spettrofotometro *Cary4000* a doppio raggio con dispositivo di termostatazione delle cuvette.

Per il CDNB le attività sono state eseguite a 25°C e a 340nm utilizzando 1µg di enzima, in presenza di tampone fosfato di potassio 0.1 M pH 6.5, GSH 1mM e CDNB 1mM ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm); per l'EA l'attività è stata monitorata a 270 nm e a 25°C utilizzando 50 µg di enzima, in presenza di tampone fosfato di potassio 0.1 M pH 6.5, GSH 1mM e EA 0.5 mM ($\epsilon = 5.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 270 nm); per l'NBD-Cl l'attività è stata monitorata a 419 nm e a 25°C utilizzando 5 µg di

enzima, in presenza di tampone acetato di sodio 0.1 M pH 5.0, GSH 0.5 mM e NBD-Cl 0.2 mM ($\epsilon = 14.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 419 nm);

Per quanto riguarda la **GST sh** l'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente utilizzando diversi cosubstrati (CDNB, EA, EPNP, Cu-OOH, NBD-Cl) in uno spettrofotometro *Cary4000*, dotato di sistema di termostatazione delle cuvette, usando 50 μg di enzima purificato.

Brevemente, le condizioni sperimentali utilizzate per il saggio dell'attività enzimatica sono le seguenti: 1) CDBN 1 mM in presenza di GSH 1 mM in tampone fosfato 0.1 mM, pH 6.5; la reazione è stata monitorata a 25°C e 340 nm ($\epsilon=9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Habig et al.,1974) 2) EA 0.5 mM in presenza di GSH 1 mM in tampone fosfato 0.1 M pH 6.5. ($\epsilon=5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), la reazione è stata monitorata a 25°C e 270 nm (Habig et al., 1974). 3) EPNP 0.5 mM in presenza di GSH 5 mM in tampone fosfato 0.1 mM pH 6.5; la reazione è stata monitorata a 37°C e 360 nm ($\epsilon= 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per 5 minuti. 4) l'attività perossidasi viene misurata osservando la riduzione di NADPH e si esegue a 37 °C e 340nm (Lawrence et al., 1976) in presenza di Cu-OOH 1.5 mM in presenza di GSH 1 mM and NADPH 0.2 mM in tampone fosfato 0.1 M pH 7.4 ($\epsilon= 6.22 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); prima di effettuare l'attività, la miscela contenente tampone fosfato 0.1M pH 7.4, GSH 1 mM, NADPH e GSH riduttasi, viene messa ad incubare per 5 minuti a 37°C. 5) NBD-Cl 0.2 mM in presenza di GSH 0.5 mM in acetato di sodio 0.1 M s pH 5.0; la reazione è stata monitorata a 25°C e 419 nm ($\epsilon= 14500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ricci et al 1994).

Per le **linee cellulari di prostata** l'attività enzimatica è stata determinata usando il CDBN come cosubstrato in uno spettrofotometro *Cary4000*, dotato di sistema di termostatazione delle cuvette. In particolare la condizione sperimentale usata è stata la seguente: CDBN 1 mM in presenza di GSH 1 mM in tampone fosfato 0.1 mM, pH 6.5; la reazione è stata monitorata a 25°C e 340 nm ($\epsilon=9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Habig et al.,1974).

1.15 Inibizione della GSTP1-1 wt e dei mutanti I104V, A113V e I104V/A113V con il clorambucile.

Tali studi sono stati condotti analizzando l'attività dell'enzima in presenza di tampone fosfato di potassio 0.1 M pH 6.5, GSH 1 mM, CDBN 1 mM, GSTP1-1 44nM, concentrazioni variabili di Clorambucile (0.1 μM -500 μM). L'attività è stata determinata a 25°C e a 340 nm. Il Clorambucile viene sciolto in etanolo.

1.16 Prove di termostabilità

La stabilità termica dei diversi enzimi è stata esaminata incubando aliquote di ciascun enzima, per 10 minuti a differenti temperature (da 10°C a 55°C), in tampone fosfato di potassio 10 mM, pH 7.0. E' stata

poi saggiata l'attività enzimatica in presenza di GSH 1 mM e CDNB 1 mM, come riportato in precedenza.

Per la **GST sh**, in seguito a incubazione alle diverse temperature e prima di determinarne l'attività enzimatica, la proteina è stata incubata per 10 minuti a 25°C, in presenza di GSH 0.1 mM e tampone fosfato 0.1 M pH 6.5.

1.17 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS Page)

Questa metodica è stata utilizzata seguendo il sistema di Laemmli (1970) e utilizzando l'apparecchiatura MINI-PROTEAN II della BIORAD. Viene preparato un gel composto da due parti: un "resolving gel" al 12% ed uno "stacking gel" al 4%.

La soluzione madre di acrilammide e bisacrilammide è stata preparata sciogliendo 30 gr di acrilammide e 0.8 gr di bisacrilammide in 100 ml di acqua bidistillata.

Viene prima preparato il "resolving gel", il quale è costituito da 4 ml della soluzione madre di acrilammide/bisacrilammide, 2.5 ml di Tris-HCl 1.5 M pH 8, 100 µl di una soluzione di SDS al 10%, 3.35 ml di acqua bidistillata, per arrivare ad un volume finale di 10 ml. Per ottenere la polimerizzazione del gel si aggiungono alla miscela 50 µl di ammonio persolfato al 10% e 5 µl di TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilediamina).

Successivamente viene preparato lo "stacking gel" formato da 1.33 ml della soluzione madre di acrilammide/bisacrilammide, 2.5 ml di Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 100 µl di una soluzione di SDS al 10%, 6.1 ml di acqua bidistillata per arrivare ad un volume finale di 10 ml, 50 µl di ammonio persolfato al 10% e 10 µl di TEMED.

Il tampone utilizzato per la corsa (RUNNING BUFFER 5X) è costituito da 15 gr/L di Tris 1 M, 72 gr/L di Glicina 1 M e 5 gr/L di SDS 1M; il pH viene portato ad 8.3 ed il tampone viene diluito 5 volte prima di essere utilizzato per la corsa elettroforetica.

I campioni proteici vengono diluiti 1:1 in sample buffer (3.8 ml di acqua bidistillata, 1.0 ml di Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 ml di glicerolo al 98%, 1.6 ml di SDS al 10%, 0.4 ml di 2-mercaptoetanol, 0.4 ml di blu di bromofenolo all'1%, fino ad arrivare ad un volume di 8 ml) e tenuti a 100°C per 10 minuti prima di essere caricati sul gel.

Come standard di pesi molecolari vengono utilizzati quelli della BIORAD, contenenti le seguenti proteine: Miosina (P.M.=207.000 Da), β-galattosidasi (P.M.=121.000 Da), Albumina sierica (P.M.=81.000 Da), Ovoalbumina (P.M.=51.200 Da), Anidrasi Carbonica (P.M.=33.600 Da), Inibitore della Tripsina (P.M.=28.600 Da), Lisozima (P.M.=21.100 Da) e Aprotinina (P.M.=7.500 Da).

La corsa viene seguita per circa 45 minuti ad un voltaggio costante pari a 200 Volts. Dopo la corsa il gel viene immerso per qualche ora in una soluzione di Blu Coomassie R 250 0.1%, sciolto in metanolo al 40% ed acido acetico al 10%. Terminata la colorazione del gel, l'eccesso di

colorante viene eliminato utilizzando una soluzione decolorante costituita da metanolo al 40% ed acido acetico al 10%.

1.18 Western Blotting

Il Western Blotting è un metodo che consente di trasferire le proteine da un gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) ad una membrana di nitrocellulosa (Trans-Blot della BIORAD) per adsorbimento. Questo trasferimento viene ottimizzato applicando una corrente di 100 mA per circa 12 ore.

A tale scopo vengono utilizzati due supporti di plastica su cui si poggiano due spugnette e due strati di carta assorbente dello stesso formato del supporto.

Il gel ottenuto mediante SDS-PAGE e la membrana su cui deve avvenire il trasferimento vengono inseriti tra i due strati di carta assorbente, facendo attenzione a porre la membrana di nitrocellulosa dalla parte del catodo, e vengono fatti aderire bene in modo da escludere eventuali bolle d'aria che potrebbero influenzare il trasferimento delle proteine sulla nitrocellulosa. Spugnette, carta, gel e membrana devono essere equilibrati per circa 15 minuti prima dell'uso con lo stesso tampone con cui si fa la corsa, il TRANSFER BUFFER, composto da Tris 25 mM, Glicina 192 mM e metanolo 20% (portato a pH 8.3). A trasferimento ultimato, la membrana viene utilizzata per la rivelazione, mentre il gel viene colorato con Blu Coomassie e poi decolorato per verificare che il trasferimento sia avvenuto. Una volta terminato il trasferimento, la membrana di nitrocellulosa viene lavata per due volte in TBS (Tris 20 mM e NaCl 500 mM) per 15 minuti; alla fine di questi lavaggi, viene lasciata un'ora in una soluzione contenente TBS più Albumina al 3%, in modo da saturare i siti aspecifici.

Successivamente, la membrana subisce due lavaggi di 15 minuti ciascuno, in TTBS (TBS e Tween-20 allo 0.1%). Nel frattempo si prepara il primo anticorpo, che può essere monoclonale o policlonale (come nel nostro caso), diluendolo in TBS e Albumina all'1%. La nitrocellulosa viene lasciata nella soluzione contenente l'anticorpo alla concentrazione ottimale, (che nel nostro caso era di 1:8000 per la determinazione della GST sh e 1:1000 per la determinazione dei vari isoenzimi della GST nelle cellule tumorali di prostata) per circa 1 ora.

Dopo l'incubazione con il primo anticorpo, la membrana viene sottoposta ad una serie di lavaggi in TTBS per poi essere messa in presenza del secondo anticorpo in grado di identificare il primo; l'anticorpo secondario deve essere un "antirabbit" se il primo anticorpo usato è un policlonale, o un "antimouse" se il primo è un monoclonale. Questo secondo anticorpo è stato diluito 1:40000 in TBS e Albumina all'1% e si tenuto per due ore, al termine delle quali la membrana ha subito altri quattro lavaggi di 15 minuti ciascuno, in TTBS. Soltanto alla fine di questi lavaggi è stato possibile rilevare la presenza delle bande corrispondenti alle proteine di interesse grazie ad un processo di chemiluminescenza (ECL Plus, Amersham).

1.19 Estrazione delle proteine solubili da *Synechocystis* sp. PCC 6803

Le cellule di *Synechocystis*, fatte crescere in presenza di luce UV a tempi diversi di incubazione: t0, t2h, t6h, t12h, t24h, t48h, 7gg e 7gg controllo, sono state rotte utilizzando la French Press, in dotazione presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS). In particolare il pellet, ottenuto mediante sonicazione dei campioni per 15 minuti a 5000 RPM, viene risospeso in Tris HCl 10mM pH8.0, EDTA 1mM, DTT 2mM e PMSF e fatto passare attraverso la French Press per 2 volte ad un livello di pressione e temperatura costanti. Successivamente le cellule rotte vengono sottoposte ad un primo ciclo di centrifugazione a 5000g per 20 minuti e ad un secondo ciclo da 100000g per 1h in modo da eliminare tutte le membrane e gli organelli cellulari. Al termine del secondo ciclo di centrifugazione il soprannatante viene messo overnight a -20°C in presenza di acetone 80%, in maniera tale da permettere la precipitazione delle proteine solubili. Il giorno successivo i campioni vengono ulteriormente centrifugati a 15000 RPM per 5 minuti e il pellet che ne deriva viene risospeso in tampone fosfato 10 mM pH 7.0.

Il campione così ottenuto può essere utilizzato per saggiarne la concentrazione proteica (mediante il metodo del Lowry) e per effettuare saggi di Western Blotting verso la proteina di interesse (GST sh) come precedentemente descritto.

1.20 Estrazione di DNA genomico da sangue intero

Campioni di sangue intero (5 ml) sono stati prelevati in provette contenenti EDTA e conservati a -80°C. Successivamente, il DNA è stato estratto dai leucociti (200 µl di sangue intero) utilizzando l'estrattore automatico MagNA Pure LC dotato di un computer. Tramite questo strumento si può isolare DNA genomico di 32 campioni in circa 90 min.

L'estrazione prevede l'utilizzo del MagNA Pure LC DNA Isolation Kit (fornito dalla Roche, Mannheim-Germany), costituito da:

- Wash Buffer 1, usato per rimuovere sostanze non legate come proteine (nucleasi), membrane cellulari, etc. e inibitori della PCR come eparina o emoglobina.
- Wash Buffer 2, necessario per ridurre la concentrazione di sali.
- Lysis/Binding Buffer, utilizzato per lisare le cellule, con conseguente rilascio di DNA, e per denaturare le proteine.
- Proteinasi K, per digerire le proteine cellulari.
- Soluzione di Magnetic Glass Particles (MGPs), per legare il DNA.
- Elution Buffer, per eluire 100 µl di DNA purificato.

La procedura di estrazione prevede diverse fasi:

- 1) **PREPARAZIONE DEI REAGENTI:** i vari reagenti vengono inseriti in appositi contenitori in plastica, secondo le informazioni fornite dal

protocollo “DNA I Blood cells High Performance” del software. Per 32 campioni vengono utilizzati 31.2 ml di Wash Buffer 1, 32.6 ml di Wash Buffer 2, 10.8 ml di Lysis/Binding Buffer, 4.2 ml di Proteinasi K (essendo liofilizzata, viene sciolta in 5 ml di Elution Buffer), 5.8 ml della soluzione MGP e 9.2 ml di Elution Buffer.

- 2) PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: 200 µl di sangue intero vengono trasferiti direttamente nel sample cartridge.
- 3) PREPARAZIONE DEL MagNA Pure LC: dopo aver selezionato il programma “DNA I Blood cells High Performance”, si compila al computer una lista dei campioni e delle loro posizioni sul sample cartridge.
- 4) ESTRAZIONE: dopo aver inserito nello strumento il sample cartridge, contenente i campioni di sangue intero, e i contenitori con i reagenti, viene iniziata la corsa che dura circa 90 minuti.

Alla fine della corsa, il DNA estratto viene conservato a 4°C.

Sul DNA estratto viene effettuata una **verifica qualitativa** per valutare l'eventuale presenza di DNasi. In breve: 200 ng di DNA sono stati diluiti 1:10 in T.E.1X (Tris 1M pH 8, Na₂EDTA 0.5M pH 8) e sono state fatte 2 aliquote: una è stata posta a 4°C e l'altra a 37°C per 30 minuti. E' stata quindi effettuata una elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (w/v) per entrambe le aliquote e, nel caso fossero state presenti delle DNasi, l'aliquota di DNA incubata a 37°C avrebbe presentato bande di degradazione sul gel.

Viene, inoltre, effettuata una **verifica quantitativa** mediante quantizzazione spettrofotometrica del DNA, come descritto precedentemente.

1.21 Genotipizzazione della GSTT1 e della GSTM1.

Tali analisi sono state eseguite contemporaneamente mediante un singolo saggio di PCR multiplex che prevede l'amplificazione dei geni GSTM1 e GSTT1 e della β-globina (gene house-keeping usato come controllo interno) a partire da DNA genomico.

Per il gene GSTM1 sono stati utilizzati i seguenti primers che amplificano una regione da 215 bp:

GSTM1 senso: 5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'
GSTM1 antisenso: 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'

Per il gene GSTT1 sono stati utilizzati i seguenti primers che amplificano una regione da 480 bp:

GSTT1 senso: 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3'
GSTT1 antisenso: 5' TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3'

Per il gene della β-globina sono stati utilizzati i seguenti primers che amplificano una regione da 268 bp:

β-globina senso: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'
β-globina antisenso: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

Per la reazione di PCR (Tab.6) abbiamo utilizzato 2,5 µl di Buffer 10X (contenente KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, Tris-HCl 100 mM), 2,5 µl di dNTPs, 2 mM, 0,1 µl di primer senso e 0,1 µl di primer antisenso entrambi 10 pmol/µl, 0,4 µl di Taq DNA Polymerase Amersham Pharmacia Biotech (5U/µl), 200 ng di DNA e H₂O in un volume finale di 25 µl.

Le condizioni di amplificazione prevedono una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione composti da una denaturazione a 94°C per 1 minuto, un annealing a 58°C per 45 secondi e un'estensione a 72°C per 1 minuto, seguita da un'ulteriore estensione finale a 72°C per 7 minuti.

La verifica dell'amplificazione dei tre geni viene eseguita tramite corsa elettroforetica per 50 minuti a 100V su gel di agarosio al 2,5% (w/v), contenente bromuro di etidio (0,5 mg/ml), caricando 10 µl di PCR + 2 µl di xylene cyanol 6X e usando 8 µl di marker pUC 18 DNA Msp I Digest.

Tabella 6. Parametri PCR

STEP	TEMPERATURA °C	DURATA	N°CICLI
1°	94	5'	1
2°	94 58 72	1' 45'' 1'	35
3°	72	7'	1

1.22 Coltura delle linee cellulari di prostata e calcolo della loro attività specifica

Le linee cellulari utilizzate (cellule tumorali prostatiche umane, LNCaP, linee cellulari immortalizzate prelevate da pazienti sottoposti a prostatectomia e suddivise, sulla base del pattern di espressione genica in due gruppi, G1 e G2, corrispondenti, rispettivamente ad una prognosi migliore e peggiore del paziente) (Nanni *et al.*, 2006) sono state fatte crescere in terreno IMDM con supplemento di BSA al 10% (Invitrogen), arricchito con L glutammina 200 mM e in presenza degli antibiotici Pen/Strep. Raggiunta la confluenza necessaria

(80%-90%) le cellule vengono contate utilizzando l'apposita camera di conta e, successivamente, staccate dalla dish utilizzando tripsina (Invitrogen); a questo punto la tripsina viene neutralizzata con l'aggiunta di 4 volumi di terreno e le cellule raccolte e centrifugate a 1200 RPM per 5 minuti.

Il pellet può quindi essere conservato a -80°C oppure utilizzato per gli esperimenti successivi.

Il pellet, tipicamente contenente 4×10^6 cellule, viene risospeso in 150 μl di Tris HCl 10 mM pH 7.4 in presenza di EDTA 0.1 M e PMSF 0.1 mM e sottoposto a 3 cicli di sonicazione da 5 secondi ciascuno. Le cellule lisate vengono quindi sonicate a 13000 RPM per 30 minuti e l'estratto, di cui viene calcolata la concentrazione proteica usando il metodo Bradford, può essere utilizzato per il calcolo dell'attività specifica delle diverse linee cellulari e per il saggio del Western Blotting.

L'attività specifica è stata definita sulla base dei valori di $\Delta A/\text{min}$ calcolati a 25°C e a 340 nm in tampone fosfato 0.1 M pH 6.5, in presenza di GSH 1mM e CDNB 1mM.

Il Western Blotting è stato eseguito, utilizzando la metodica precedentemente descritta, verso diverse forme di GST: GSTP1-1, GSTM2-2, GSTA1-1 e GSTT1-1 al fine di evidenziare non solo la scomparsa della GSTP1-1 ma anche l'eventuale fenomeno di bilanciamento da parte di un'altra delle principali GST citosoliche.

Il gel di poliacrilammide viene preparato al 12% e vengono caricati 30 γ di estratto per ciascuna linea cellulare e 3 γ di proteina purificata. Gli anticorpi usati, per ciascuna delle GST analizzate, erano concentrati 1:1000 per quanto riguarda l'anticorpo primario e 1:40000 per il secondario.

BIBLIOGRAFIA

Abdalla, A., Brums, C. M., Tainer, J. A., Mannervik, B. & Stenberg, G. (2002) Design of a monomeric human glutathione transferase GSTP1, a structurally stable but catalytically inactive protein. *Prot. Engin.* **15**, 827-834.

Ali-Osman F., Akande O., Antoun G., Mao J. X., Buolamwini J. (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* **272**, 10004-12.

Allan J. M., Wild C. P., Rollinson S., Willett E. V., Moorman A. V., Dovey G. J., Roddam P. L., Roman E., Cartwright R. A. & Morgan G. J. (2001). Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukaemia. *PNAS.* **98**, 11592-11597.

Alves, S., Amorim, A., Ferreira, F., Norton, L., Prata, M.J.,(2002). The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* **100**, 67-71.

Ambrosone C. B., Sweeney C., Coles B. F., Thompson P. A., McClure G. Y., Korourin S., et al. (2001). Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 7130-7135.

Anderer G., Schrappe M., Brechlin A. M., Lauten M., Muti P., Welte K., et al. (2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics.* **10**, 715-726.

Armstrong R. N. (1991). Glutathione S-transferase: reaction, mechanism, structure and function. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 131-140.

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

Ashley, D.L., Bonin, M.A., Cardinali, F.L., McCraw, J.M., Wooten, J.V., (1994). Blood concentrations of volatile organic compounds in a nonoccupationally exposed US population and in groups with suspected exposure. *Clin. Chem.* **40**, 1401-1404.

Bell DA, Taylor J, Paulson DF et al. (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1159-1164.

Best, N., Cockings, S., Bennett, J., Wakefield, J., Elliott, P., (2001). Ecological regression analysis of environmental benzene exposure and childhood leukaemia: sensitivity to data inaccuracies, geographical scale and ecological bias. *J. R. Stat. Soc.: Ser. A* **164**, 155-174.

Blackburn A. C., Tzeng H.-F., Anders M. W. & Board P. G. (1999). Activity of four allelic forms of human glutathione S-transferase Zeta: GSTZ1a-1a possesses higher activity towards dichloroacetic acid. *ISSX*. Abstract.

Board P. G. (1981). Gene deletion and partial deficiency of the glutathione S-transferase (ligandin) system in man. *FEBS Lett.* **135**, 12-14.

Board P. G., Baker R. T., Chelvanayagam G. & Jermiin L. S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* **328**, 929-935.

Board P. G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermiin L. S., Schulte G. K., Danley D. E., Hoth L. R., Griffor M. C., Kamath A. V., Rosner M. H., Chrnyk B. A., Perregaux D., Gabel C. A., Geoghegan K. F. & Pandit J. (2000). Identification, Characterization and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferase. *J. Biol. Chem.* **275**, 24798-24806.

Bolufer, P., Barragan, E., Collado, M., Cervera, J., Lopez, J.-A., Sanz, M.A., (2006). Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk. Res.* **30**, 1471-1491.

Bostwick D.G. and Brawer M.K. (1987). Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* **59**, 788-794.

Bratton, S.B., Lau, S.S., Monks, T.J., (2000). The putative benzene metabolite 2,3, 5-tris(glutathion-S-yl)hydroquinone depletes glutathione, stimulates sphingomyelin turnover, and induces apoptosis in HL-60 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 550-556.

Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun TH, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson PJ, Morgenstern R. (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* **272**(7):1688-703.

Brooks JD, WeinsteinM, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG.(1998) CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;7:531-536.

Brusamolino E., Anselmo A. P., Klersy C., Santoro M., Orlandi E., Pagnucco G., Lunghi F., Maurizi-Enrici R., Baroni C. D., Lazzarino M., Mandelli F., Bernasconi C. (1998). The risk of acute leukemia in patients treated for Hodgkin's disease is significantly higher aft [see bined modality programs than after chemotherapy alone and is correlated with the extent of radiotherapy and type and duration of chemotherapy: a case-control study. *Haematologica.* **83**, 812-2.

Bryant, D. A., in: Platt, T., Li, W. K. W.(1986) (Eds.), The Cyanobacterial Photosynthetic Apparatus, *Department of Fisheries and Oceans, Ottawa*, pp. 423-500.

Butkiewicz D, Grzybowska E, Phillips DH et al. (2000) Polymorphisms of the GSTP1 and GSTM1 genes and PAH-DNA adducts in human mononuclear white blood cells. *Envir. And Mol. Mutag.* **35**, 99-105.

Caccuri A. M., Ascenzi P., Lobello M., Federici G., Battistoni A., Mazzetti P., Ricci G. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **200**, 1428-1434.

Caccuri A.M., Ascenzi P., Antonini G., Parker M.W., Oakley A.J., Chiessi E., Nuccetelli M., Battistoni A., Bellizia A. & Ricci G. (1996). Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 16193-16198.

Caccuri AM, Antonini G, Allocati N, Di Ilio C, De Maria F, et al. (2002). GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*. A snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 18777-84.

Chanvaivit, S., Navasumrit, P., Hunsonti, P., Autrup, H., Ruchirawat, M., (2007). Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. *Mutat. Res.* **626**, 79-87.

Chen, Y., Li, G., Yin, S., Xu, J., Ji, Z., Xiu, X., Liu, L., Ma, D., (2007). Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed population. *Xenobiotica* **27**, 103-112.

Ciaccio, P. J., Tew, K. D. & LaCreta, F. P. (1990). The spontaneous and glutathione S-transferase-mediated reaction of chlorambucil with glutathione. *Cancer Commun.* **2**, 279-285.

Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P (1998) Structure and organization of the human-theta class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem. J.* **334**, 617-623.

Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A., (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 67-101.

Diamandidou E., Buzdar A. U., Smith T. L., Frye D., Witjaksono M., Hortobagyi G. N. (1996). Treatment-related leukemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol.* **14**, 2722-30.

Dirr H., Reinemer P., Huber R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem.* **220**, 645-61.

Doroshov JH, Metz MZ, Matsumoto L, Winters KA, Sakai M, Muramatsu M, Kane SE.(1995) Transduction of NIH 3T3 cells with a retrovirus carrying both human MDR1 and glutathione S-transferase pi produces broad-range multidrug resistance. *Cancer Res*; **55**:4073-4078.

Dougherty D, Garte S, Barchowsky A, Zmuda J, Taioli E. (2008). NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure--a literature review. *Toxicol Lett.* ;**182**(1-3):7-17.

Droog, F. N. J., Hooykaas, P. J. J., Libbenga, K. R. & van der Zaal, E. J. (1993). Proteins encoded by an auxin regulated gene family of tobacco share limited but significant homology with glutathione S-transferases and one member indeed shows in vitro GST activity. *Plant Mol. Biol.* **21**, 965-972.

Eaton DL, Bammler TK.(1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* ;49:156–164.

Edwards R., Dixon D. P. (2004). Metabolism of natural and xenobiotics substrates by plant glutathione s-transferase superfamily. In *Molecular Ecotoxicology of Plants*, ed. H Sandermann, Ecological Studies **170**, 17-50.

Edwards, R., Dixon, D. P. and Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases : enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193-198.

Erexson, G.L., Wilmer, J.L., Kligerman, A.D., (1985). Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites in vitro. *Cancer Res.* **45**, 2471–2477.

European Union, (1997). Council Directive 97/42/EC of 27 June 1997 amending for the first time Directive 90/394/EEC on protecting workers from risks related to exposure to carcinogens at work Sixth individual directive according to Art of Directive 89/391/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* 16(1), L179.

Fahey RC & Sundquist AR (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* **64**, 1–53.

Fisher B., Rockette H., Fisher E. R., Wickerham D. L., Redmond C., Brown A. (1985). Leukemia in breast cancer patients following adjuvant chemotherapy or postoperative radiation: the NSABP experience. *J Clin Oncol.* **3**, 1640-58.

Foon, K. A., Rai, K. R. & Gale, R. P. (1990). Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Ann. Intern. Med.* **113**, 525–539.

Foster C.S., Cornford P., Forsyth L., Djamgoz M.B.A. and Ke Y. (1999). The cellular and molecular basis of prostate carcinoma. *Br. J. Urol.* **83**, 171-194.

Fustinoni, S., Consonni, D., Campo, L., Buratti, M., Colombi, A., Pesatori, A.C., Bonzini, M., Bertazzi, P.A., Foà, V., Garte, S., Farmer, P.B., Levy, L.S., Pala, M., Valerio, F., Fontana, V., Desideri, A., Merlo, D.F., (2005). Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers influence of cigarette smoking and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 2237–2244.

Gombos, Z., Wada, H., Murata, N., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9959–9963.

Goto S., Iida T., Cho S., Oka M., Kohno S., Kondo T. (1999). Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res.* **31**, 549-58.

Gottesman M. M. & Pastan I. (1993). Biochemistry of multidrug-resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385 – 427.

Greene M. H., Harris E. L., Gershenson D. M., Malkasian G. D. Jr, Melton L. J. 3rd, Dembo A. J., Bennett J. M., Moloney W. C., Boice J. D. Jr. (1986). Melphalan may be a more potent leukemogen than cyclophosphamide. *Ann Intern Med.* **105**, 360-7.

Guengerich F. P. (1990). Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 97-153.

Guengerich F. P., Their R., Persmark M., Taylor J. B., Pemble S. E. & Ketterer B. (1995). Conjugation of carcinogens by Θ class glutathione S-transferases: mechanism and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics.* **5**, 103-107.

Habig W. H. and Jakoby W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* **77**, 398-405.

Habig, W.H., Pabst, M. T. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.

Hagemann, M., Woelfel, L., Kruger, B., (1990) *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1393–1399.

Hallier E, Langhof T, Dannappel D et al. (1993) Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch. Toxicol.* **67**, 173-178.

Harries L. W., Stubbins M. J., Forman D., Howard G. C. W. & Wolf C. R. (1997). Identification of genetic polymorphism at the GSTP1 locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis.* **18**, 641-644.

Hayes J. D., Kerr L. A. & Cronshaw A. D. (1989). Evidence that glutathione S-transferases B₁B₁ and B₂B₂ are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. Molecular relationship between the B₁ and B₂ subunits and other Alpha class glutathione S-transferases. *Biochem. J.* **264**, 437-445.

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

Hayes J. D. & Strange R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* **61**, 154-166.

Hayes J. D., Flanagan J. U. & Jowsey I. R. (2005). Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51-88.

Heagerty AHM, Fitzgerald D, Smith A et al. (1994) Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumors. *Lancet* **343**, 266-268.

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H (1993) The GSTM1 genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* **14**, 1479-1481.

Horton, J. K., Roy, G., Piper, J. T., van Houten, B., Awasthi, Y. C., Mitra, S. et al. (1999). Characterization of a chlorambucil-resistant human ovarian carcinoma cell line overexpressing glutathione S-transferase m. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 693-702.

Hu X., Ji X., Srivastava S. K., Xia H., Awasthi S., Nanduri B., Awasthi Y. C., Zimniak P., Singh S. V.. (1997). Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch Biochem Biophys.* **345**, 32-8.

Hu X., Pal A., Krzeminski J., Amin S., Awasthi Y. C., Zimniak P. & Singh S. V. (1998). Specificities of human glutathione S-transferase isozymes toward anti-diol epoxides of methylchrysenes. *Carcinogenesis*. **19**, 1685-1689.

Hu X., Xia H., Srivastava S. K., Herzog C., Awasthi Y. C., Ji X., Zimniak P., Singh S. V. (1997). Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun.* **238**, 397-402.

Johansson, A. S., Stenberg, G., Widersten, M. & Mannervik, B. (1998). Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J. Mol. Biol.* **278**, 687-698.

Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C et al. (1999) Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int. J. Cancer*. **81**, 44-48.

Kaldor J. M., Day N. E., Clarke E. A., Van Leeuwen F. E., Henry-Amar M., Fiorentino M. V., Bell J., Pedersen D., Band P., Assouline D., et al. (1990). Leukemia following Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. **322**, 7-13.

Kano T., Sakai M., and Muramatsu M. (1987) Structure and expression of a human class π glutathione S-transferase messenger RNA. *Cancer Research*. **47**, 5626-5630.

Kavallaris M. (1997). The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anticancer Drug* **8**, 17-25.

Kempkes M, Wiebel FA, Golka K, Heitmann P, Bolt HM (1996) Comparative genotyping and phenotyping of glutathione S-transferase GSTT1-1. *Arch. Toxicol*. **70**, 306-309.

Ketterer B., Meyer D. J., Taylor J. B., Pemble S., Coles B. & Frase G. (1990). GSTs and protection against oxidative stress. In *Glutathione S-Transferase and Drug Resistance*, Hayes, J. D., Mantle, T. J., Pickett, C. B. (eds), Taylor and Francis, Bristol, 97-109.

Kim, S.Y., Choi, J.K., Cho, Y.H., Chung, E.J., Paek, D., Chung, H.W., (2004). Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* **14**, 453-463.

Klaassen C. D. (1996). Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, 5th edition, McGraw-Hill, New York.

Kong K. H., Inoue, H. & Takahashi K. (1993). Site-directed mutagenesis study on the roles of evolutionally conserved aspartic acid residues in human glutathione S-transferase P1-1. *Protein Engineering* **6**, 93-99.

Kuga T., Sakamaki S., Matsunaga T., Hirayama Y., Kuroda H., Takahashi Y., Kusakabe T., Kato I., Niitsu Y. (1997). Fibronectin fragment-facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase pi gene into CD34+ cells to protect them against alkylating agents. *Hum Gene Ther*. **8**, 1901-10.

Lammie G. A., Peters G. (1991). Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells*. **3**, 413-20.

Landi S (2000) Mammalian class Theta GST and differential susceptibility to carcinogens. *Mut. Res*. **463**, 247-283.

Landis S.H., Murray T., Golden S. and Wingo P.A. (1999). Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J. Clin*. **49**, 8-31.

Lawrence R. A., Parkhill L. K., Burk R. F. (1976). *J. Nutr*. 981-987.

Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG.(1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*;91:11733–11737.

Li M, Ittmann MM, Rowley DR, Knowlton AA, Vaid AK, Epner DE (2003) Glutathione S-transferase pi is upregulated in the stromal compartment of hormone independent prostate cancer. *Prostate*. 56(2):98-105.

Listowsky I. (1993). High capacity binding by glutathione s-transferase and glucocorticoid resistance. In *Structure and Function of Glutathione Transferase*, Tew, K. D., Pickett, C. B., Mantle, T. J., Mannervik, B. & Hayes, J. D. (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, 199-209.

Litwack G., Ketterer B. & Arias I. M. (1971). Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234, 446-467.

Lo Bello M., Oakley A. J., Battistoni A., Mazzetti A. P., Nuccetelli M., Mazzaresse G., Rossjohn J., Parker M. W. & Ricci G. (1997). Multifunctional role of Tyr 108 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1. Crystallographic and kinetic studies on the Y108F mutant enzyme. *Biochemistry* 36, 6207-6218.

Lo Bello, M., Oakley, A. J., Battistoni, A., Mazzetti, A. P., Nuccetelli, M., Mazzaresse, G. et al. (1997). Multifunctional role of Tyr 108 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1. Crystallographic and kinetic studies on the Y108F mutant enzyme. *Biochemistry*, 36, 6207–6217.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Lyttle M. H., Satyan A., Hocker M. D., Bauer K. E., Caldwell C. G., et al. (1994) Glutathione S-transferase activates novel alkylating agents. *J. Med. Chem.* 37, 1501-1507.

Mannervik B. & Danielson U. H. (1988). Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.

Mannervik B. (1986) *Chem. Scripta* 26, 281-284.

Mannervik B., Ålin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M. K., Warholm M. & Jornvall H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7202-720.

Mannervik B., Board P. G., Hayes D. J., Listowsky I. & Pearson W. R. (2005). Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Meth. Enzym.* 401, 1-8.

Mannervik B., Guthenberg C., Jakobson I. & Warholm M. (1978). Glutathione conjugation: reaction mechanism of glutathione S-transferase A. In *Conjugation Reactions in Drug Biotransformation* (Aitio, A., ed.), pp. 101-110, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Marnett L. J. (1994). Generations of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer and Metastasis Review* **13**, 303-308.

Marrs, K. (1996). The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Olan Mol. Biol.* **47**, 127-158.

Matsunaga T., Sakamaki S., Kuga T., Kuroda H., Kusakabe T., Akiyama T., Konuma Y., Hirayama Y., Kobune M., Kato J., Sasaki K., Kogawa K., Koyama R., Niitsu Y. (2000). GST-pi gene-transduced hematopoietic progenitor cell transplantation overcomes the bone marrow toxicity of cyclophosphamide in mice. *Hum Gene Ther.* **11**, 1671-81.

Maugard C. M., Charrier J., Pitard A., Campion L., Akande O., Pleasants L., Ali-Osman F. (2001). Genetic polymorphism at the glutathione S-transferase (GST) P1 locus is a breast cancer risk modifier. *Int J Cancer.* **91**, 334-9.

Mc Williams JE, Sanderson BJS, Harris EL et al. (1995) Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4**, 589-594.

Meyer D. J. & Thomas M. (1995). Characterization of a ratspleen prostaglandin-H D-isomerase as a sigma class GSH transferase. *Biochem. J.* **311**, 739-742.

Meyer D. J., Coles B., Pemble S. E., Gilmore K. S., Fraser G. M. & Ketterer B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferase from rat and man. *Biochem. J.* **274**, 409-414.

Meyer D. J., Muimo R., Thomas M., Coates D. & Isaac R. E. (1996). Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma class glutathione S-transferase from *Ascaridia galli*. *Biochem. J.* **313**, 223-227.

Micaloni C., Mazzetti A. P., Nuccetelli M., Rossjohn J., McKinstry W. J. Antonimi G., Caccuri A. M., Oakley A. J., Federici G., Ricci G., Parker M. W. & Lo Bello M. (2000). Valine 10 may act as a driver for product release from the active site of human glutathione transferase P1-1. *Biochemistry* **39**, 15961-15970.

Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. (1999). Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*; **18**:1313-1324.

Moskaluk CA, Duray PH, Cowan KH, Linehan M, Merino MJ. (1997) Immunohistochemical expression of pi-class glutathione S-transferase is down-regulated in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*; **79**:1595-1599.

Murray GI, Taylor VE, McKay JA, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD.(1995) The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *J Pathol*; **177**:147–152.

Nair UJ, Nair J, Mathew B, Bartsch H (1999) Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis* **20**, 743-748.

Nakamura, Y., Kaneko, T., Hirosawa, M., Miyajima, N., Tabata, S.,(1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 63–67.

Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and Ah gene battery in the oxidative stressresponse, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65–85.

Nelson H, Wiencke JK, Christiani DC et al. (1995) Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* **16**, 1243-1245.

Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., Bieseler, B. (1997). Crystal Structure of Herbicide-detoxifying Maize Glutathione S-transferase-I in Complex with Lactoylglutathione: Evidence for an Induced-fit Mechanism. *J. Mol. Biol.* **274**, 446-453.

Niitsu Y., Takahashi Y., Ban N., Takayama T., Saito T., Katahira T., Umetsu Y., Nakajima T., Ohi M., Kuga T., Sakamaki S., Matsunaga T., Hirayama Y., Kuroda H., Homma H., Kato J., Kogawa K. (1998). A proof of glutathione S-transferase-pi-related multidrug resistance by transfer of antisense gene to cancer cells and sense gene to bone marrow stem cell. *Chem Biol Interact.* **111-112**,325-32.

Nishida, M., Harada, S., Satow, Y., Inoue, H. & Takahashi, K. (1996). Crystallization and X-ray diffraction studies of glutathione S-transferase from Escherichia coli. *J. Crystal Growth*, **168**, 284-287.

Nishihira J., Ishibashi T., Sakai M., Nishi S. & Kumazaki T. (1992). Evidence for the involvement of tryptophan 38 in the active site of glutathione S-transferase P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 1069-1077.

Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, Andrews PA, Trock BJ, Rasmussen AA, Montgomery EA, Bischoff EK, Hanigan MH Cullen KJ. (1998) Association between expression of glutathioneassociated enzymes and response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Chem Biol Interact*;**111–112**: 187–198.

Oakley, A. J., Lo Bello, M., Battistoni, A., Ricci, G., Rossjohn, J., Villar, H. O. & Parker, M. W. (1997). The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution. *J. Mol. Biol.* **274**, 84–100.

Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de Torres I.(2006) Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol.* **21**(8):857-65.

- Pandya U., Srivastava S. K., Singhal S. S., Pal A., Awasthi S., Zimniak P. et al. (2000). Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 258-262.
- Parker, L. J., Ciccone, S., Italiano, L., Primavera, A., Oakley, A. J., Morton, C. J., Hancock, N. C., Lo Bello, M., Parker, M. W. (2008). The Anti-cancer Drug Chlorambucil as a Substrate for the Human Polymorphic Enzyme Glutathione Transferase P1-1: Kinetic Properties and Crystallographic Characterisation of Allelic Variants". *J Mol Biol.* **380**:131-144.
- Pemble S., Schroeder K. R., Spencer S. R., Meyer D. J., Hallier E., Bolt K. M., Ketterer B. & Taylor J. B. (1994). Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* **300**, 271-276.
- Perera F. P. (1996). Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 496-509.
- Peschek, G.A., Obinger, C. and Paumann M. (2004). *Physiol Plant* **120**, 358-369.
- Peters WH, Nagengast FM, Wobbes T.(1989). Glutathione S-transferases in normal and cancerous human colon tissue. *Carcinogenesis*; **10**:2371–2374.
- Pickett C. B. and Lu A. Y. H. (1989). Glutathione S-transferase: gene, structure, regulation and biological function. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 743-764.
- Piredda L., Farrace M.G., Lo Bello M., Marloni W., Melino G., Petruzzelli R. & Piacentini M. (1999) Identification of "tissue" transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.* **13**, 355-364.
- Pisareva T, Shumskaya M, Maddalo G, Ilag L, Norling B. (2007) Proteomics of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Identification of novel integral plasma membrane proteins. *FEBS J.* **274**(3):791-804.
- Rebbeck T. R. (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**, 733-743.
- Rhoads D. M., Zarlengo R. P. & Tu C.-P. D. (1987). The basic glutathione S-transferases from human livers are products of separate genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 474-481.
- Ricci, G., Caccuri, A. M., Lo Bello, M., Pastore, A., Piemonte, F. & Federici, G. (1994). Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal. Biochem.* **218**, 463–465.

Ricci, G., Caccuri, A. M., Lo Bello, M., Rosato, N., Mei, G., Nicotra, M. et al. (1996). Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Role of helix 2 flexibility in the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **271**, 16187–16192.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., (1979) *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1–61.

Röhrdanz E., Nguyen T., Pickett C. B. (1992). Isolation and characterization of the human glutathione S-transferase A2 subunit gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 747-752.

Ross, D., (1996). Metabolic basis of benzene toxicity. *Eur. J. Haematol.* **57**, 111–118.

Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D., (2000). NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem. Biol. Interact.* **129**, 77–97.

Rothman, N., Hoover, R.N., Linet, R.N., (1997). Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine—National Cancer Institute Benzene Study Group. *JNCI* **89**, 1065–1071.

S.M., Shen, M., Alter, B.P., Wu, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., Chanock, S., Hayes, R.B., Linet, M., Kim, S., Yin, S., Rothman, N., Smith, M.T., (2004). Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* **306**, 1774–1776.

Saint-Ruf C., Malfoy B., Scholl S., Zafrani B., Dutrillaux B. (1991). GST pi gene is frequently coamplified with INT2 and HSTF1 proto-oncogenes in human breast cancers. *Oncogene*. **6**, 403-6.

Seaton, M.J., Schlosser, P.M., Bon, J.A., Medinsky, M.A., (1994). Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity. *Carcinogenesis* **15**, 1799–1806.

Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 7293-7297.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M. & Dowd C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1-16.

Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD (1997) Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GSTT1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem. J.* **326**, 837-846.

Shi M, Myrand SP, Bleavins MR, de la Iglesias FA (1999) High-throughput genotyping method for glutathione S-transferase T1 and M1 gene deletion using TaqMan probes. *Res. Com. Mol. Path. And Pharma.* Vol. **103**, No. 1.

Simon W.J., Hall J.J., Suzuki I, Murata N., Slabas A.R. (2002), *Proteomics* **2**, 1735-1742.

Slabas AR, Suzuki I, Murata N, Simon WJ, Hall JJ. (2006) Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *Proteomics.* **6**(3):845-64.

Snyder, R., Witz, G., Goldstein, B.D., (1993). The toxicology of benzene. *Environ. Health Perspect.*, **100**, 293–306.

Sommer, A. and Boger, P. (1999) Characterization of recombinant corn glutathione S transferase isoforms I, II, III and IV. *Pestic. Biochem. Physiol.* **63**, 127-138.

Sorhan, T., Kinlen, L.J., Doll, R., (2005). Cancer risks in a historical UK cohort of benzene exposed workers. *Occup. Environ. Med.* **62**, 231–236.

Sorsa M, Osterman-Golkar S, Peltonen K et al. (1996) Assessment of exposure to butadiene in the process industry. *Toxicology* **113**, 77-83.

Sprenger, R., Schlagenhauer, R., Kerb, R., Bruhn, C., Brockmoller, J., Roots, I., (2000). Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* **10**, 557–565.

Srivastava S. K., Singhal S. S., Hu X., Awasthi Y. C., Zimniak P. & Singh S. V. (1999). Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 89-94.

Stoehlmacher J., Park D. J., Zhang W., Groshen S., Tsao-Wei D. D., Yu M. C., Lenz H. J. (2002). Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* **94**, 936-42.

Strange R. C. & Fryer A. A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on susceptibility to cancer; in Boffetta P., Caporaso N., Cuzick J., Lang M. & Vineis P. (eds). *Metabolic polymorphisms and cancer*. Lyon, *IARC scientific publication.* **148**, 231-249.

Sullivan GF, Amenta PS, Villanueva JD, Alvarez CJ, Yang JM, Hait WN.(1998) The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res*; **4**:1393–1403.

Suzuki, I., Kanasaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M., Murata, N.,(2001) *Mol. Microbiol.*, **40**, 235–244.

Sweeney C., McClure G. Y., Fares M. Y., Stone A., Coles B. F., Thompson P. A. et al. (2000). Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res.* **60**, 5621-5624.

Tew K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* **54**, 4313-20.

Tew, K. D., Dutta, S. & Schultz, M. (1997). Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **26**, 91–104.

Their R, Wiebel FA, Hinkel A et al. (1998) Species differences in the glutathione transferase GSTT1-1 activity towards the model substrate methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney. *Arch. Toxicol.* **72**, 622-629.

Travis L. B., Andersson M., Gospodarowicz M., van Leeuwen F. E., Bergfeldt K., Lynch C. F., Curtis R. E., Kohler B. A., Wiklund T., Storm H., Holowaty E., Hall P., Pukkala E., Sleijfer D. T., Clarke E. A., Boice J. D. Jr, Stovall M., Gilbert E. (2000). Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 1165-71.

Travis L. B., Curtis R. E., Boice J. D. Jr, Platz C. E., Hankey B. F., Fraumeni J. F. Jr. (1996). Second malignant neoplasms among long-term survivors of ovarian cancer. *Cancer Res.* **56**, 1564-70.

Travis L. B., Holowaty E. J., Bergfeldt K., Lynch C. F., Kohler B. A., Wiklund T., Curtis R. E., Hall P., Andersson M., Pukkala E., Sturgeon J, Stovall M. (1999). Risk of leukemia after platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med.* **340**, 351-7.

Trush M. A. & Kensler T. W. (1991). An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **10**, 201-209.

Tsuchida S, Sato K.(1992). Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*;27:337–384.

Vargo M. A., Nguyen L. & Colman R. F. (2004). Subunit Interface Residues of Glutathione S-Transferase A 1-1 that Are Important in the Monomer-Dimer Equilibrium. *Biochem.* **43**, 3327-3335.

Verdina, A., Galati, R., Galasca, G., (2001). Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A* **64**, 607–618.

Verma, D.K., Tombe, K.D., (1999). Measurement of benzene in the workplace and its evolution process. Part I. Overview, history, and past methods. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **60**, 38–47.

- Vuilleumier S (1997) Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol* **179**, 1431–1441.
- Warholm M, Alexandrie AK, Rannug A et al. (2002) Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Pharmacogenetics* **12**, 613-619.
- Wasserman TH, Slavik M, Carter SK (1975) Clinical comparison of the nitrosoureas. *Cancer* **36**, 1258-1268.
- Watson M. A., Stewart R. K., Smith G. B., Massey T. E., Bell D. A. (1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. **19**, 275-80.
- Webb G, Vaska V, Coggan M, Board P (1996) Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1-1). *Genomics* **33**, 121-123.
- Weber GF, Waxman DJ (1993) Denitrosation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalysed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 369-378.
- Weisel, C., Yu, R., Roy, A., Georgopoulos, P., (1996). Biomarkers of environmental benzene exposure. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1141–1146.
- WHO, (1993). WHO Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment Concepts and Principles. ICPS, Geneva.
- Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B (1991) Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochem. J.* **276**, 519-524.
- Widersten M., Kolm R. H., Bjornstedt R. & Mannervik B. (1992). Contribution of five amino acid residues in the glutathione binding site to the function of human glutathione transferase P1-1., *Biochem. J.* **285**, 377-381.
- Wilce M. C., Parker M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta.* **1205**, 1-18.
- Xu S., Wang Y. & Pearson W. R. (1998). Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J. Biol. Chem.* **273**, 3517-3527.
- Yager, J.W., Eastmond, D.A., Robertson, M.L., Paradisin, W.M., Smith, M.T., (1990). Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.* **50**, 393–399.
- Yarbro J. W.(1996) .The scientific basis of cancer chemotherapy. In: Perry, M. C., ed. *The chemotherapy source book*. Baltimore: Williams & Wilkins; 3-18.

Yin, S.N., Hayes, R.B., Linet, M.S., Li, G.L., Dosemeci, M., Travis, L.B., Zhang, Z.N., Li, D.G., Chow, W.H., Wacholder, S., Blot, W.J., (1996). An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene Study Group. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1339–1341.

Zhang, L., Robertson, M.L., Kolachana, P., Davison, A.J., Smith, M.T., (1993). Benzene metabolite, 1,2,4-benzenetril, induces micronuclei and oxidative DNA damage in human lymphocytes and HL60 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **21**, 339–348.

Articoli pubblicati nel corso del dottorato di ricerca:

- **The Anti-cancer Drug Chlorambucil as a Substrate for the Human Polymorphic Enzyme Glutathione Transferase P1-1: Kinetic Properties and Crystallographic Characterisation of Allelic Variants**". *J Mol Biol.* 2008 Jun 27;380(1):131-44. Lorien J. Parker, Sarah Ciccone, Louis C. Italiano, Alessandra Primavera, Aaron J. Oakley, Craig J. Morton, Nancy C. Hancock, Mario Lo Bello, Michael W. Parker.
- **Monomer-Dimer Equilibrium in Glutathione Transferases: A Critical Re-Examination.** *Biochemistry.* 2009 Nov 3;48(43):10473-10482 . Fabrini R, De Luca A, Stella L, Mei G, Orioni B, Ciccone S, Federici G, Lo Bello M, Ricci G.