



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO: SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXIV

## STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DI COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE E DERIVATI SEMISINTETICI AD ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.ma Prof.ssa Adriana Chilin

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Lisa Dalla Via

**Dottoranda:** Alessandra Braga



# INDICE

SOMMARIO	1
SUMMARY	2
ABBREVIAZIONI	3
 <i>CAPITOLO PRIMO</i>	
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
I COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE	5
COMPOSTI NATURALI UTILIZZATI PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO	6
IL CANCRO	7
MORTE CELLULARE	8
L'AUTOFAGIA	8
LA NECROSI	9
L'APOPTOSI	10
VIA ESTRINSECA DELL'APOPTOSI	11
VIA INTRINSECA DELL'APOPTOSI	11
LE CASPASI	12
PARP	13
STRESS OSSIDATIVO E ROS (SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO)	14
FONTI DI ROS	15
DIFESE OSSIDATIVE	16
DANNI OSSIDATIVI	17
DANNO AL DNA	17
DANNO ALLE PROTEINE	18
DANNO AI LIPIDI	19
TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ MITOCONDRIALE (MPT)	20
COMPONENTI DEL PORO	21

VDAC	21
ANT	21
Cyp-D	22
PiC	22
ESPOCHINASI	22
APERTURA DEL PORO	23

## *CAPITOLO SECONDO*

<b>SCOPO DELLA TESI</b>	25
-------------------------	----

## *CAPITOLO TERZO*

<b>MATERIALI E METODI</b>	27
Composti in esame	27
Materiale vegetale	27
Studio dell'attività biologica	28
Saggio dell'attività antiproliferativa	28
Saggio di frammentazione del DNA	32
Determinazione della frammentazione di PARP	33
Studio dell'attività mitocondriale	35
Preparazione dei mitocondri di fegato di ratto	35
Determinazione quantitativa delle proteine mitocondriali secondo il metodo di Gornall	36
Determinazione dello "swelling" mitocondriale	37
Determinazione del potenziale di membrana con l'elettrodo ionoselettivo	38
Determinazione fluorimetrica dello stato redox dei nucleotidi piridinici mitocondriali	42
Dosaggio fluorimetrico del perossido di idrogeno	42
Determinazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) ridotti mitocondriali	43
Misura del consumo di ossigeno tramite l'elettrodo di Clark	44

Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)	44
Determinazione dell'accumulo del calcio nei mitocondri	45
Determinazione del rilascio di citocromo c e AIF	45
Modalità di incubazione dei mitocondri	46
Modalità di incubazione dei mitocondri	48

## *CAPITOLO QUARTO*

<b><i>Verbesina persicifolia</i></b>	49
Studio dell'attività antiproliferativa dell'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi, 1 $\beta$ , 3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene (1)	52
Effetti di 1 sulle funzionalità mitocondriali	53
Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)	53
Alterazione delle proprietà isolanti della membrana Mitocondriale	55
Interazione con la catena respiratoria	57
Discussione	60
Conclusioni	63

## *CAPITOLO QUINTO*

<b>Studio del meccanismo d'azione del composto 1 e dei suoi derivati di semisintesi</b>	65
Studio dell'attività antiproliferativa	67
Studio dell'induzione della MPT da parte dell'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi, 1 $\beta$ , 3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene (1)	68
Studio del meccanismo d'azione del composto 4 $\beta$ -(3-cicloesil)-propionilossi-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -diacetossi eudesmano	75
Determinazione della frammentazione di PARP	84
Saggio di frammentazione del DNA	85
Discussione	86
Conclusioni	90

## *CAPITOLO SESTO*

<b><i>Amphipterygium adstringens</i></b>	91
Studio dell'attività antiproliferativa dell'acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD)	93
Effetti di AMD sulle funzioni mitocondriali	94
Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)	94
Induzione dello "swelling" mitocondriale	95
Misura del potenziale elettrico ( $\Delta\Psi$ ) della membrana mitocondriale	96
Determinazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) ridotti mitocondriali	98
Determinazione dell'ossidazione dei nucleotidi piridinici	100
Determinazione dell'accumulo del calcio nei mitocondri	101
Rilascio dei fattori pro-apoptotici	102
Discussione	103
Conclusioni	105
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	107

## SOMMARIO

L'attività di ricerca svolta ha riguardato l'individuazione e lo studio del meccanismo d'azione di composti ad attività antiproliferativa isolati da estratti naturali di origine vegetale e di derivati semisintetici.

Innanzitutto è stata effettuata una prima valutazione con l'obiettivo di stimare la capacità inibitoria sulla proliferazione cellulare. A questo scopo sono state utilizzate linee cellulari tumorali umane, determinandone l'IC<sub>50</sub> (concentrazione di composto in grado di provocare il 50% di morte cellulare rispetto ad una coltura di controllo).

Successivamente, dei composti dotati di attività più significativa, è stato studiato il meccanismo d'azione, focalizzando la ricerca su bersagli intracellulari coinvolti nel processo apoptotico.

Nel dettaglio, l'effetto di tali composti, è stato valutato principalmente sulla funzionalità di mitocondri isolati, in modo specifico sull'induzione della transizione di permeabilità mitocondriale (MPT), processo implicato nell'induzione del fenomeno di morte cellulare, mediante il rilascio di fattori pro-apoptotici quali AIF (Apoptosis Inducing Factor) e citocromo c. Valutando quindi specifici parametri mitocondriali, quali swelling, potenziale elettrico transmembrana, I.C.R. (Indice di Controllo Respiratorio) e l'eventuale induzione di uno stress ossidativo, indicatori di MPT, è stato possibile ottenere informazioni sull'effettivo meccanismo d'azione dei composti studiati.

## SUMMARY

The program research has focused on the identification and the study of the mechanism action of compounds with antiproliferative activity isolated from natural plant extracts and semisynthetic derivatives.

A first evaluation was carried out with the aim to estimate the ability of compounds to inhibit cell proliferation on human tumor cell lines. In particular, the  $IC_{50}$ , (concentration of compound able to induce 50% cell death with respect to a control), was determined.

For compounds characterized by the most significant antiproliferative activities, the mechanism of action has been studied, with the aim to establish the intracellular targets involved in the cytotoxic effect.

More specifically, the effect of all compounds has been evaluated on isolated rat liver mitochondria. In particular, it was studied the induction of mitochondrial permeability transition (MPT), a process involved in cell death, by the release of pro-apoptotic factors such as AIF (Apoptosis Inducing Factor) and cytochrome c. Thus, by evaluating specific mitochondrial parameters, such as swelling, transmembrane electrical potential, ICR (respiratory control index) and the mitochondrial oxidative state, it has been possible to achieve information about the intracellular mechanism of action of the test compounds.



## ABBREVIAZIONI

AMD	acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico
ANT	traslocasi degli adedin nucleotidi
Ant	antimicina
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
BHT	butilidrossitoluene
BKA	bongkrekat
c-Atra	carbosiattractiloside
CsA	ciclosporina A
Cyp-D	ciclofillina D
Cyt c	citocromo c
DMSO	dimetilsolfossido
DNP	2,4-dinitrofenolo
DTE	ditioeritritolo
DTNB	acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
FCCP	carbonil-cianuro-p-trifluoro-metossi fenilidrazone
HEPES	4-(2-idrossietil)-1-piperazina etansulfonato
HRP	perossidasi di rafano
I.C.R.	indice di controllo respiratorio
kCh	6-chetocolestanolo
MPT	transizione di permeabilità mitocondriale
NEM	N-etilmaleimmide
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase)
Pi	fosfato
PiC	carrier mitocondriale del fosfato
PPIase	peptidil-prolil- <i>cis-trans</i> -isomerasi
PTP	poro della transizione di permeabilità
RLM	mitocondri di fegato di ratto (rat liver mitochondria)
ROS	specie reattive dell'ossigeno
RR	rutenio rosso
Rot	rotenone

Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI
SPM	spermina
TNF	fattore di necrosi tumorale
TPB-	tetrafenilborato
TPP+	tertafenilfosfonio
VDAC	canali anionici voltaggio dipendenti
$\Delta E$	variazione del potenziale dell'elettrodo
$\Delta \Psi$	potenziale elettrico di membrana mitocondriale
$\Delta \mu$	gradiente elettrochimico protonico

# Capitolo Primo

## INTRODUZIONE

### I COMPOSTI DI ORIGINE NATURALE

Piante, animali e microorganismi sono fonti naturali di composti chimici definiti come prodotti naturali, che possono esplicare molteplici attività biologiche (Baker D.D. et al., 2007). Infatti essi sono stati utilizzati in qualità di agenti terapeutici fin dagli albori della medicina (Carlson E.E., 2010). Molti prodotti naturali e derivati modificati sinteticamente sono stati sviluppati per il trattamento di diversi tipi di patologie umane in quasi tutte le aree terapeutiche (Baker D.D. et al., 2007).

L'isolamento da *Papaverum Somniferum* del ben noto principio attivo morfina, avvenne all'inizio del 19° secolo (Li J.W.H. e Vederas J.C., 2009). In aggiunta alla morfina, la scoperta di nuovi farmaci da piante medicinali condusse a codeina, digitossina e chinina (Balunas M.J. e Kinghorn A.D., 2005). La commercializzazione dell'antibiotico penicillina nel 1940 fu senza dubbio una delle più importanti scoperte nello sviluppo di nuovi farmaci, stimolando enormemente gli sforzi in questo campo (Carlson E.E., 2010). Proprio in seguito a questa scoperta, dopo la seconda guerra mondiale, la ricerca farmaceutica si espanse enormemente procedendo ad un intenso screening di microorganismi alla ricerca di nuovi antibiotici (Li J.W.H. e Vederas J.C., 2009).

Le indagini su prodotti naturali come fonti di nuovi agenti terapeutici per l'uomo, raggiunsero il picco nell'industria farmaceutica occidentale nel periodo 1970-1980. Delle 877 nuove molecole introdotte tra il 1981 e il 2002, circa la metà erano di origine naturale, analoghi di semisintesi o composti sintetici basati su farmacofori naturali. (Kohen F.E. e Carter G.T., 2005).

Nel 1990, circa l'80% dei farmaci erano composti di origine naturale o analoghi ispirati ad essi. Importanti farmaci di origine naturale appartenenti a differenti categorie farmaceutiche hanno rivoluzionato la medicina; basti pensare al ruolo fondamentale assunto da importanti antibiotici (penicilline, tetracicline, eritromicine); antiparassitari e antimalarici quali avermectina e chinina rispettivamente; agenti utilizzati nel trattamento dell'ipercolesterolemia

(lovastatina); immunosoppressori per il trapianto di organi (ciclosporina) e farmaci anticancro (taxolo, doxorubicina)(Li J.W.H. e Vederas J.C., 2009).

L'importanza della scoperta di nuovi farmaci derivanti da fonti naturali è dettato dal fatto che il 60% dei composti utilizzati per il trattamento del cancro e circa il 75% dei farmaci utilizzati per curare malattie di tipo infettivo, sono o prodotti naturali o derivati degli stessi (McChesney J.D. et al., 2007).

## **COMPOSTI NATURALI UTILIZZATI PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO**

I composti di origine naturale derivanti da piante hanno giocato un ruolo chiave anche nella scoperta di nuovi farmaci per il trattamento del cancro. Infatti, negli ultimi 50 anni, la maggior parte delle applicazioni cliniche dei metaboliti secondari delle piante (e dei loro derivati) riguardano la lotta contro il cancro (Balunas M.J. e Kinghorn A.D., 2005). I farmaci ad attività antitumorale, derivanti da piante, possono essere suddivisi in quattro classi principali: gli alcaloidi della vinca rosea, le epipodofillotossine, i taxani e le camptotecine (Balunas M.J. e Kinghorn A.D., 2005).

Dal *Catharanthus roseus* sono stati isolati i primi agenti utilizzati nel trattamento del cancro, i cosiddetti alcaloidi della vinca rosea, vinblastina e vincristina. Originariamente, in diverse culture, questa pianta veniva utilizzata per il trattamento del diabete, ma proprio da indagini volte alla ricerca dei potenziali agenti ipoglicemizzanti, emerse che gli estratti erano in grado di ridurre il numero dei globuli bianchi e di provocare depressione midollare nei ratti e successivamente si scoprì che erano attivi contro la leucemia linfocitica nei topi. Questo portò all'isolamento dei due composti vinblastina e vincristina (Cragg G.M. e Newman D.J., 2005). Questi due agenti esibiscono la loro azione antiproliferativa inibendo la mitosi cellulare attraverso il legame alla tubulina, prevenendo così la formazione del fuso mitotico (Gurib-Fakim A., 2006). Vinblastina e vincristina risultano essere particolarmente attivi nel trattamento del sarcoma di Kaposi, del cancro al seno e del linfoma di Hodgkin (Gurib-Fakim A., 2006).

*Podophyllum peltatum* è una pianta originaria del Nord America dal cui rizoma sono stati isolati i composti tossici podofillotossina e  $\alpha$  e  $\beta$  peltatina. La podofillotossina è stata isolata nel 1880 e la sua struttura è stata proposta nel 1932. Questo composto agisce legandosi alla tubulina, prevenendo la formazione del microtubulo. La podofillotossina viene utilizzata per la semisintesi di due importanti derivati: l'etoposide ed il teniposide, i quali presentano un meccanismo d'azione diverso. Essi

infatti inibiscono l'enzima topoisomerasi II prevenendo così la sintesi e la replicazione del DNA (Gurib-Fakim A., 2006).

Un altro importante composto di origine vegetale ad attività antiproliferativa è Paclitaxel isolato dal *Taxus brevifolia*. Questo composto agisce interferendo con i microtubuli inibendo il disassemblaggio del fuso mitotico. Il paclitaxel presenta attività antitumorale nei confronti del tumore al seno, al polmone e contro il sarcoma di Kaposi (Gurib-Fakim A., 2006; Cragg G.M. e Newman D.J., 2005).

Infine un'altra importante categoria di composti antitumorali isolati da piante è quella delle camptotecine. L'alcaloide vegetale camptotecina, isolato dalla *Camptotheca acuminata*, agisce inibendo l'enzima topoisomerasi I e da essa sono stati ottenuti due derivati di semisintesi: Irinotecan e Topotecan utilizzati rispettivamente per il trattamento del cancro colonrettale e del tumore all'ovaio e polmonare a piccole cellule (Gurib-Fakim A., 2006; Cragg G.M. e Newman D.J., 2005).

## **IL CANCRO**

Il cancro è la principale causa di morte nei paesi economicamente sviluppati ed è la seconda causa di morte nei paesi in via di sviluppo. In questi ultimi l'aumento di nuovi casi di tumore risulta essere correlato con la crescita della popolazione, con il suo invecchiamento ma anche con uno stile di vita sbagliato che include il fumo di sigaretta, scarsa attività fisica e una dieta non corretta (Jemal A. et al. 2011).

Nel processo di carcinogenesi si vengono a verificare cambiamenti cellulari anomali nei quali i geni che controllano la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi vengono trasformati in base a selettive pressioni ambientali. Il processo che porta allo sviluppo del tumore può essere suddiviso in tre distinte fasi:

- **iniziazione:** durante la quale una cellula normale viene esposta ad uno stimolo che causa un danno al DNA non riparabile o che viene riparato non correttamente. Questa fase è rapida ed irreversibile.
- **promozione:** questa fase richiede tempi maggiori per instaurarsi. Si ha espansione delle cellule mutate sino a formare una lesione multicellulare premaligna attivamente proliferante.
- **progressione:** durante questa fase si viene a verificare un altro evento irreversibile. Infatti si ha generazione di cloni con un'aumentata capacità proliferativa, invasivi e con potenziale metastatico (Sun S.Y. et al., 2004).

Una delle caratteristiche principali che contraddistingue i tumori umani, e che costituisce anche una delle cause del fallimento terapeutico, è la loro capacità di

evadere la morte cellulare. Infatti esistono numerose prove che dimostrano la presenza di alterazioni metaboliche che riguardano la capacità delle cellule maligne di prendere parte a processi catabolici quali apoptosi, necrosi e autofagia (Fulda S. et al., 2010).

Un aspetto importante, riguarda anche il ruolo svolto dai mitocondri nella regolazione di alcune funzioni cellulari fondamentali e in molteplici aspetti riguardanti la tumorigenesi e la progressione del tumore. Infatti esistono correlazioni tra disfunzioni mitocondriali e caratteristiche tipiche delle cellule tumorali, quali il potenziale proliferativo illimitato, la compromissione del processo apoptotico e la diminuzione dell'autofagia, l'insensibilità a fattori limitanti la crescita e un aumento dei processi anabolici (Fulda S. et al., 2010).

## **MORTE CELLULARE**

La morte cellulare può essere classificata sulla base di caratteristiche morfologiche; in base al coinvolgimento o meno di nucleasi o di distinte classi di proteasi; in base ad aspetti funzionali (programmata o accidentale, fisiologica o patologica) o a caratteristiche immunologiche (immunogenica o non immunogenica) (Kroemer G. et al, 2009).

## **L'AUTOFAGIA**

L'autofagia è storicamente classificata come morte cellulare di tipo II e riconosciuta come un meccanismo di sopravvivenza in condizioni di limitato nutrimento. Infatti, attraverso un'elevata degradazione del materiale citoplasmatico, questo processo viene utilizzato per generare sia i metaboliti sia l'energia necessari alle cellule in condizioni di carenza di nutrimento. In tali circostanze, l'autofagia è un processo critico nel mantenimento della vitalità cellulare e di conseguenza nelle cellule in fase di morte, il processo autofagico sembra funzionare come una risposta adattativa allo stress prolungando la vitalità cellulare. Tuttavia l'interesse riguardante l'autofagia in quanto processo di morte cellulare nasce dal fatto che la degradazione autofagica è un processo catabolico fondamentale, che può portare alla distruzione della cellula (Debnath J. et al., 2005). L'autofagia è caratterizzata da un'acquisizione di citoplasma ed organelli citoplasmatici all'interno di vescicole per il successivo direccionamento ai lisosomi o ai vacuoli dove verranno poi degradate (Elmore S., 2007). Esistono prove di una possibile relazione tra autofagia e apoptosi. È stato proposto infatti che

i mitocondri possano essere in grado di integrare il processo apoptotico con quello autofagico. Inoltre, alcuni segnali coinvolti nell'apoptosi possono essere anche coinvolti nell'autofagia (Elmore S., 2007). Un ulteriore collegamento tra apoptosi e autofagia è la trasformazione maligna. Alcuni studi hanno evidenziato come durante la trasformazione cellulare, alcune proteine e vie di segnale connesse all'autofagia siano deregolate, risultando in una riduzione del segnale autofagico e suggerendo così che, in particolari circostanze, l'autofagia possa funzionare come un meccanismo di salvaguardia che limita la crescita cellulare incontrollata (Elmore S., 2007).

## LA NECROSI

Dal punto di vista morfologico, questo processo di morte cellulare è caratterizzato da un aumento del volume cellulare, da un rigonfiamento degli organelli citoplasmatici, dalla rottura della membrana plasmatica e da conseguente perdita del contenuto intracellulare. Per un lungo periodo, il processo necrotico è stato considerato un tipo di morte cellulare non programmato ma esistono dati che evidenziano come la necrosi sia finemente regolata da una serie di vie di trasduzione del segnale e da meccanismi catabolici. Le cause che provocano la necrosi non sono ancora state del tutto chiarite, sebbene si possano evidenziare alterazioni mitocondriali, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, permeabilizzazione della membrana mitocondriale, cambiamenti lisosomiali, alterazioni nucleari, degradazione lipidica, aumento della concentrazione citosolica del calcio e distruzione della membrana cellulare (Kroemer G. et al. 2009). A differenza dell'apoptosi, nel processo necrotico la perdita dell'integrità della membrana cellulare porta ad un rilascio del contenuto citoplasmatico nei tessuti circostanti con conseguente infiammazione (Elmore S., 2007).

## L'APOPTOSI

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, consiste in una serie di eventi biochimici strettamente regolati che realizzano la distruzione cellulare senza danneggiare le cellule circostanti (Gottlieb R.A., 2001).

Questo processo avviene normalmente durante lo sviluppo e l'invecchiamento in quanto è un meccanismo omeostatico in grado di mantenere la popolazione cellulare nei tessuti. L'apoptosi può essere considerata anche un meccanismo di difesa come avviene ad esempio nelle reazioni immunitarie o in condizioni in cui le cellule vengano danneggiate in conseguenza all'instaurarsi di patologie o in seguito all'azione di agenti nocivi. Sebbene esista un'ampia varietà di stimoli e condizioni, sia fisiologiche che patologiche, in grado di innescare il processo apoptotico, non tutte le cellule necessariamente muoiono in risposta agli stessi stimoli (Elmore S., 2007).

Dal punto di vista morfologico l'apoptosi è caratterizzata, nella sua fase iniziale da ritrazione degli pseudopodi, diminuzione del volume cellulare, condensazione della cromatina e frammentazione nucleare. Successivamente, i frammenti di materiale nucleare raggiungono la membrana plasmatica dove vengono circondati da invaginazioni della membrana stessa, conferendo così alla cellula un aspetto "a bolle" ("blebbing"). Si avrà separazione dei frammenti cellulari nei cosiddetti corpi apoptotici durante il processo detto "budding". (Elmore S., 2007; Kroemer G. et al, 2009).

I corpi apoptotici verranno successivamente fagocitati dai macrofagi, cellule parenchimali o cellule neoplastiche e degradati nei fagolisosomi (Elmore S., 2007).

Dal punto di vista biochimico, le cellule apoptotiche esibiscono alcune modifiche caratteristiche quali: cleavage e legami crociati di proteine, frammentazione del DNA, riconoscimento fagocitico.

Nella maggior parte delle cellule vi è un'ampia espressione di caspasi in forma di proenzimi inattivi i quali, una volta attivati, possono attivare a loro volta altre procaspasi, amplificando così la via del segnale apoptotico e velocizzando in questo modo il processo di morte cellulare.

Anche la frammentazione del DNA, da parte di endonucleasi  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{+}$  dipendenti, è un'altra peculiarità del processo apoptotico risultante nella formazione del cosiddetto "DNA ladder".

Un altro importante aspetto biochimico del processo apoptotico riguarda l'espressione sulla superficie cellulare di marker che permettono una veloce fagocitosi delle cellule apoptotiche con una minima compromissione del tessuto



circostante. In particolare si ha esternalizzazione delle fosfatidilserine sullo strato esterno della membrana citoplasmatica permettendo così un veloce riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei fagociti (Elmore S., 2007).

Il processo apoptotico può essere attivato attraverso due vie principali: la via estrinseca o recettoriale e la via intrinseca o mitocondriale.

#### VIA ESTRINSECA DELL'APOPTOSI

La via estrinseca o recettoriale è attivata dal legame dei ligandi con i propri recettori di morte situati sulla membrana plasmatica. I recettori di morte appartengono alla superfamiglia TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), della quale fanno parte più di 20 proteine con un vasto range di funzioni biologiche, incluse la regolazione della morte cellulare, ma anche la sopravvivenza, la differenziazione e l'immunoregolazione. I membri della famiglia dei TNFR presentano domini extracellulari ricchi in cisteine. Inoltre i recettori di morte sono caratterizzati da domini citoplasmatici di circa 80 aminoacidi chiamati "Death Domain" i quali giocano un ruolo chiave nella trasmissione del segnale di morte dalla superficie cellulare alla via di segnale intracellulare. I recettori di morte meglio caratterizzati sono: CD95 (APO-1/Fas), TNF receptor 1 (TNFR1) e TRAIL-R1 e R2. Tra i corrispondenti ligandi della superfamiglia dei TNFR si possono ricordare il ligando CD95, il TNF $\alpha$  e TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). La stimolazione dei recettori di morte risulta in un'aggregazione recettoriale e nel reclutamento di molecole adattatrici come FADD (Fas-associated death domain) e le caspasi-8, la quale attraverso DED (Death Effector Domain) interagisce con FADD attivando il recettore di morte e favorendo la formazione di DISC (Death-Inducing Signaling Complex). In conseguenza al reclutamento, la caspasi-8 si attiva e inizia così il processo apoptotico attraverso il taglio diretto di caspasi effettrici a valle (Debatin K.M. and Krammer P., 2004).

#### VIA INTRINSECA DELL'APOPTOSI

Nella via intrinseca o mitocondriale, il rilascio dallo spazio transmembrana mitocondriale di proteine quali citocromo c o Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI), nel citosol, porta ad uno stadio dell'apoptosi caratterizzato dall'attivazione di caspasi effettrici (Fulda S., 2010).

Infatti il citocromo c promuove l'attivazione della caspasi-3 attraverso la formazione dell'apoptosoma, complesso che contiene oltre al citocromo c anche Apaf-1

(Apoptotic protease activating factor 1), ATP e caspasi-9 risultando nell'attivazione della stessa caspasi-9 e successivamente della caspasi-3.

Smac/DIABLO favorisce l'attivazione delle caspasi-3, -7 e -9 legandosi alle proteine IAP (gli "inibitori dell'apoptosi") e antagonizzandole. Le proteine IAP sono un gruppo di proteine appartenenti alla famiglia di inibitori endogeni delle caspasi comprendente 8 analoghi umani tra i quali XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e ML-IAP (livin/melanoma-IAP). Le proteine IAP presentano dei domini che risultano essere centrali nell'inibizione dell'attività delle caspasi. In seguito a stimoli apoptotici, Smac/DIABLO viene rilasciato nel citosol ed interagendo con le proteine IAP, ed inibendole, premette la riattivazione delle caspasi (Fulda S., 2010; Gulbins E. et al., 2003).

Oltre alle proteine sopra citate, dallo spazio intermembrana mitocondriale, può essere rilasciata nel citosol anche la proteina AIF (Apoptosis Inducing Factor) attraverso il taglio della parte N-terminale della proteina stessa, contenente una sequenza di localizzazione mitocondriale. Successivamente, la traslocazione di AIF nel nucleo, che sembra essere dovuta alla porzione C-terminale della proteina stessa, provoca condensazione della cromatina e frammentazione del DNA (Gulbins E. et al., 2003). Un'altra proteina mitocondriale rilasciata durante il processo apoptotico è l'endonucleasi G (Endo G), una nucleasi mitocondriale codificata da un gene nucleare, che una volta rilasciata nel citosol trasloca nel nucleo catalizzando la frammentazione del DNA. L'Endo G coopera inoltre con esonucleasi e DNasi I, facilitando il processamento del DNA (Ravagnan L. et al., 2002).

Via intrinseca ed estrinseca convergono entrambe in uno stesso punto, attivando la "via di esecuzione apoptotica". L'inizio di questa fase avviene con la proteolisi delle caspasi effettrici (caspasi 3, 6 e 7) in grado di attivare endonucleasi (che degradano materiale nucleare) e proteasi (che degradano le proteine nucleari e del citoscheletro) (Elmore S., 2007).

### **Le caspasi**

Le caspasi sono presenti, nella maggior parte delle cellule, sottoforma di pro-enzimi inattivi e una volta attivate possono a loro volta attivare altre pro-caspasi, dando inizio alla cosiddetta "cascata delle caspasi". Questo processo amplifica il segnale apoptotico portando ad una rapida morte cellulare (Elmore S., 2007).

Le caspasi appartengono ad un gruppo di enzimi ad attività proteolitica e sono in grado di catalizzare il taglio di proteine a livello di residui di acido aspartico. Dieci delle principali caspasi sono state identificate e classificate in: caspasi iniziatrici

(caspasi -2, -8, -9, -10), caspasi effettrici (caspasi -3, -6, -7) e caspasi infiammatorie (caspasi -1, -4, -5) (Elmore S., 2007).

La caspasi 3 è un enzima importante nell'esecuzione dell'apoptosi ed è responsabile, totalmente o parzialmente, del taglio proteolitico di molte proteine chiave coinvolte nel processo apoptotico, come ad esempio l'enzima nucleare PARP. Anche la caspasi 7 presenta attività e specificità di substrato simili alla caspasi 3, entrambe, infatti, sono in grado di provocare il taglio proteolitico dell'enzima PARP (Cohen G.M., 1997).

### **PARP**

PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) è una proteina nucleare di 116 kDa, coinvolta nella riparazione del DNA. Le principali unità funzionali di PARP sono: un dominio amino-terminale coinvolto nel legame al DNA (DBD), un dominio centrale di automodifica (AMD) e un dominio catalitico carbossi-terminale (CD). Il dominio DBD contiene due motivi Cys-Cys-His-Cys zinc fingers che mediano il legame al DNA, un segnale di localizzazione nucleare (NLS) e un sito di taglio da parte della caspasi 3. Il dominio AMD contiene un ripiegamento, il quale media le interazioni proteina-proteina. Il dominio CD presenta un motivo per il legame al NAD<sup>+</sup> (Krishnakumar R. e Kraus W.L., 2010).

PARP partecipa al processo di poli-ADP-ribosilazione, una modifica post-traduzionale di proteine che, nelle cellule eucariotiche, giocano un ruolo chiave nella riparazione e nella replicazione del DNA, nella trascrizione e nella morte cellulare. Il metabolismo dei polimeri di ADP-ribosio è principalmente regolato dall'azione sinergica di PARP e PARG (Poly(ADP-ribose)glycohydrolase). In presenza di danno al DNA, PARP usa il NAD<sup>+</sup> come substrato per il trasferimento di monomeri di ADP-ribosio a proteine nucleari accettrici o alla PARP stessa. Dopo la reazione iniziale, PARP catalizza la fase di allungamento consistente nell'addizione di altri monomeri di ADP-ribosio per formare polimeri con strutture lineari e/o ramificate. Il catabolismo dei polimeri di ADP-ribosio viene effettuato dall'enzima PARG il quale idrolizza i legami glicosidici dei polimeri producendo residui liberi di ADP-ribosio (Soldani C. e Scovassi A.I., 2002).

Il taglio della PARP tra il residuo Asp<sup>214</sup> e il residuo Gly<sup>215</sup>, da parte della caspasi 3, porta alla separazione dei due motivi zinc finger di legame al DNA dai domini catalitico e di automodifica, prevenendo così il reclutamento dell'enzima al sito di danno sul DNA. Questo tipo di taglio fa sì che vi sia una prevenzione nella deplezione delle riserve di energia (NAD<sup>+</sup> e ATP) richiesti per gli ultimi stati dell'apoptosi. Per

evitare un eccessivo consumo delle riserve energetiche cellulari ed evitare il passaggio da un processo apoptotico ad uno necrotico, le cellule esposte ad induttori apoptotici presentano così il taglio di PARP in peptidi inattivi (Boulares A.H. et al., 2002).

L'inattivazione di PARP da parte della caspasi 3 previene la poli-ADP-ribosilazione di proteine ed enzimi nucleari (come ad esempio un' endonucleasi  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  dipendente, DNAS1L3) permettendo in tal modo l'attività di PARG, con conseguente rimozione dei polimeri dalle proteine e rimuovendo così l'inibizione di DNAS1L3. L'endonucleasi può così catalizzare la frammentazione del DNA internucleosomiale, caratterizzante le ultime fasi dell'apoptosi (Yakovlev A.G. et al., 2000).

Alcuni lavori riguardanti lo studio della morte cellulare, hanno collocato i mitocondri in una posizione di rilievo riguardo la regolazione dell'apoptosi. Infatti la produzione di ROS, insieme al rilascio di proteine proapoptotiche dallo spazio intermembrana mitocondriale, inducono l'attivazione di diversi modi di morte cellulare (Ott M. et al., 2007).

## **STRESS OSSIDATIVO e ROS (SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO)**

Con il termine "radicali liberi" si descrive un ampio range di molecole: ossia specie chimiche che presentano uno o più elettroni spaiati, come ad esempio l'atomo di idrogeno (un elettrone spaiato), la maggior parte degli ioni metallici di transizione, l'ossido nitrico e l'ossigeno (il quale presenta due elettroni spaiati) (Fruehauf J.P. e Meyskens L.F. Jr., 2007; Moldovan L. e Moldovan N.I. 2004).

Nel suo stato fondamentale, l'ossigeno presenta due elettroni spaiati: questa caratteristica permette di definirlo esso stesso una specie radicalica. In tal modo l'ossigeno reagisce facilmente per formare delle specie parzialmente ridotte le quali sono estremamente reattive e che presentano una breve vita, da qui l'espressione specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Moldovan L. e Moldovan N.I. , 2004).

Le principali specie reattive dell'ossigeno sono:

- L'anione superossido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ): il quale viene prodotto attraverso un processo di riduzione monoelettronica dell'ossigeno;

- Il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ): non è una specie radicalica, in quanto non presenta elettroni spaiati. Può essere prodotto attraverso diverse reazioni metaboliche come ad esempio dalla reazione di dismutazione di  $O_2^{\bullet-}$  catalizzata dall'enzima superossido dismutasi. In questa reazione si forma, come intermedio di reazione, anche il radicale idroperossile ( $HO_2^{\bullet}$ );
- Il radicale idrossilico ( $\cdot OH$ ): il quale può essere prodotto o da  $O_2^{\bullet-}$  (attraverso la reazione Haber-Weiss) o da  $H_2O_2$ . In quest'ultimo caso è prevista la presenza di uno ione metallico ed *in vivo* la reazione più frequente di decomposizione di  $H_2O_2$  viene catalizzata da  $Fe^{2+}$  attraverso la reazione di Fenton. Il radicale idrossilico è probabilmente la specie reattiva dell'ossigeno più tossica in quanto, data la sua estrema reattività, reagisce indiscriminatamente nel sito di formazione (o nelle sue vicinanze) con la maggior parte delle molecole che incontrerà. Proprio a causa di questa sua reattività, è improbabile che il radicale idrossilico funzioni come molecola segnale, a differenza invece di  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  quali sono molto meno reattivi e con una vita più lunga, caratteristiche che li rendono più appropriati per i segnali intra- ed inter- cellulari (Moldovan L. Moldovan N.I. , 2004).

Lo stress ossidativo può essere definito come uno squilibrio tra l'ossidazione e la capacità antiossidante della cellula nel prevenire in danno ossidativo. Lo stress ossidativo è implicato in un gran numero di patologie incluse l'aterosclerosi, la fibrosi polmonare, il cancro, le malattie neurodegenerative, il diabete di tipo II, i processi infiammatori e l'invecchiamento (Thannickal V.J. e Fanburg B.L. , 2000; Ott M. et al, 2007).

### **FONTI DI ROS**

È ormai ben noto come, nella maggior parte delle cellule eucariotiche, il metabolismo energetico mitocondriale sia una delle principali fonti di ROS e come le ROS prodotte a livello mitocondriale siano determinanti nelle funzioni cellulari, nella partecipazione a diverse vie di trasmissione del segnale e in vari processi degenerativi (Kowaltowski A.J. et al., 2009).

La catena respiratoria mitocondriale è la principale sorgente di ROS intracellulari e allo stesso tempo è anche un importante target per gli effetti dannosi delle ROS stesse. Infatti il metabolismo cellulare dipende da un continuo rifornimento di ATP da parte dei mitocondri ed un qualsiasi danno in grado di compromettere le funzioni

della catena respiratoria può avere quindi un impatto sulla vitalità cellulare (Ott M. et al, 2007).

La catena mitocondriale di trasporto degli elettroni è la principale fonte di generazione di ROS, come prodotto stesso della respirazione. Nello specifico le ROS vengono prodotte principalmente a livello del complesso I (NADH-Q ossidoreduttasi) e del complesso III (Q-citocromo c ossidoreduttasi) della catena respiratoria. Nel dettaglio il complesso III riceve elettroni dal coenzima Q ridotto ( $UQH_2$ ) donandoli al citocromo c.  $UQH_2$  viene ossidato a UQ in una complessa serie di reazioni che vede la formazione del radicale semichinonico ( $UQ^-$ ) al sito  $Q_p$  del complesso III (il quale si affaccia sullo spazio intermembrana), attraverso la donazione di un elettrone da  $UQH_2$  alla proteina Reiske e poi al citocromo c. Viene poi trasferito un elettrone dal  $UQ^-$  (formatosi al sito  $Q_p$ ) al sito  $Q_n$  (il quale si affaccia sulla matrice mitocondriale) dove UQ viene ridotto a  $UQ^-$ .  $UQ^-$  al sito  $Q_n$  viene ridotto a  $UQH_2$  attraverso un elettrone fornito da un secondo  $UQ^-$  formatosi al sito  $Q_p$ . Come risultato, in questo ciclo, si ha formazione del  $UQ^-$  ad entrambi i siti  $Q_p$  e  $Q_n$ .

Poichè la coppia  $UQ^-/UQ$  è altamente riducente, si può formare  $O_2^{\bullet-}$  per trasferimento di un elettrone da  $UQ^-$  purchè l' $O_2$  abbia accesso ai siti sul complesso.

Il ciclo dell'ubichinone può essere responsabile anche della formazione di  $O_2^{\bullet-}$  a livello del complesso I della catena respiratoria (Kowaltowski A.J. et al., 2009).

### **DIFESE OSSIDATIVE**

La natura reattiva delle specie dell'ossigeno ha reso necessario lo sviluppo di meccanismi di difesa per proteggere le macromolecole cellulari da danni. In particolari condizioni, ossia quando la formazione delle specie reattive dell'ossigeno è particolarmente intensa, queste possono compromettere le funzioni mitocondriali ed influire sulla vitalità cellulare.

In dipendenza dall'effetto, le cellule possono o attivare la via del suicidio cellulare o riparare il danno (Ott M. et al, 2007).

La principale ROS prodotta a livello mitocondriale è  $O_2^{\bullet-}$ , risultante da una riduzione mono-elettronica dell' $O_2$ . Difatti la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni riduce la maggior parte dell' $O_2$  consumato ad acqua, ma viene anche prodotta una piccola quantità di  $O_2^{\bullet-}$ . L'  $O_2^{\bullet-}$ , come precedentemente scritto, nei mitocondri, viene metabolizzato ad  $H_2O_2$  ad opera della Mn-SOD (Mn-

superossidodismutasi) di matrice e dalla Cu,Zn-SOD nello spazio intermembrana. L'abbondanza, ma anche la presenza in entrambi i compartimenti mitocondriali, conferma l'importanza nel rimuovere questa specie reattiva dell'ossigeno (Kowaltowski A.J. et al., 2009). Il  $H_2O_2$  così generato ha più possibili destini. A causa della sua relativa stabilità e della sua capacità nel permeare la membrana (e di essere trasportato da acquaporine presenti nella membrana mitocondriale interna) può diffondere dai mitocondri al citosol cellulare dove viene rimosso dai sistemi antiossidanti citosolici.  $H_2O_2$  generato a livello mitocondriale può anche agire come molecola segnale a livello citoplasmatico, interessando diversi network quali ad esempio il ciclo cellulare, la risposta allo stress, il metabolismo energetico e l'equilibrio redox. A livello mitocondriale inoltre sono stati scoperti nuovi effetti segnale indotti da  $H_2O_2$ , tra i quali è stato evidenziato un suo importante ruolo nell'attivazione della cosiddetta *mild mitochondrial uncoupling*, processo in grado di regolare esso stesso la generazione di ROS.

Una volta prodotto, a livello mitocondriale,  $H_2O_2$  può essere rimosso dalla catalasi o dal sistema mitocondriale glutatione perossidasi/glutazione reduttasi il quale rimuove  $H_2O_2$  usando il glutatione ridotto come fonte di elettroni, e il sistema mitocondriale tioredossina perossidasi/tioredossina reduttasi il quale usa elettroni dalla tioredossina (Kowaltowski A.J. et al., 2009). Sia il glutatione sia la tioredossina vengono poi ridotti dal NADPH; in tal modo i livelli di NADPH sono strettamente correlati alle capacità antiossidanti mitocondriali. Il NADP può essere mantenuto nello stato ridotto attraverso l'attività della NAD/NADP transidrogenasi, insieme al trasporto di protoni in matrice, stabilendo così una connessione tra il potenziale di membrana e la capacità redox mitocondriale. In alternativa NADP<sup>+</sup> può essere ridotto dalla isocitrato deidrogenasi (Kowaltowski A.J. et al., 2009).

## **DANNI OSSIDATIVI**

L'interazione delle ROS con i diversi tipi di macromolecole cellulari può compromettere sia le funzioni mitocondriali sia influenzare la vitalità cellulare conducendo la cellula a morte cellulare (Ott M. et al, 2007).

### **Danno al DNA**

Il danno al DNA causato dallo stress ossidativo provoca modifiche delle basi puriniche e pirimidiniche, dello scheletro di deossiribosio, rottura a singolo e doppio filamento, legami crociati ad altre molecole (Ott M. et al, 2007).

Modifiche permanenti del materiale genetico, risultanti dal danno ossidativo, sono potenzialmente mutageniche, contribuendo all'insorgenza del cancro, ad un

invecchiamento prematuro e a malattie neurodegenerative (Ott M. et al, 2007; Valko M. et al., 2006).

Come risultato del danno al DNA si possono verificare: arresto o induzione della trascrizione, induzione delle vie di trasduzione del segnale, errori di replicazione ed instabilità genomica, tutti eventi associati alla carcinogenesi (Valko M. et al., 2006).

Oltre al DNA nucleare, un altro importante target delle ROS è il DNA mitocondriale (mtDNA), il quale codifica per polipeptidi, RNA transfer ed RNA ribosomiali, essenziali per il trasporto di elettroni e la produzione dell'ATP attraverso la fosforilazione ossidativa. Si ha poi assemblaggio delle proteine prodotte sia dal genoma nucleare sia dal genoma mitocondriale in complessi respiratori funzionali. Essendo, il mtDNA uno dei target cellulari critici del danno ossidativo, si possono avere danni cellulari letali attraverso l'interruzione del trasporto di elettroni, compromissione del potenziale di membrana mitocondriale e della produzione di ATP. La particolare suscettibilità del mtDNA al danno ossidativo causato dalle ROS, è dovuta alla sua stretta vicinanza alla catena di trasporto degli elettroni, principale fonte di ROS, e alla mancanza di una protezione da parte degli istoni (Ott M. et al, 2007).

### **Danno alle proteine**

Il danno ossidativo delle ROS può causare alterazioni della struttura e della funzione delle proteine attraverso la modifica di residui aminoacidici critici, dimerizzazione delle proteine ed interagendo con motivi Fe-S o di altri complessi metallici (Thannickal V.J. e Fanburg B.L. , 2000).

Il danno alle proteine catalizzato da metalli, implica la scissione ossidativa, perdita di residui di istidina, introduzione di gruppi carbonilici. È possibile che il danno proteico che sia riparato e che non sia un evento letale per la cellula anche se sono state riportate prove di danni ossidativi a lungo termine a livello di due importanti proteine mitocondriali: l'aconitasi e l'adenin nucleotide translocasi. L'induzione dell'ossidazione proteica da parte delle ROS è correlata con la formazione di diversi tipi di inter- ed intra- cross-link proteici inclusi quelli che si formano per addizione di un gruppo carbonilico di una proteina ossidata e l'amino gruppo di un residuo di lisina; per ossidazione di due gruppi sulfidrilici di residui di cisteine che portano alla formazione di ponti disolfuro; per ossidazione di tirosine con formazione di -tyr-tyr-crosslink. Particolarmente suscettibili all'azione ossidativa delle ROS sono i residui di cisteine e metionine (Valko M. et al., 2006).



### **Danno ai lipidi**

Il processo della perossidazione lipidica avviene a carico delle membrane biologiche causando compromissione della funzionalità delle membrane, cambi nella fluidità, inattivazione degli enzimi e dei recettori legati alle membrane e aumento della permeabilità a ioni quali il calcio (Halliwell B. e Chirico S. 1993).

Tale processo consiste di 3 momenti: inizio, propagazione e terminazione.

L'inizio della reazione prevede l'attacco da parte di specie radicaliche come  $\cdot OH$ , ad acidi grassi polinsaturi con estrazione di un atomo di idrogeno da carboni metilenici, lasciando così un elettrone spaiato sul carbonio al quale era originariamente legato l'atomo di idrogeno (Valko M. et al., 2006; Halliwell B. e Chirico S. , 1993). Successivamente il carbonio radicalico può reagire con l'ossigeno molecolare dando origine al radicale perossile, il quale a sua volta può reagire con proteine di membrana o con altri acidi grassi propagando in questo modo in una reazione a catena la perossidazione lipidica (Halliwell B. e Chirico S. 1993). Inoltre, la perossidazione lipidica può portare a prodotti finali possono citotossici come la malondialdeide e l'idrossinonenale, in grado di provocare modifiche chimiche al DNA (Valko M. et al., 2006)

È da sottolineare come la produzione di ROS rivesta un importante ruolo nell'induzione dell'apoptosi. In particolare, alti livelli di ROS possono causare morte cellulare attraverso l'induzione dell'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale con successivo rilascio di fattori proapoptotici (Fruehauf J.P. e Meyskens L.F. Jr. , 2007).

## **TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ MITOCONDRIALE (MPT)**

I mitocondri giocano un importante ruolo sia nella sintesi dell'ATP, sia nella regolazione della morte cellulare. Uno dei fattori chiave che regola le funzioni mitocondriali e la sintesi di ATP è la concentrazione del calcio (Javadov S. et al., 2009).

Overload di calcio e stress ossidativo in combinazione con altri fattori quali alte concentrazioni di fosfato e basse concentrazioni di adenin nucleotidi, inducono la formazione del poro non specifico della MPT a livello della membrana mitocondriale interna (Javadov S. et al., 2009).

Secondo il modello chemiosmotico di Mitchell (Mitchell P., 1961), il mantenimento dell'impermeabilità della membrana interna mitocondriale è un requisito fondamentale per la produzione di energia sotto forma di ATP; infatti, i soluti possono attraversare tale membrana solo se presente sulla stessa un loro specifico trasportatore.

Studi effettuati più di 40 anni fa, evidenziarono come mitocondri energizzati ed esposti ad elevate concentrazioni di calcio, andassero incontro ad un intenso rigonfiamento ("swelling"), caratterizzato da una diminuzione nel light scattering e che poteva essere parzialmente invertito dalla chelazione del calcio (Halestrap A.P., 2009).

Originariamente fu proposto che tale swelling potesse rappresentare una permeabilizzazione non specifica della membrana mitocondriale interna dovuta all'attivazione di fosfolipasi sensibili al calcio con conseguente accumulo di acidi grassi e lisofosfolipidi nella membrana (Halestrap A.P., 2009).

Tuttavia, studi condotti successivamente evidenziarono come l'aumento della permeabilità fosse dovuto all'apertura di un canale non specifico sulla membrana mitocondriale (Halestrap A.P., 2009) In particolare Crompton concluse che stress ossidativo ed overload di calcio potevano essere fattori critici nel promuovere l'apertura del suddetto canale con conseguente disaccoppiamento mitocondriale e un presumibile equilibrio di soluti a basso PM attraverso la membrana, con gravi ripercussioni per la cellula (Crompton M. et al., 1987).

Perciò, in varie condizioni, come ad esempio in presenza di calcio e fosfato inorganico e/o di agenti in grado di aumentare lo stress ossidativo, i mitocondri isolati vanno incontro al fenomeno della transizione di permeabilità mitocondriale. Tale processo è caratterizzato dall'apertura di un poro proteico con compromissione dell'impermeabilità della membrana mitocondriale interna

(necessaria per la produzione di ATP), perdita del potenziale elettrico transmembrana ( $\Delta\Psi$ ), swelling mitocondriale e rottura della membrana esterna mitocondriale (Tsujiimoto Y et al., 2006; Armstrong J.S., 2006).

### **COMPONENTI DEL PORO**

Diversi modelli sul funzionamento e sulla composizione del poro sono stati proposti nel corso degli anni. Sebbene il preciso meccanismo di regolazione come anche l'esatta struttura del canale non siano ancora del tutto chiariti, il consenso generale ammette il coinvolgimento di diverse proteine nella costituzione del complesso sopramolecolare (Rasola A. et al., 2010; Leung A.W.C. e Halestrap A.P., 2008; Halestrap A.P., 2009).

Tra i principali componenti strutturali che sembrano essere coinvolti nella formazione del poro sono compresi: il canale anionico voltaggio dipendente (VDAC) sulla membrana esterna, il traslocatore degli adenin nucleotidi (ANT) sulla membrana interna, l'isomerasi ciclofillina D (Cyp-D) in matrice e più recentemente è stata scoperta anche la partecipazione del carrier mitocondriale del fosfato (PiC). Vi è inoltre la partecipazione di altre proteine accessorie, alla formazione del poro, quali ad esempio l'esochinasi. (Rasola A et al., 2010).

### **VDAC**

Il canale anionico voltaggio dipendente (proteina di 31 kDa) è il principale trasportatore di proteine localizzato a livello della membrana esterna mitocondriale. Esso è in grado di mediare le complesse interazioni tra i mitocondri e gli altri compartimenti cellulari trasportando anioni, cationi, ATP, calcio e metaboliti. VDAC gioca in questo modo un ruolo fondamentale nella comunicazione tra mitocondri e citosol. Inoltre un aspetto essenziale nella gestione di questi processi, è la formazione transitoria di complessi tra VDAC stesso ed altre proteine (esochinasi e creatin chinasi) (Grimm S. e Brdiczka D., 2007).

### **ANT**

È stato dimostrato in diversi studi come l'ANT, situata nella membrana mitocondriale interna, sia uno dei principali componenti strutturali del poro (Leung A.W.C. e Halestrap A.P., 2008). Essa è una delle più abbondanti proteine mitocondriali, in quanto i mitocondri sono gli organelli cellulari deputati alla sintesi di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa e permette un rapido trasporto

dell'ATP al di fuori dei mitocondri e una ricaptazione dell'ADP. Il ruolo fisiologico dell'ANT è quindi quello di catalizzare lo scambio elettrogenico dell'ATP<sup>4-</sup> con l'ADP<sup>3-</sup>, processo favorito dal potenziale di membrana mantenuto attraverso la membrana mitocondriale interna e che permette l'uscita dell'ATP dai mitocondri verso il citosol, in scambio con l'entrata dell'ADP (Halestrap A.P. e Brenner C., 2003). Evidenze dell'implicazione dell'ANT nella formazione del poro della MPT derivarono da studi in cui emerse che ATP e l'acido bongkrekico (BKA) inibivano l'apertura del poro (Javadov S. et al. 2009).

### **Cyp-D**

La Cyp D facilita l'apertura del poro della MPT attraverso un suo legame alla membrana mitocondriale interna, in un processo che è modulato dal calcio, dal fosfato e dalle ROS. CypD è il prodotto del gene Ppif ed è un membro della famiglia delle peptidil-prolil cis-trans isomerasi (PPIase) e grazie alla sua porzione N-terminale viene targettata nella matrice mitocondriale. In condizioni di aumentati livelli di calcio e/o ROS viene a verificarsi uno stretto legame della CypD alla membrana mitocondriale interna in un processo che è associato all'apertura del poro della MPT e che viene inibito dalla CsA (Di Lisa F. et al., 2011). La CypD si lega all'ANT e, in presenza di calcio, induce una modifica conformazionale che provoca successivamente l'apertura del poro (Javadov S. et al. 2009).

### **PiC**

Il fosfato è conosciuto da molto tempo essere uno dei principali attivatori dell'apertura del poro della MPT. Tuttavia solo recentemente è emerso un potenziale ruolo del PiC nella formazione del poro della MPT. (Javadov S. et al. 2009). I risultati di Leung e colleghi evidenziano come il PiC possa associarsi con l'ANT e legarsi alla CyP-D favorendo l'apertura del poro. (Leung A.W.C et al., 2008).

### **ESPOCHINASI**

L'esochinasi è un'importante proteina in grado di iniziare tutte le principali vie intracellulari di utilizzo del glucosio. L'esochinasi di tipo II è altamente espressa nella maggior parte delle cellule tumorali, nelle quali è principalmente localizzata a livello della membrana mitocondriale esterna (Rasola A. et al., 2010). L'esochinasi II integra le informazioni derivanti dai segnali dei fattori di crescita sopprimendo così il processo di morte cellulare in condizioni di adeguata nutrizione. Questo fatto è di cruciale importanza nel cancro, in quanto le cellule neoplastiche esibiscono un'iperattivazione delle vie metaboliche indotte dai fattori di crescita (Chiara F. et

al., 2008). Chiara e colleghi (Chiara F. et al., 2008), hanno dimostrato come la dissociazione dell'esochinasi II dai mitocondri costituisca un forte stimolo pro-apoptotico e che tale tipo di apoptosi richieda l'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale, indipendentemente dal coinvolgimento del VDAC. Tali osservazioni suggeriscono come l'esochinasi II mitocondriale sia in grado di trasmettere segnali di sopravvivenza che stabilizzano il poro nella conformazione chiusa, mentre un suo distacco dai mitocondri potrebbe propagare/indurre un cambio conformazionale di molecole presenti nella membrana mitocondriale interna, portando così ad una possibile apertura del poro (Chiara F. et al., 2008; Rasola A. et al., 2010).

### **APERTURA DEL PORO**

La MPT, fenomeno durante il quale si ha un brusco aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna risulta quindi nell'apertura di un poro del diametro di circa 3 nm che permette il passaggio di soluti con un peso molecolare non superiore a 1500 Da (Rasola A. e Bernardi P., 2007).

Tra le varie ipotesi formulate sull'apertura del poro, una delle più avvalorate è quella proposta da Halestrap e Davidson nel 1990. In questo modello è prevista l'apertura del poro indotta da calcio e Pi, con il coinvolgimento dell'ANT. In particolare Pi e P<sub>pi</sub> sono in grado di occupare i siti per l'ADP e per l'ATP rispettivamente sull'ANT, permettendo in questo modo l'apertura di un canale per il potassio insensibile alla CsA. Successivamente, il calcio può interagire con l'ANT legandosi ad un suo sito interno provocando delle modifiche conformazionali del trasportatore e permettendo così l'interazione della CypD, trasformando l'ANT in un canale sensibile alla CsA. (Halestrap A.P. e Davidson A.M., 1990).

In conseguenza all'apertura del poro, si ha un equilibrio attraverso la membrana mitocondriale interna delle molecole a basso peso molecolare, mentre le proteine vengono trattenute nei loro rispettivi compartimenti. La concentrazione delle proteine in matrice sarà così maggiore rispetto a quella del citoplasma e dello spazio intermembrana e ciò eserciterà una pressione colloidale-osmotica che indurrà lo swelling della matrice mitocondriale. Conseguentemente all'espansione della matrice si può avere una pressione sulla membrana mitocondriale esterna in grado di causare una sua possibile rottura con rilascio di citocromo c e di altri fattori pro-apoptotici e l'innescare dell'apoptosi (Halestrap A.P., 2009).

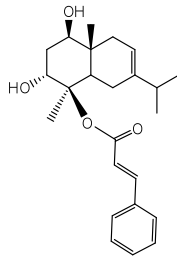
L'induzione dell'MPT è correlata anche con lo stato redox dei componenti mitocondriali quali i piridin nucleotidi e i gruppi tiolici di proteine di membrana (Kowaltowski A.J. et al., 2001).

In particolare, il suddetto fenomeno si instaura quando gruppi tiolici di proteine di membrana vengono ossidati, provocando così un cambiamento conformazionale. Il cross-linkage dei tioli è essenziale per questi cambiamenti conformazionali e sembra avvenire con molta probabilità a livello della ANT (Kowaltowski A.J. et al., 2001).

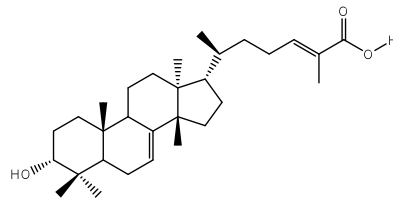
## Capitolo Secondo

### SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'attività biologica di composti ad attività antiproliferativa isolati da estratti naturali di origine vegetale e di loro derivati semisintetici. In particolare sono stati studiati gli effetti di un eudesmano isolato da *Verbesina persicifolia* e dei suoi derivati di semisintesi e di un triterpene isolato da *Amphipterygium adstringens*. Entrambe queste piante sono di origine messicana e vengono estensivamente utilizzate nella medicina tradizionale per il trattamento di diverse patologie, tra le quali il cancro.



4 $\beta$ -cinnamoilossi, 1 $\beta$ , 3 $\alpha$  diidrossieudesm-7,8-ene (composto **1**), eudesmano isolato da *Verbesina persicifolia*



acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD), triterpene isolato da *Amphipterygium adstringens*

È stata innanzitutto valutata l'attività antiproliferativa dei suddetti composti su linee cellulari tumorali umane allo scopo di determinare l'IC<sub>50</sub>, ossia la concentrazione di composto in grado di provocare il 50% di morte cellulare rispetto ad una coltura di controllo.

Successivamente si è proseguita l'indagine con l'obiettivo di stabilire il meccanismo d'azione alla base dell'attività antiproliferativa. In particolare si è focalizzata l'attenzione su uno dei principali bersagli intracellulari implicato nel processo apoptotico, ossia i mitocondri.

È ormai ben noto il ruolo fondamentale esercitato dai mitocondri, non soltanto nell'omeostasi energetica, attraverso il processo della fosforilazione ossidativa e la regolazione dei livelli del calcio, ma anche nella regolazione del processo di morte cellulare, attraverso l'induzione del fenomeno della MPT.

Si è valutata quindi l'azione dei composti sulla funzionalità di mitocondri isolati da fegato di ratto (RLM), attraverso la determinazione di parametri bioenergetici fondamentali quali la misura del potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ) e l'indice di controllo respiratorio (I.C.R.).

Dato il ruolo rilevante che l'MPT assume nel processo apoptotico, ne è stata esaminata l'eventuale induzione o amplificazione da parte dei composti oggetto di studio. È stato inoltre valutato l'eventuale stress ossidativo a carico di componenti mitocondriali quali gruppi tiolici appartenenti a proteine di membrana mitocondriale, piridin nucleotidi e la possibile produzione di perossido di idrogeno.

Infine è stato esaminato il rilascio di due importanti fattori pro-apoptotici, citocromo c ed AIF, che può avvenire in conseguenza ad alterazioni della struttura mitocondriale, come ad esempio in seguito all'instaurarsi del fenomeno della MPT.



## Capitolo Terzo

### MATERIALI E METODI

#### Composti in esame

I composti in esame sono stati isolati o sintetizzati presso il laboratorio del Prof. Mariano Martinez-Vazquez dell'Università Nazionale Autonoma del Messico (UNAM).

Per gli studi condotti sono state preparate soluzioni contenenti una quantità esattamente pesata di sostanza sciolta in dimetilsolfossido (DMSO). Tali soluzioni sono state conservate per tutto il periodo di utilizzo a temperatura ambiente.

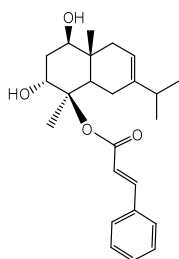
#### Materiale vegetale

Le parti aeree di *Verbesina persicifolia* sono state raccolte da piantagioni selvatiche che crescono nei dintorni di Santiago de Yancuictlaplan e Ixtinco (Puebla, México). Un campione è stato depositato all'Herbario Nacional dell'Universidad Nacional Autónoma de México con il numero MEXU-1054424.

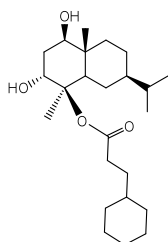
Le parti aeree della pianta (2100 g) sono state essiccate e polverizzate e successivamente macerate in esano per 48 ore. Il materiale solido è stato poi filtrato e l'estrazione è stata ripetuta cinque volte. Gli estratti raccolti sono stati concentrati ottenendo 109,6 g di residuo oleoso. Si è eseguita una cromatografia su gel di Si (250 g) di un'aliquota (49,7 g) di estratto esanico. Le frazioni eluite con esano-etil-acetato 2:1 sono state combinate e cristallizzate da una miscela di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hex dando **1** (282,5 mg di cristalli bianchi 0,013%); m.p. 134-135° C;  $[\alpha]_D -0.054$  (CHCl<sub>3</sub>, c 2.0).

L'identificazione del 4β-cinnamoilossi,1β,3α diidrossieudesm-7,8-ene (composto **1**) è stata ottenuta dal confronto delle sue caratteristiche fisiche e spettroscopiche con quelli pubblicati in letteratura (Martínez-Vázquez et al., 1983).

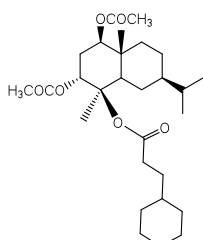
I derivati del 4β-cinnamoilossi,1β,3α diidrossieudesm-7,8-ene (composto **1**) (figura 3.1) sono stati ottenuti per acetilazione dei gruppi idrossilici e/o per eliminazione dei doppi legami -C-C-.



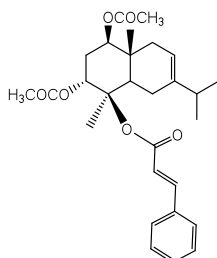
4β-cinnamoyloxy,1β,3α diidrossieudesm-7,8-ene (composto 1)



4β-(3-cicloesil)-propionilossi-1β, 3α - diidrossieudesmano (composto 2)



4β-(3-cicloesil)-propionilossi-1β, 3α - diacetilossi eudesmano (composto 3)

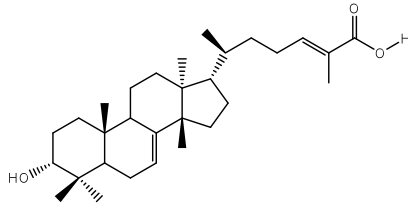


4β- Cinnamoyloxy, 1β, 3α - diacetilossieudesmano - 7,8 - ene (composto 4)

**Figura 3.1:** struttura chimica del composto 1 e dei suoi derivati di semisintesi.

I composti 3 e 4 sono stati ottenuti dai composti 1 e 2 rispettivamente per trattamento con anidride acetica e piridina. Il derivato 2 è stato ottenuto da 1 per trattamento con idrogeno e PtO<sub>2</sub> in Acetato di etile.

L'acido 3α-idrossimasticadienonico (AMD) (figura 3.2) è stato isolato da estratti esanici di *Amphipterygium adstringens* come descritto da Oviedo-Chavez I. et al., 2004.



**Figura 3.2:** struttura chimica di acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD)

## Studio dell'attività biologica

### Saggio dell'attività antiproliferativa

Per gli studi di attività biologica sono state prese in considerazione cinque linee cellulari tumorali umane e una linea cellulare non tumorale:

- **HeLa**, adenocarcinoma della cervice uterina
- **HL-60**, leucemia promielocitica
- **Hep-G2**, carcinoma epatocellulare
- **A-431**, carcinoma dello strato squamoso dell'epidermide
- **MSTO-211H**, mesotelioma bifasico
- **MET5A**, mesotelio

Le cellule **HeLa** crescono in monostrato, in presenza di terreno Nutrient Mixture F-12 (Sigma) e di 10% di siero bovino fetale (Seromed).

Le cellule **HL-60** invece crescono in sospensione nel terreno di coltura RPMI-1640 (Sigma), con l'aggiunta di 15% di siero bovino fetale (Seromed).

Le cellule **Hep-G2** e **A-431** sono state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) e del 10% di siero bovino fetale (Seromed).

Le cellule **MET5A** sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (R8755) (Sigma) addizionato di Hepes (1%, Sigma) e Na-piruvato (1%, Sigma) e del 10% di siero bovino fetale (Seromed).

Le cellule **MSTO-211H** crescono in monostrato, in terreno RPMI-1640 Medium (R6504 Sigma), addizionato di Hepes (2.383 g/L, Sigma), NaHCO<sub>3</sub> (1.5 g/L, Sigma), Na-piruvato (0.11 g/L, Sigma), glucosio (2.5 g/L, Sigma) e del 10% di siero bovino fetale (Seromed).

Prima del loro utilizzo, ai terreni, è stata aggiunta una miscela contenente due antibiotici (100 U/mL di penicillina sale sodico, 100 µg/mL di streptomina solfato) ed un antifungino (0,25 µg/mL di anfotericina B) (Sigma).

Gli strumenti utilizzati per la manipolazione delle linee cellulari sono: una cappa a flusso laminare (ICN faster modello Ultrasafe 48) e un incubatore (Forma Scientific modello 3111) a 37°C, in atmosfera umidificata in presenza di H<sub>2</sub>O al 99% e di CO<sub>2</sub> al 5%.

Per la determinazione dell'attività antiproliferativa, sono state utilizzate piastre sterili da 24 pozzetti, seminando 4 x 10<sup>4</sup> cellule per pozzetto.

Le metodiche usate per la manipolazione delle cellule sono diverse a seconda della linea cellulare considerata:

- **HeLa, A-431, HepG2, MET5A**: dopo 24 ore dalla semina si sostituisce il terreno di coltura con un ugual volume di terreno completo, aggiungendo poi la

sostanza in esame a diverse concentrazioni. In seguito al trattamento, le cellule vengono incubate per altre 72 ore ed infine contate.

- **MSTO-211H, HL-60:** passate 24 ore dalla semina si aggiunge il composto in esame alle diverse concentrazioni. In seguito al trattamento, le cellule vengono incubate per altre 72 ore ed infine contate.

Al fine di escludere qualsiasi effetto attribuibile al solvente, si aggiunge ad uno dei pozzetti di riferimento (cellule non trattate) il solvente al volume massimo utilizzato nell'esperimento che è sempre stato non superiore a 0,5%.

Anche per l'esecuzione della conta cellulare si sono seguite procedure leggermente diverse a seconda della linea cellulare presa in considerazione:

- **HeLa, A431, HepG2, MET5A:** si elimina il terreno di coltura e si lavano con tampone PBS. Le cellule adese alla superficie della piastra vengono staccate con l'aggiunta di una soluzione di Tripsina (Sigma)-EDTA (Sigma), e successivamente contate al microscopio ottico in seguito a colorazione con Trypan Blue 1% (p/v in tampone PBS). Per la conta cellulare si utilizza una cameretta di Burker.
- **MSTO-211H:** si elimina il terreno di coltura e le cellule adese alla superficie della piastra vengono staccate con l'aggiunta di una soluzione di Tripsina (Sigma)-EDTA (Sigma), e successivamente contate al microscopio ottico in seguito a colorazione con Trypan Blue 1% (p/v in tampone PBS). Per la conta cellulare si utilizza una cameretta di Burker.
- **HL-60:** si preleva un'aliquota di sospensione cellulare e si aggiunge Trypan Blue 1% (p/v in tampone PBS), procedendo successivamente al conteggio al microscopio ottico. Per la conta cellulare si utilizza una cameretta di Burker.

Si utilizza il colorante Trypan Blue in quanto è in grado di attraversare le membrane biologiche la cui permeabilità è stata compromessa, permettendo in questo modo la distinzione tra cellule vive (che non saranno colorate) e morte (che risulteranno invece colorate).

I dati di citotossicità ottenuti verranno espressi in termini di  $IC_{50}$ , ossia concentrazione ( $\mu M$ ) di composto in grado di inibire la crescita cellulare del 50% rispetto ad una coltura di controllo.

Il Tampone PBS (Phosphate buffer saline), pH=7, è costituito da: NaCl 0,1 (cloruro di sodio, Merk), KCl 0,002 M (cloruro di potassio, Sigma),  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  0,008 M (sodio-monoidrogenofosfato-biidrato, Sigma),  $KH_2PO_4$  0,0015 M (potassio-biidrogenofosfato, Panreac).

## **Saggio di frammentazione del DNA**

Per l'esecuzione di questo saggio si allestiscono capsule Petri contenenti ciascuna  $5 \times 10^5$  cellule HeLa; trascorse 24 ore dalla semina si sostituisce il terreno con un ugual volume di terreno fresco e siero bovino fetale. Si trasferisce direttamente una capsula in incubatore (controllo di riferimento), mentre alle altre si aggiungono rispettivamente: Cis-platino  $50 \mu\text{M}$  e i composti in esame alla concentrazione indicata.

Dopo 24 ore di incubazione si staccano le cellule, usando una soluzione di Tripsina-EDTA non sterile, e si centrifugano. Ciascun precipitato viene risospeso in  $50 \mu\text{L}$  di Tampone TE (pH=8) a cui si aggiungono  $500 \mu\text{L}$  di Tampone di Lisi.

Il Tampone TE utilizzato per risospendere il pellet di DNA è costituito da TRIS  $0,01 \text{ M}$  (Sigma), EDTA  $0,001 \text{ M}$  (Sigma) e va conservato ad una temperatura non superiore ai  $4^\circ\text{C}$ . Il Tampone di lisi contiene SDS  $0,5\%$  (Sigma), RNAasi  $2\%$  (R-4875, Sigma), TRIS  $0,01 \text{ M}$  (Sigma), EDTA  $0,1 \text{ M}$  (Sigma) e va conservato ad una temperatura non superiore ai  $4^\circ\text{C}$ .

Le soluzioni vengono poi incubate a  $37^\circ$  per 1 ora e successivamente si aggiunge proteinasi K (Sigma) ad una concentrazione finale di  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; infine le soluzioni sono incubate a  $50^\circ\text{C}$  per 3 ore.

Trascorse le tre ore di incubazione si aggiunge a ciascun campione un ugual volume di fenolo (Fluka); si centrifuga a  $5000 \text{ g}$  per 15 minuti e si recupera la fase acquosa sopranatante. Si ripete questo procedimento per tre volte.

Infine, alla soluzione acquosa si aggiungono  $0,2$  volumi di una soluzione  $10 \text{ M}$  di acetato d'ammonio (Fluka) e  $2$  volumi di etanolo assoluto (Carlo Erba reagents) freddo. Si lava il DNA precipitato due volte con etanolo al  $70\%$ , si lascia asciugare e si risospende in  $50 \mu\text{L}$  di tampone TE (Sambrook J. et al., 1989).

Le soluzioni di DNA così ottenute si lasciano idratare a  $4^\circ\text{C}$  per una notte, si agitano per 30 minuti e si aggiungono  $25 \mu\text{L}$  di Tampone di caricamento.

Il Tampone di caricamento è costituito da Blu di Bromofenolo  $0,25\%$ , Xilene cianolo  $0,25\%$ , Glicerolo in acqua  $58\%$  e va conservato ad una temperatura non superiore ai  $4^\circ\text{C}$ .

Di ciascuna soluzione di DNA si caricano  $20 \mu\text{L}$  su gel di agarosio allo  $1\%$  in tampone TBE.

Il Tampone TBE è costituito da TRIS  $0,09 \text{ M}$  (Sigma), acido borico  $0,09 \text{ M}$  (Fluka), EDTA  $0,002 \text{ M}$  (Sigma) a pH 8.

La corsa elettroforetica viene condotta a  $30 \text{ V}$  per 8 ore con un apparecchio per elettroforesi orizzontale e utilizzando un alimentatore CONSORT E443 che permette di ottenere un intervallo di voltaggio da  $1$  a  $400 \text{ V}$ .

Terminata la corsa, il gel viene colorato con una soluzione di etidio bromuro (E-1510, Sigma) 1 µg/mL in tampone TBE per 20 minuti e fotografato con transilluminatore UV dotato di CCD Camera (Bio-Rad Gel DocXR).

### **Determinazione della frammentazione di PARP**

Si allestiscono capsule Petri contenenti ciascuna  $2,5 \times 10^5$  cellule HeLa; dopo 24 ore dalla semina il terreno è sostituito con un ugual volume di terreno fresco e siero bovino fetale. Una capsula è stata messa direttamente in incubatore (bianco di riferimento), le altre sono state trattate con Etoposide 25 µM e i composti in esame alla concentrazione indicata.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, si procede alla raccolta delle cellule con il Ripa buffer (1 ml)(PBS 1%, Igepal 1% (Sigma), Sodio desossicolato 0,5% (Sigma), SDS 0,1% (Sigma), PMSF (phenylmethanesulfonylfluorid) 2 mM (Sigma)). Dopo aver posto i campioni in ghiaccio per 30 minuti, si procede centrifugando a 4°C a 10000 rpm per 10 minuti i lisati cellulari, recuperando successivamente il surnatante. Si determinano le proteine cellulari spettrofotometricamente a 595 nm utilizzando il reattivo di Bradford (in 200 ml di reattivo: 6 mg di Coomassie G250, 20 ml di etanolo 100%, 13 ml di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, si porta a volume con acqua bidistillata). Si preparano così i campioni per l'elettroforesi aggiungendo Simple buffer (SB 5X) (Tris 0,5 M, glicerolo 5%, SDS 10%) e colorante (SB 5X, βmercaptoetanolo 10%, blu di bromofenolo 0,05%) e portati a 100°C per 5 minuti per favorire la denaturazione delle proteine.

Si esegue la corsa elettroforetica a 35 mA/gel su gel di poliacrilamide al 10%. In seguito alla separazione delle proteine si procede con il Western blotting per il trasferimento delle stesse su membrana di nitrocellulosa (Mini Trans-Blot Cell, MTB Module, BioRad) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, Glicina 0,2 M, metanolo 20%). Si applica una corrente costante di 350 mA per un tempo totale di un'ora. Alla fine del blotting la membrana viene mantenuta in agitazione per 30 minuti in tampone di saturazione costituito da TBS 1X (preparato partendo da una soluzione 20X costituita da Tris 1M e NaCl 3M a pH 7.5) e BSA al 3%. Successivamente, la membrana viene incubata over night a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale di coniglio Anti-PARP (Epitomics) diluito in tampone costituito da TBS 1X, BSA 1% e sodio azide 0,04%.

Si eseguono tre lavaggi della membrana da 10 minuti ciascuno in tampone lavaggio (TBS 10X, Tween 0,1%) in continua agitazione e la si incuba poi per 30 minuti con l'anticorpo secondario (antirabbit, Amersham) coniugato con la perossidasi e si procede con la rivelazione immunologica utilizzando un opportuno kit Amersham

ECL (Enhanced chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents. La rivelazione è effettuata tramite autoradiografia. Per verificare che nei campioni sia presente la stessa quantità di proteine si procede con la rivelazione immunologica dell' $\alpha$ -tubulina (proteina ubiquitaria) utilizzando un anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology) (Laemmli UK, 1970).



## **Studio dell'attività mitocondriale**

### **Preparazione dei mitocondri di fegato di ratto**

La metodica utilizzata per isolare i mitocondri di fegato di ratto si basa sul metodo di Scheneider e Hogeboon (1950), apportando però alcune modifiche.

Per questa preparazione si procede con centrifugazione differenziale utilizzando una centrifuga Beckman J2-21 con rotore Ja-17 refrigerata a 0-5°C.

Dato che tutte le operazioni sono eseguite alla temperatura di 1-2° C, all'inizio della procedura si pongono le attrezzature e le soluzioni da utilizzare in ghiaccio fondente.

Si rimuove il fegato da un ratto di ceppo Wistar, del peso di circa 180 grammi e a digiuno da 16 ore. Si procede ponendolo in un becker contenente il medium di isolamento costituito da saccarosio 0.25 M, Na-HEPES 5 mM, EGTA 2 mM, pH 7.4. Il fegato viene tagliuzzato finemente e successivamente lavato con lo stesso medium in modo da eliminare tutto il sangue. I frammenti ottenuti vengono omogeneizzati mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore di Potter. A questo punto si eseguono tre differenti centrifugazioni.

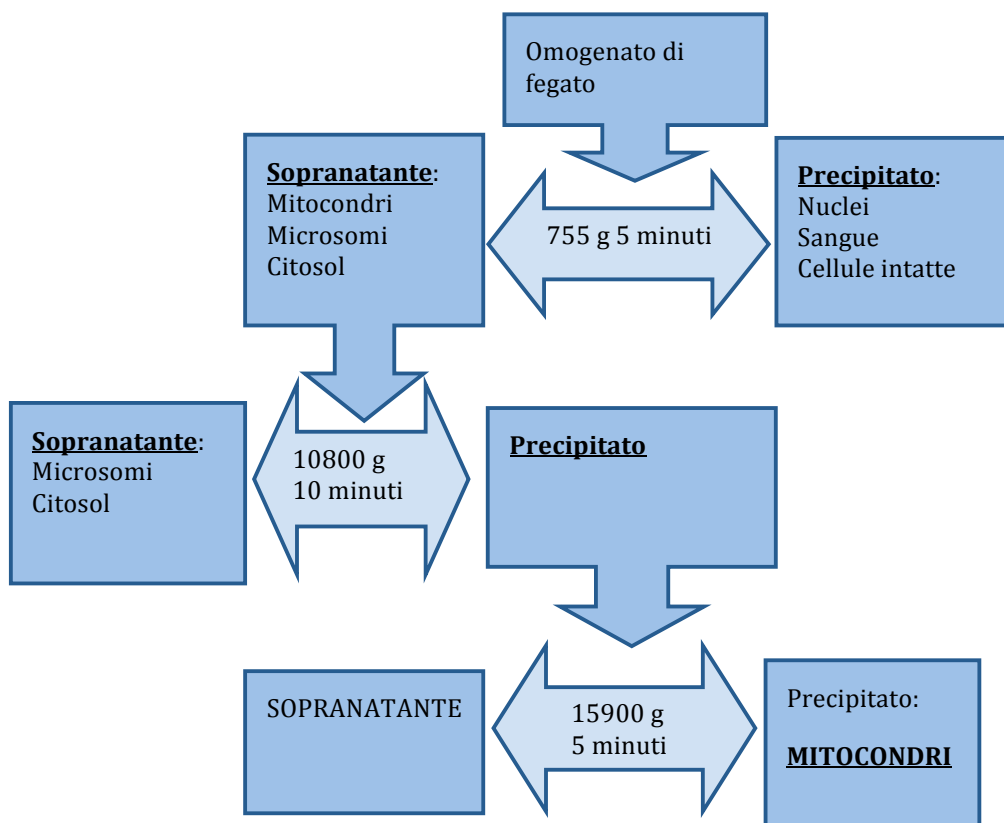
La prima centrifugazione effettuata a 2300 rpm (755 g) per 5 minuti permette di ottenere nel surnatante (che verrà utilizzato per la successiva centrifugazione) mitocondri, microsomi e citosol. Il pellet contenente invece nuclei, cellule intatte e tessuto connettivo viene eliminato.

Il soprannatante così ottenuto, viene trasferito in due provettoni e si procede con la seconda centrifugazione a 9000 rpm (10800 g) per 10 minuti. Si separano così il citosol e i microsomi dai mitocondri che in questo caso costituiranno il precipitato, assieme ai residui di grasso.

Il grasso viene poi eliminato dalle pareti con carta bibula e si utilizzerà del medium (senza la presenza di EGTA) per eliminare la parte più superficiale del precipitato (costituita da mitocondri più leggeri) e le contaminazioni di grasso. Il pellet va poi risospeso con una bacchettina di vetro in 20-30 ml di medium e omogeneizzato a mano in un provettone Potter.

La sospensione uniforme ottenuta viene sottoposta ad una terza centrifugazione, effettuata a 11000 rpm (15900 g) per 5 minuti. Si elimina il surnatante, che risulta limpido e si lava delicatamente il pellet per eliminare lo strato superficiale, costituito da mitocondri rotti o danneggiati. Il pellet viene risospeso con una bacchetta di vetro in 2 ml di medium ed omogeneizzato a mano in una piccola provetta Potter.

Il contenuto va conservato in una piccola provetta immersa nel ghiaccio fondente.



**Schema3.1.** Schema riassuntivo della preparazione dei mitocondri di fegato di ratto

### **Determinazione quantitativa delle proteine mitocondriali secondo il metodo di Gornall**

Le proteine mitocondriali vengono dosate mediante spettrofotometro secondo il metodo di Gornall (1949). Questo metodo sfrutta la reazione del biureto, ossia la formazione di un complesso di colore violetto tra lo ione rameico contenuto nel reattivo di Gornall e l'azoto amidico delle proteine.

#### Reattivo di Gornall

Solfato rameico (1,5 g/l)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Tartrato di sodio e potassio (6,0 g/l)  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

Idrossido di sodio (30,0 g/l)  $\text{NaOH}$

#### Preparazione del reattivo:

1,5 g di solfato rameico e 6 g di tartrato di sodio e potassio vengono sciolti in 500 ml di acqua bidistillata. Agitando si aggiungono 300 ml di  $\text{NaOH}$  10% p/v e si porta a volume con acqua bidistillata fino a raggiungere un litro finale.

Il reattivo va conservato ben chiuso e al buio, data la sua sensibilità alla luce e può essere utilizzato fino a quando non presenta precipitati.

Metodo:

per la determinazione delle proteine mitocondriali, normalmente si esegue una misura in doppio rispetto ad un blank non contenente mitocondri.

Si allestiscono 4 provette, una per blank, una per il campione e due per gli standard di albumina.

Blank: 0,5 ml acqua

1 ml di desossicolato al 3%

1,5 ml di reattivo di Gornall

Campione: 0,475 ml acqua

1 ml di desossicolato al 3%

0,025 ml di sospensione mitocondriale

1,5 ml di reattivo di Gornall

Standard con albumina: 0,25 ml acqua

1 ml di desossicolato al 3%

0,25 ml o 0,50 ml di albumina (4mg/ml)

1,5 ml di reattivo di Gornall

Lo standard (1 mg/3 ml) viene utilizzato per verificare la corretta preparazione del reattivo di Gornall: 1 mg di albumina con reattivo dà una assorbanza allo spettrofotometro di 0,090 alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Il reattivo di Gornall agisce complessando le proteine secondo la reazione del biureto, e produce un colore violetto la cui assorbanza massima è a 540 nm. La reazione avviene a 20° C per 10 minuti. La quantità delle proteine presenti nei campioni viene ricavata attraverso una retta di taratura, ottenuta utilizzando le soluzioni standard con albumina.

**Determinazione dello “swelling” mitocondriale**

Il termine “swelling” indica il rigonfiamento mitocondriale. I mitocondri, infatti, si comportano come degli osmometri e possono rigonfiarsi o contrarsi, attraverso accumulo o espulsione di acqua, secondo la tonicità del mezzo in cui sono sospesi.

In particolari condizioni, ossia quando grandi quantità di soluto entrano nella matrice mitocondriale causando un aumento della pressione osmotica, si può verificare uno “swelling” di grande ampiezza.

Questo fenomeno viene valutato spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 540 nm. mediante la tecnica “light-scattering” (LS), che consiste nella dispersione del raggio luminoso quando colpisce la sospensione mitocondriale.

Se si verifica un incremento del volume di matrice, si osserva una riduzione della dispersione del raggio luminoso e, di conseguenza, una diminuzione apparente di assorbanza registrata. La tecnica LS è semplice, molto sensibile e rapida e consente un continuo monitoraggio dello "swelling".

Per la valutazione dello "swelling" mitocondriale si è utilizzato uno spettrofotometro UV/VIS KONTRON UVIKON modello 922, termostato a 20°C, fissando la lunghezza d'onda a 540 nm.

### **Determinazione del potenziale di membrana con l'elettrodo ionoselettivo**

La misura del potenziale della membrana mitocondriale viene effettuata mediante l'uso di un elettrodo ionoselettivo (Affolter H. e Sigel E., 1979 e Kamo N. et al., 1979).

#### Funzionamento dell'elettrodo ionoselettivo

Per elettrodo ionoselettivo si intende una semipila complessa, formata da un elettrodo reversibile all'anione, che nel nostro caso è il  $\text{Cl}^-$  (elettrodo di riferimento interno), inserito in un adatto contenitore tubolare in cui si trova una soluzione a concentrazione nota e fissa di cloruro di tetrafenilfosfonio ( $\text{TPP}^+\text{Cl}^-$ ), a contatto con una membrana permeoselettiva allo ione  $\text{TPP}^+$ , la quale costituisce il diaframma di chiusura del contenitore stesso.

Tale membrana viene a separare due soluzioni a diversa concentrazione del medesimo elettrolita ( $\text{TPP}^+\text{Cl}^-$ ).

Lo ione  $\text{TPP}^+$  e  $\text{Cl}^-$  sono definiti rispettivamente come il controione e lo ione coordinato della membrana, poiché le loro cariche sono rispettivamente di segno opposto o uguale a quello della carica fissa presente nella struttura della membrana, dovuta al  $\text{TPB}^-$  (tetrafenilborato). Poiché la membrana è permeabile allo ione  $\text{TPP}^+$  è definita cationica.

Questa semipila presenta un potenziale elettrico che varia linearmente con il logaritmo dell'attività dello ione  $\text{TPP}^+$  nella soluzione da titolare.

Accoppiata ad un elettrodo di riferimento a potenziale costante (elettrodo di riferimento esterno), essa origina una pila, la cui forza elettromotrice è funzione lineare del logaritmo dell'attività dello ione da misurare.

La pila presenta una  $\Delta E$  che è misura della tendenza del decorso di un processo spontaneo che consiste nel trasferimento di controioni  $\text{TPP}^+$  dalla soluzione a concentrazione più alta  $c''$  (fissa) a quella più bassa  $c'$  (incognita).

Essendo i potenziali degli elettrodi di riferimento interno ed esterno costanti, la differenza di potenziale della pila risulta determinata soltanto dal potenziale di

membrana (che è funzione del rapporto tra concentrazione incognita e nota del solo controione TPP+) e del potenziale interliquido E che però è minimizzato per effetto del ponte salino.

La  $\Delta E$  della pila è pertanto esprimibile in questo modo:

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

$$E_2 = E_{K''} + E_l$$

$$E_1 = E_{K'} + E_x$$

$E_1$  = potenziale elettrodo ionoselettivo

$E_2$  = potenziale elettrodo di riferimento esterno + potenziale di giunzione interliquido

$E_{K''}$  = potenziale elettrodo di riferimento interno

$\Delta E_x$  = differenza di potenziale della membrana ionoselettiva

$E_{K''}$  = potenziale elettrodo di riferimento esterno

$E_l$  = potenziale di riferimento interliquido  $\approx 0$

$$\Delta E = E_{K'} + \Delta E_x - E_{K''} - E_l$$

$$\Delta E = E_{K'} - E_{K''} + \Delta E_x$$

$$E_{K'} - E_{K''} = z(\text{cost})$$

$$\Delta E = E_0 + \frac{2,3RT}{nF} \log c'' - E_0 - \frac{2,3RT}{nF} \log c'$$

$$E_0 + \frac{2,3RT}{nF} \log c'' = U(\text{cost})$$

$$\Delta E_x = U - E_0 - \frac{2,3RT}{nF} \log c'$$

$$\Delta E \text{ della pila risulta essere } \Delta E = z + U - E_0 - \frac{2,3RT}{nF} \log c'$$

ponendo  $z + U - E_0 = K$  si ha:

$$\Delta E = K - \frac{2,3RT}{nF} \log c' \tag{1}$$

$K$  = costante che riporta la somma algebrica di tutti i potenziali costanti presenti nell'elettrodo

$F = 96485 \text{ coulombs moli}^{-1} = 23.06 \text{ Kcal volt}^{-1} \text{ moli}^{-1}$

$R = 8.314 \text{ Joule moli}^{-1} \text{ K}^{-1} = 1.987 \text{ cal moli}^{-1} \text{ K}^{-1}$

$T = 20^\circ\text{C}$

Il responso dell'elettrodo è lineare con il logaritmo della concentrazione di TPP<sup>+</sup> con un incremento di circa 58 mV ogni decade di variazione della concentrazione di TPP<sup>+</sup> fino a che la concentrazione scende a 10<sup>-7</sup> M, in accordo con l'equazione di Nerst. Il potenziale di membrana è determinato misurando con l'elettrodo la distribuzione di TPP<sup>+</sup> attraverso la membrana mitocondriale.

Essendo la membrana mitocondriale permeabile al TPP<sup>+</sup>, questo si distribuisce secondo l'equazione di Nerst:

$$\Delta\Psi = \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{[TPP^+]_e}{[TPP^+]_i} = 58(mV) \log \frac{[TPP^+]_e}{[TPP^+]_i} \quad (2)$$

È necessario che la legge di conservazione di massa sia rispettata:

$$V[TPP^+]_e + v[TPP^+]_i = V[TPP^+]_0 \quad (3)$$

V= volume del medium contenente 1 mg di proteine mitocondriali (1ml)

v= volume dello spazio interno mitocondriale corrispondente a 1 mg di proteine mitocondriali (~ 1 µl)

[TPP<sup>+</sup>]<sub>0</sub>= concentrazione TPP<sup>+</sup> prima dell'aggiunta dei mitocondri

Inserendo l'equazione (3) nella (2) e correlando il ΔE al [TPP<sup>+</sup>]<sub>e</sub> con opportuni passaggi matematici, si ottiene:

$$\Delta\Psi = \log 58 \frac{v}{V} - 58 \log(10^{(\Delta E - \Delta E_0)/58} - 1) \quad (4)$$

ΔE<sub>0</sub>= differenza di potenziale dell'elettrodo prima dell'aggiunta dei mitocondri.

Per calcolare correttamente il ΔΨ è necessario conoscere il valore del rapporto tra v/V, cioè in definitiva il valore di v.

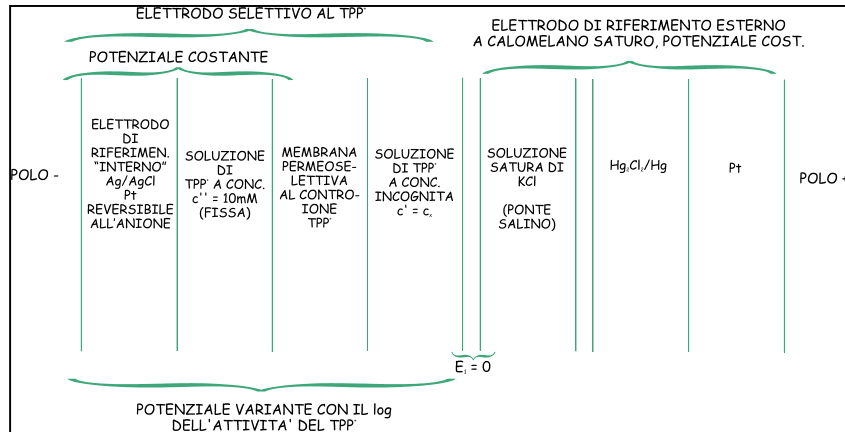
Se non ci sono variazioni significative del volume mitocondriale durante l'esperimento, il valore del termine 58 log v/V rimane costante.

Il valore di v è stato calcolato misurando la distribuzione di saccarosio <sup>14</sup>C e <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (Palmieri e Klingenberg, 1979) ed è risultato essere di 1 µl/mg di proteine mitocondriali.

Jensen e coll. (1986), confrontando il valore di ΔΨ ricavato misurando la distribuzione di <sup>86</sup>Rb con il valore di ΔΨ, misurato tramite elettrodo, propongono di correggere quest'ultimo con la seguente relazione:

$$\Delta\Psi_{Rb} = (\Delta\Psi_{el} - 66,16mV)/0,92 \quad (5)$$

In cui  $\Delta\Psi_{el}$  è il valore ricavato dalla formula (4).



**Figura 3.3:** elettrodo ionoselettivo

### Determinazione sperimentale del $\Delta\Psi$

Prima di procedere alla misura del  $\Delta\Psi$  è eseguita la cosiddetta taratura dell'elettrodo, che consiste nella determinazione sperimentale del rapporto  $(2,3 RT)/nF$ , che corrisponde alla pendenza della retta:

$$\Delta E = K - \frac{2,3RT}{nF} \log c'$$

A tale scopo si predispone nella vaschetta, dove sarà eseguito l'esperimento, il medium di incubazione senza mitocondri. S'inseriscono gli elettrodi e si eseguono varie aggiunte successive di TPP<sup>+</sup>, registrando ogni volta la variazione dell'elettrodo. È opportuno non aggiungere troppo TPP<sup>+</sup> perché potrebbe depolarizzare la membrana mitocondriale. La concentrazione ottimale è dell'ordine di 1-2  $\mu\text{M}$ .

Per calcolare la pendenza si costruisce la retta riportando i valori di  $\Delta E$  ottenuti in funzione del  $\log [TPP^+]$  e si estrapola il valore di  $\Delta E$  corrispondente ad una concentrazione di TPP<sup>+</sup> di 10 volte. Il valore teorico secondo Nerst dovrebbe essere 58 mV.

Operata la taratura, si aggiungono i mitocondri al medium di incubazione; il TPP<sup>+</sup> penetra attraverso la membrana mitocondriale e si distribuisce tra medium e matrice secondo l'equazione di Nerst, originando una differenza di potenziale dell'elettrodo, rispetto al valore raggiunto al termine della taratura, del valore di  $\Delta E - \Delta E_0$ , che è segnalato da una deflessione della traccia, fornita dal "recorder" cui è collegato l'elettrodo (diminuzione della concentrazione di TPP<sup>+</sup> nel medium).

Inserendo questa variazione di differenza di potenziale dell'elettrodo nell'equazione (4) si ottiene il valore di  $\Delta\Psi$  corrispondente.

## Determinazione fluorimetrica dello stato redox dei nucleotidi piridinici mitocondriali

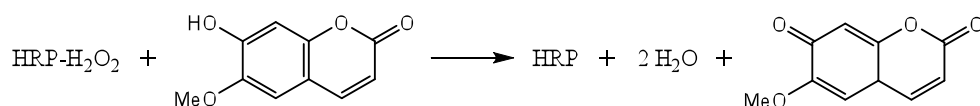
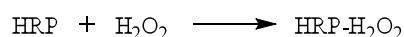
L'ossidazione dei nucleotidi piridinici viene misurata attraverso la variazione di fluorescenza, determinata dalla variazione del rapporto NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>. Si utilizza a questo scopo uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-5000.

La molecola di NAD(P)H, eccitata da una radiazione incidente, emette una radiazione ad energia ridotta: i monocromatori dello spettrofluorimetro sono quindi regolati in modo da avere un raggio di eccitazione di 354 nm e un raggio d'emissione di 462 nm.

## Dosaggio fluorimetrico del perossido di idrogeno

La produzione di perossido di idrogeno è misurata fluorimetricamente con il metodo della scopoletina.

I mitocondri vengono incubati a 20°C nel medium standard, in presenza di scopoletina (2 µM) e perossidasi di rafano (HRP) alla concentrazione di 10 µM. La perossidasi, in presenza di perossido di idrogeno, ossida la scopoletina (6-metossi-7-idossi-1,2-benzopirone) (Loschen et al., 1971) con perdita della sua fluorescenza secondo la reazione:



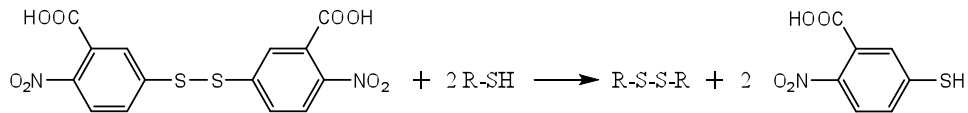
La variazione di fluorescenza è valutata mediante uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-5000, impostato con lunghezza d'onda di eccitazione a 350 nm ed emissione a 460 nm.

Mediante una curva di taratura costruita usando perossido di idrogeno esogeno a concentrazioni note, si estrapolano, dai valori di fluorescenza misurati nelle varie prove, le corrispondenti quantità di perossido di idrogeno prodotte.



### Determinazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) ridotti mitocondriali

Questa tecnica permette di misurare spettrofotometricamente la quantità dei tioli ridotti (-SH) nelle varie situazioni di incubazione utilizzando come indicatore di gruppi -SH l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Elmann G.E. 1959 e modificato da Bindoli A. e Rigobello M.P., 2002). Il DTNB reagendo con i gruppi -SH allo stato ridotto, si scinde in due molecole di carbossi-nitro-tiofenolo (CNTP) secondo la reazione:



Si preparano delle incubazioni in cuvette da 1 ml di medium standard con le aggiunte previste dall'esperimento e i mitocondri alla concentrazione di 1mg/ml; a questo punto si segue lo swelling a 540 nm, terminato il quale si pone il contenuto di ogni cuvetta in provette eppendorf.

Tali provette vengono centrifugate per 1 minuto a 12000 rpm (con centrifuga Centrifuge 5415C) e, eliminato il sopranatante, viene risospeso il pellet in 1 ml di medium standard per procedere nuovamente a centrifugazione.

A questo punto si elimina il sopranatante di ogni provetta, si aggiungono 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata e si agita fino a completa solubilizzazione, quindi si aggiungono, ad ogni pellet solubilizzato, 200  $\mu\text{l}$  di medium di solubilizzazione contenente EDTA 10 mM, Tris-Base 0.2 M e SDS 1% (pH=8.3).

La quantità dei gruppi -SH viene valutata misurando l'assorbanza di ogni campione a 412 nm (con spettrofotometro UV/VIS KONTRON UVIKON 922) dopo l'aggiunta di DTNB 1 mM in tutti i campioni allestiti, rispetto ad un campione di riferimento. Dopo l'aggiunta di DTNB si attendono 2-3 minuti per far sviluppare la reazione tra DTNB ed i gruppi tiolici ridotti presenti nel campione.

Il campione di controllo di taratura ha la seguente composizione:

- 1 ml di medium di solubilizzazione (EDTA 10 mM, Tris-Base 0.2 M e SDS all'1%),
- DTNB 1 mM.

Conoscendo il coefficiente di estinzione molare del DTNB ( $\epsilon_{\text{DTNB}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), si ricava la concentrazione dei gruppi tiolici utilizzando la legge di Lambert-Beer:

$$\Delta A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare,

$l$  = lunghezza del cammino ottico,

$C$  = concentrazione dei tioli,

$\Delta A$  = variazione dell'assorbanza misurata contro il controllo in presenza di DTNB.

La concentrazione finale dei tioli ridotti viene espressa in percentuale prendendo come riferimento il controllo incubato con il solo medium (100% dei tioli ridotti).

### **Misura del consumo di ossigeno tramite l'elettrodo di Clark**

La misura del consumo di ossigeno viene effettuata utilizzando l'elettrodo di Clark.

L'elettrodo è composto da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl satura. L'elettrodo è separato dalla soluzione in esame da una membrana permeabile all'ossigeno in Teflon.

Quando ai due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale di 0,6-0,8 mV, si ha generazione di elettroni all'anodo che sono utilizzati al catodo per ridurre l'ossigeno. Ai due elettrodi avvengono perciò le seguenti reazioni:

- anodo:  $4 \text{ Ag} + 4 \text{ Cl}^- \rightarrow 4 \text{ AgCl} + 4 \text{ e}^-$
- catodo:  $\text{O}_2 + 4 \text{ H}^+ + 4 \text{ e}^- \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O}$

in questo modo si viene ad instaurare una corrente proporzionale alla tensione di ossigeno del campione, generata dal passaggio di elettroni dal catodo all'anodo. Il passaggio di tale corrente viene registrato da un recorder e si ottiene perciò una curva dell'intensità di corrente nel tempo da cui determinare le variazioni di ossigeno nel tempo.

### **Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)**

La determinazione dell'indice di controllo respiratorio fornisce un'utile indicazione dello stato funzionale dei mitocondri, cioè il grado di accoppiamento del processo di ossidazione con quello di fosforilazione. Tali processi sono interdipendenti, nel senso che nei sistemi integri non solo l'ossidazione condiziona la fosforilazione, ma quest'ultima condiziona la velocità dell'ossidazione. L'energia che deriva dall'ossidazione dei substrati viene utilizzata per la formazione dell'ATP, in presenza di ADP e di fosfato. La mancanza di accettori del fosfato impedisce anche la respirazione perchè il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria può essere bloccato a livello degli accettori del fosfato. In queste condizioni il consumo di ossigeno è trascurabile (stato 4), mentre aumenta quando si aggiunge un accettore del fosfato come l'ADP (stato 3); quando questo risulta essere completamente fosforilato, il consumo di ossigeno rallenta. La determinazione dell'I.C.R. viene effettuata incubando i mitocondri di fegato di ratto (1 mg prot/ml) a 20°C nel medium standard. L'elettrodo di Clark viene immerso in una vaschetta in cui è posta

la sospensione mitocondriale, tenuta in costante agitazione in modo tale che la concentrazione di ossigeno disciolto sia mantenuta uniforme in soluzione. Quando i mitocondri si trovano in presenza di un eccesso di substrato, respirano molto lentamente. L'aggiunta di ADP 0.3 mM, in presenza di fosfato, determina un brusco aumento del consumo di ossigeno seguito da un ritorno allo stato 4 di respirazione, dopo che tutto l'ADP è stato fosforilato ad ATP. Il rapporto tra le velocità di consumo dell'ossigeno in presenza ed in assenza di ADP, costituisce l'indice di controllo respiratorio. Tanto più elevato risulta essere l'indice, tanto più la fosforilazione ossidativa è accoppiata strettamente al flusso degli elettroni lungo la catena respiratoria. Un buon I.C.R. deve avere un valore superiore a 3.

### **Determinazione del contenuto mitocondriale del calcio**

Le incubazioni, nelle varie condizioni descritte nelle figure, vengono termostate a 20°C e, mediante l'uso di agitatori magnetici, mantenute omogenee. Dopo l'aggiunta dei mitocondri (1 mg/ml) al mezzo di incubazione, a intervalli di tempo prefissati, vengono fatti prelievi di 1 ml di sospensione che vengono subito centrifugati con centrifuga 5415C a 15800 g per 1'.

Il surnatante viene rimosso e al pellet viene aggiunto 1 ml di medium standard, si agita leggermente e si prosegue ad una successiva centrifugazione. Viene rimosso nuovamente il surnatante e si solubilizza il pellet con 1 ml di soluzione solubilizzante contenente Na-EDTA 1 mM, pH 7.4, NaCl 0,1% (p/v), desossicolato sodico (DOC) 0,9 % (p/v). La concentrazione del calcio presente nel pellet viene determinato mediante uno spettrofotometro ad assorbimento atomico PERKIN-ELMER 1100 B, usando i seguenti parametri operativi:

Lunghezza d'onda: 4277 Å-visibile

Apertura fessura: 0,7nm

Sorgente luminosa: lampada a catodo cavo

Fiamma: aria acetilene

Dopo aver azzerato lo strumento con acqua bidistillata, si procede alla lettura dello standard. Si costruisce la retta di taratura dalla quale viene ricavata la concentrazione di calcio. Per correggere errori dovuti a possibili contaminazioni si prepara un "blank" contenente la soluzione di solubilizzazione. La determinazione di calcio nei mitocondri non incubati (tempo zero), si effettua sospendendo 1 mg di proteine mitocondriali in 1 ml di soluzione solubilizzante.

Standards di calcio:

si preparano 3 standards a concentrazioni 5, 30, 60 µM diluendo la soluzione madre con la soluzione solubilizzante. Il "blank" è costituito dalla soluzione solubilizzante e

viene letto sempre contro acqua bidistillata utilizzata per azzerare lo spettrofotometro (Toninello A. et al., 1985).

### **Determinazione del rilascio di Cyt C e AIF**

I campioni sono stati preparati incubando 1 mg/ml di proteine mitocondriali nelle varie condizioni nel medium standard per circa 15 minuti a 20°C.

Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 2 minuti a 14000 rpm con una centrifuga Centrifuge 5415C per precipitare il pellet. Il soprannatante, che contiene i fattori pro-apoptotici rilasciati dai mitocondri, viene concentrato con un opportuno kit PAGEprep™ Protein Clean-Up and Enrichment Kit (PIERCE). I campioni concentrati vengono portati a 100°C per 4 minuti e infine caricati su gel SDS page secondo quanto indicato di seguito.

#### Elettroforesi per Cyt C

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide è uno dei metodi sperimentali più impiegati per separare le proteine di una miscela in base al loro peso molecolare. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente ionico che, legandosi saldamente alle proteine, ne provoca la denaturazione. In presenza di un eccesso di SDS, infatti, ogni grammo di proteina lega circa 1.4 grammi di detergente che fornisce, perciò, una quantità di carica negativa costante per unità di massa. Durante l'elettroforesi i complessi proteina-SDS migrano tutti verso l'anodo (+) e, grazie alle proprietà di setaccio molecolare del gel di poliacrilamide, la loro mobilità risulta inversamente proporzionale al peso molecolare. È possibile, inoltre, determinare il peso molecolare delle proteine del campione utilizzando degli standards a peso molecolare noto, che vengono fatti correre assieme ai campioni. La corsa elettroforetica prevede l'utilizzo di due tipi di gel che vengono preparati come segue. Per la determinazione del citocromo c viene utilizzato un gel al 15% di poliacrilamide.

Il Running gel (gel di separazione o inferiore) è costituito da:

- a. 3.41 ml di soluzione al 40 % di Acrilamide;
- b. 5 ml di tampone Tris/HCl 1.5 M e SDS 0.014 M, pH 8.8;
- c. 0.1 ml di soluzione al 10 % di SDS;
- d. 4.03 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata.

Si aggiungono, quindi, 100 µl di una soluzione al 10 % di persolfato d'ammonio, come polimerizzante, e 5.5 µl di tetrametiletildiamina (TEMED), come catalizzatore.

Lo Stacking gel (gel di impaccamento o superiore) è costituito da:

- a. 1.15 ml di soluzione al 40 % di acrilamide;
- b. 1.1 ml di Tris/HCl 0.5 M e SDS 0.014 M, pH 6.8;
- c. 44 µl di soluzione al 10 % di SDS;
- d. 1.75 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata.

Si aggiungono, quindi, 44 µl della soluzione al 10 % di persolfato d'ammonio e 4.75 µl di TEMED.

La piastra elettroforetica, di dimensioni 8x10 cm, viene fissata all'apposito apparecchio MIGHTY SMALL-SE 250 HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. La durata della corsa è di 1 ora e 30 minuti circa a 35 mA/gel.

#### Western blot per Cyt c

Terminata la corsa elettroforetica, si esegue un trasferimento delle bande proteiche dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento avviene utilizzando un tampone di trasferimento composto da Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanolo 20% (pH 8.0) e applicando una corrente di 100 mA costanti per 2 ore.

Al termine del blotting la membrana viene messa per 30 minuti, sotto costante agitazione, in un tampone di saturazione costituito da TBS 1X e BSA al 3%.

Il tampone TBS si prepara a partire da una soluzione 20X composta da Tris/HCl 1 M e NaCl 3 M (pH 7.5).

La membrana viene poi incubata over-night a 4°C con l'anticorpo specifico primario diluito in un tampone costituito da TBS 1X e Tween 0,1%.

L'anticorpo utilizzato è un anticorpo di topo anti-citocromo c (Pharmigen, San Diego, CA).

Dopo il legame con l'anticorpo primario, vengono eseguiti tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con un opportuno tampone contenente TBS 1X e Tween 0.1%. La membrana lavata viene incubata, sotto costante agitazione, per 30 minuti con un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con la perossidasi (Amersham). Si operano altri tre lavaggi da 10 minuti con il tampone di lavaggio. La membrana è così pronta per la rivelazione immunologica.

#### Rivelazione immunologica

Si procede con la rivelazione anticorpale tramite il sistema ECL (Enhanced chemiluminescence), utilizzando un opportuno kit Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents. I reagenti a contatto con la membrana danno origine ad una reazione di chemiluminescenza nella posizione in cui è legata la perossidasi, in corrispondenza, cioè, del complesso antigene-anticorpo. La rivelazione è effettuata tramite autoradiografia.

### Elettroforesi per AIF

Si procede come per il citocromo c, utilizzando, però, un gel al 10% di poliacrilamide.

### Western blot per AIF

Al termine della corsa si esegue il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa come già descritto in precedenza. Il trasferimento viene effettuato a 350 mA per 50 minuti. Alla fine del blotting la membrana viene saturata con BSA 3%. La membrana viene poi incubata a 4°C over night con l'anticorpo primario specifico anti-AIF di coniglio (Pharmigen, San Diego, CA), diluito nel tampone costituito da TBS 1X e Tween 0.1%.

Dopo il legame con l'anticorpo primario, vengono eseguiti tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con l'opportuno tampone di lavaggio contenente TBS 1X e Tween 0.1%. La membrana lavata, viene incubata per 30 minuti con un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con la perossidasi (Amersham). Si operano altri tre lavaggi da 10 minuti con il tampone specifico costituito da TBS 1X e Tween 0.1%. La membrana è così pronta per la rivelazione immunologica che si esegue analogamente a quanto descritto per il Cyt c.

### **Modalità di incubazione dei mitocondri**

Tutte le prove sono state effettuate nel seguente medium standard:

Saccarosio	200 mM
Na-Hepes	10 mM
Succinato	5 mM
Rotenone	1,25 µM
Fosfato	1 mM
pH=	7,4
t=	20°C

I mitocondri vengono aggiunti a questo medium in aliquote da 1 mg/ml.

Il calcio, quando presente, è CaCl<sub>2</sub>.

Variazioni di tale composizione sono indicate nelle rispettive figure.

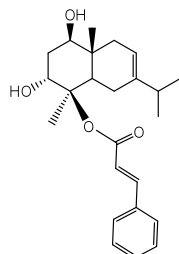
In questa tesi sono riportati esperimenti tipici, ripetuti più volte (almeno 3 volte), che hanno dato risultati simili.

## Capitolo Quarto

### *Verbesina persicifolia*

*Verbesina persicifolia* DC è un piccolo arbusto appartenente alla famiglia delle Asteraceae che cresce in modo selvatico negli stati di Veracruz, Taxcala e Puebla in Messico. Nella medicina tradizionale è conosciuto con il nome comune “huichin”, “taxiwa” o “tlamacas”; esso viene utilizzato principalmente per il trattamento del cancro, diabete, dolori muscolari e renali, infiammazioni epatiche e allo stomaco, ferite, dissenteria e ulcere allo stomaco (Martínez, A. M. et al. 2001). Finora l’unica attività farmacologica dimostrata in topi è l’attività ipoglicemizzante di estratti ottenuti dalle parti aeree (Andrade-Cetto A. e Heinrich M., 2005).

Un precedente studio fitochimico ha condotto all’isolamento di eudesmani cinnamici e di diversi terpenoidi (Jakupovic J. et al., 1987) , ed in particolare studi più recenti, effettuati presso il laboratorio del Prof Mertínez-Vázquez dell’Università Nazionale Autonoma del Messico (UNAM), hanno permesso l’isolamento di uno dei principali componenti dell’estratto esanico ottenuto dalle parti aeree della pianta che è risultato essere il 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene, composto **1** (figura 4.1).



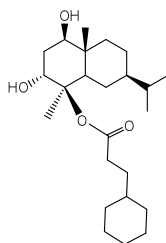
**Figura 4.1:** 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$  diidrossieudesm-7,8-ene (composto **1**), isolato da *Verbesina persicifolia*

È ormai ben noto come i mitocondri giochino un importante ruolo nell’omeostasi energetica attraverso il processo della fosforilazione ossidativa e la regolazione dei livelli del calcio. La fosforilazione ossidativa è strettamente correlata con la produzione di energia sotto forma di ATP, la generazione di specie radicaliche dell’ossigeno e l’apoptosi intrinseca. Difetti nel processo di produzione di energia, eccessiva formazione di ROS e deregolazioni del processo apoptotico sono stati riscontrati, da soli o in combinazione, in diverse malattie umane, tra le quali il cancro e malattie neurodegenerative. Diversi studi hanno dimostrato che numerosi

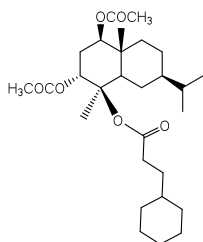
composti di origine naturale sono implicati nei suddetti processi in qualità di agenti pro- o anti-ossidanti. Per esempio l'acido glicerritico, derivato triterpenico (componente della radice di liquirizia), e l'isoflavone genisteina presente nella soia, sono in grado di indurre stress ossidativo in mitocondri isolati, grazie ad una loro interazione con la catena respiratoria mitocondriale (Fiore C. et al., 2004; Battaglia V. et al., 2008; Salvi M. et al., 2003; Salvi M. et al., 2005; Salvi M. et al., 2002). I loro effetti sono dovuti, molto probabilmente, al tautomerismo cheto-enolico esibito da questi composti nell'interazione con i loro bersagli (Fiore C. et al., 2004).

Sulla base di queste considerazioni, il principale obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare le proprietà citotossiche su alcune linee cellulari tumorali umane del composto 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene(**1**) e i suoi effetti sulle funzionalità bioenergetiche mitocondriali in modo da ottenere informazioni sul meccanismo molecolare con cui agisce, in particolare evidenziando un particolare ruolo esibito dal composto, ascrivibile al fenomeno del "mild uncoupling".

Inoltre, con lo scopo di approfondire la capacità di tale composto di interferire con la funzionalità mitocondriale, e di individuare i determinanti molecolari responsabili delle conseguenze biologiche, è stata sintetizzata una serie di composti nei quali sono stati acetilati i gruppi ossidrilici e/o eliminati i doppio legami -C-C- dell'eudesmano di partenza. Le strutture così ottenute sono riportate in figura 4.2.

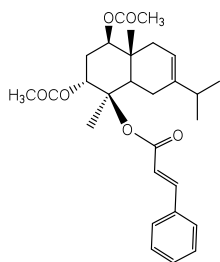


4 $\beta$ -(3-cicloesil)-propionilossi-1 $\beta$ , 3 $\alpha$  - diidrossieudesmano (composto **2**)



4 $\beta$ -(3-cicloesil)-propionilossi-1 $\beta$ , 3 $\alpha$  - diacetilossi eudesmano (composto **3**)





4 $\beta$ - Cinnamoilossi, 1 $\beta$ , 3 $\alpha$  - diacetilossieudesmano - 7,8 - ene (composto 4)

**Figura 4.2:** struttura chimica dei derivati di semisintesi del composto 1.

## RISULTATI

### Studio dell'attività antiproliferativa dell'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene (1)

L'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -diidrossieudesm-7,8-ene è stato studiato mediante saggi *in vitro* con l'obiettivo di evidenziare la capacità di inibire la proliferazione cellulare. Sono state utilizzate cinque linee cellulari tumorali umane:

- **HeLa**, cellule da adenocarcinoma della cervice uterina
- **A-431**, cellule da carcinoma dello strato squamoso dell'epidermide
- **Hep-G2**, cellule da carcinoma epatocellulare
- **MSTO 211H**, cellule da mesotelioma bifasico
- **HL-60**, cellule da leucemia promielocitica

secondo le metodiche descritte nella sezione Materiali e Metodi.

Le concentrazioni di composto utilizzate nei test di attività antiproliferativa sono comprese tra 1 e 50  $\mu$ M. I risultati, espressi come valori di IC<sub>50</sub>, ossia concentrazione ( $\mu$ M) di composto in grado di provocare la morte del 50% delle cellule trattate rispetto alla coltura di controllo, vengono presentati in Tabella 4.1.

Vengono riportati inoltre i dati di citotossicità relativi alla linea cellulare umana non tumorale **MET5A** (cellule mesoteliali).

	<b>A431</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>MSTO 211H</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>HL-60</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>Hep G2</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>HeLa</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>MET5A</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Composto 1	27,6 $\pm$ 4,4	14,7 $\pm$ 2	32,3 $\pm$ 2,3	17,2 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 1,2	32,3 $\pm$ 3,6

**Tabella 4.3:** Attività antiproliferativa dei composti studiati su cellule A-431, MSTO 211H, HL-60, Hep G2 e HeLa. I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

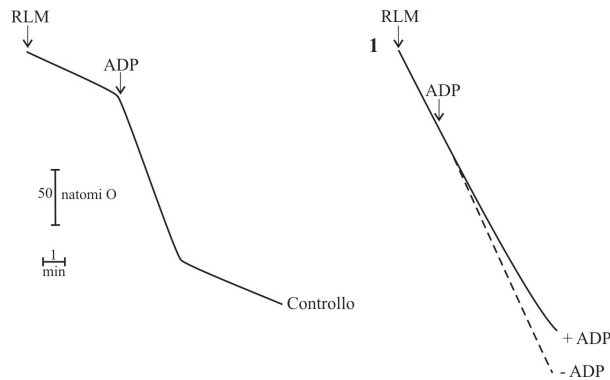
## Effetti di **1** sulle funzionalità mitocondriali

### Fosforilazione ossidativa e disaccoppiamento

La fosforilazione ossidativa è un processo fondamentale per le funzioni mitocondriali e cellulari, in quanto è in grado di permettere l'accoppiamento della sintesi di ATP con il consumo di ossigeno, che avviene solamente se la membrana mitocondriale interna è in condizioni di completa impermeabilità, caratteristica essenziale per il mantenimento del gradiente elettrochimico protonico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Attraverso il calcolo dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) si possono avere informazioni sul grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa.

### Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)

In figura 4.3 vengono riportate le tracce relative alla determinazione dell'I.C.R. in presenza di **1**.



**Figura 4.3: Effetto di **1** sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) mitocondriale:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. **1** è presente alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , l'ADP è aggiunto alla concentrazione di 300  $\mu\text{M}$ . La linea tratteggiata rappresenta l'andamento del consumo di ossigeno da parte di **1** in assenza di ADP. Il valore di I.C.R. è riportato in tabella 4.2.

Come si può notare, i RLM, incubati in presenza di succinato quale substrato energizzanti del II complesso della catena respiratoria e rotenone, nelle condizioni di controllo presentano un aumento della respirazione dopo l'aggiunta di ADP (transizione stato 4/stato 3), indice di un'ottima capacità fosforilativa dei mitocondri stessi (I.C.R.= 5) (Tabella 4.2). In presenza del composto **1**, alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , la velocità del consumo di ossigeno nello stato 4 è decisamente aumentata, se confrontata con il controllo; non si ha, invece, alcun cambiamento significativo dopo l'aggiunta di ADP (stato 3), diminuendo il valore di I.C.R. al di sotto dell'unità (I.C.R.=0.90) (Tabella 4.2).

In tabella 4.2. vengono riportati i valori di I.C.R. in presenza di **1** utilizzando altri substrati specifici: glutammato/malato (substrati energizzanti del I complesso) e ascorbato in presenza di ferricianuro (che funge da “shuttle” di elettroni dall’ascorbato verso il citocromo c e quindi energizzando il IV complesso della catena respiratoria. Anche in queste condizioni **1** alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  provoca una diminuzione dell’I.C.R. al di sotto dell’unità. Vengono anche riportati i valori di I.C.R. calcolati in presenza di **1** alle concentrazioni 25 e 50  $\mu\text{M}$  nelle varie condizioni evidenziando un effetto dose-dipendente.

Substrati	I.C.R.			
	controllo	1 ( $\mu\text{M}$ )		
		25	50	100
succinato/ rotenone	5.0	3.5	2.5	0.90
glutammato/ malato	4.5	3.1	2.0	0.75
ascorbato/ ferricianuro	3.0	1.9	1.5	0.82

**Tabella 4.4: valori di I.C.R. in presenza di 1.**

Succinato/rotenone: RLM sono stati incubati nel medium standard: Saccarosio 200 mM, Na-Hepes 10 mM, Succinato 5 mM, Rotenone 1,25  $\mu\text{M}$ , Fosfato 1 mM.

Glutammato/Malato: RLM sono stati incubati nel medium Saccarosio 200 mM, Na-Hepes 10 mM, Glutammato 5 mM, Malato 1 mM, Fosfato 1 mM.

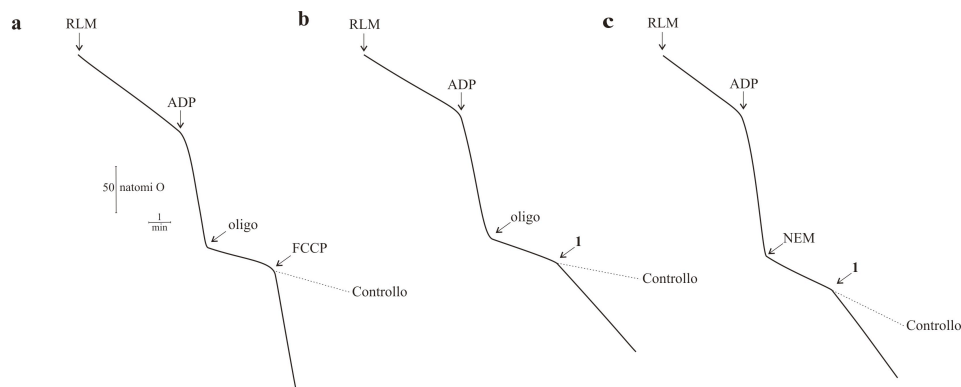
Asorbato/ferricianuro: RLM sono stati incubati nel medium Saccarosio 200 mM, Na-Hepes 10 mM, Asorbato 6 mM, Ferricianuro 500  $\mu\text{M}$ , Fosfato 1 mM.

L’ADP è aggiunto alla concentrazione di 300  $\mu\text{M}$ .

Questi risultati dimostrano come **1** alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  sia in grado di provocare un completo disaccoppiamento tra la velocità di respirazione e la sintesi di ATP ma anche una inibizione della velocità di respirazione subito dopo l’aggiunta di ADP.

É noto che, se mitocondri in stato 3 (dopo l’aggiunta di ADP) in presenza di succinato/rotenone vengono addizionati di oligomicina, la quale previene il rientro dei protoni in matrice durante la sintesi di ATP (Hong S. e Pedersen P.L., 2008), essi presentano una diminuzione della velocità di consumo dell’ossigeno riportabile a quello dello stato 4. La successiva addizione di un agente disaccoppiante come il carbonil-cianuro-p-trifluoro-metossifenilidrazone (FCCP) ristabilisce il consumo di ossigeno alla massima velocità, dimostrando così che la respirazione dovuta all’effetto disaccoppiante è completamente dissociata da quella legata alla sintesi di

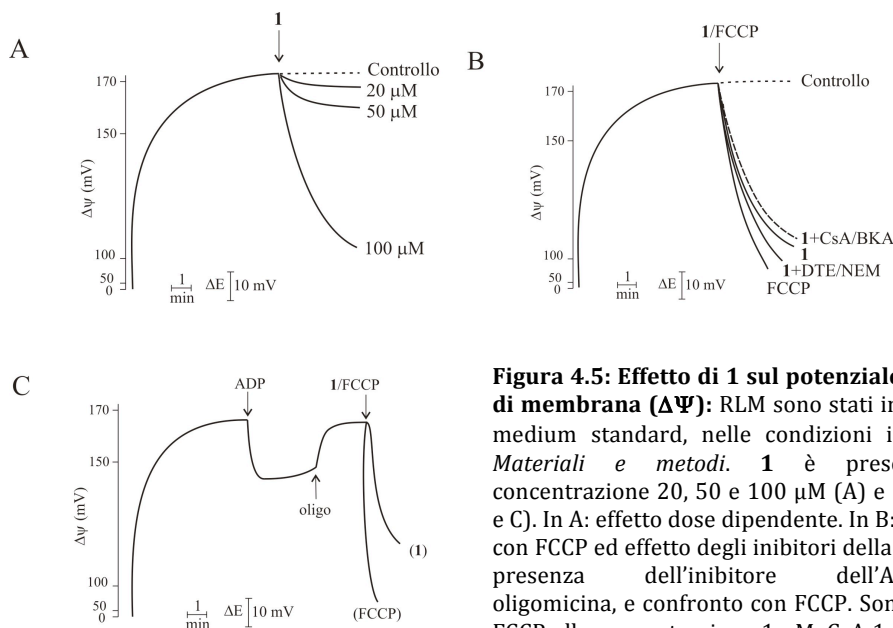
ATP (figura 4.4, traccia a). Se si sostituisce FCCP con il composto **1**, il consumo di ossigeno viene aumentato, sebbene a livelli minori rispetto a quelli ottenuti con FCCP (figura 4.4, traccia b), confermando comunque l'effetto disaccoppiante di **1**. Sostituendo l'oligomicina con un altro inibitore dell'ATP-sintasi come l'N-etil-maleimide (NEM) (Hong S. e Pedersen P.L., 2008), **1** esibisce un ripristino del consumo di ossigeno superiore a quello in presenza di NEM, praticamente identico a quello con oligomicina (figura 4.4, traccia c). Risultati quasi identici sono stati ottenuti anche con i substrati glutammato/malato e ascorbato/ferricinuuro (risultati non riportati).



**Figura 4.4: Effetto di **1** sullo stato 3 della respirazione inibito da oligomicina o NEM. Confronto con FCCP:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. **1** è presente alla concentrazione 100  $\mu$ M, l'ADP è aggiunto alla concentrazione di 1 mM, oligomicina 5  $\mu$ M, NEM 30  $\mu$ M, FCCP 1  $\mu$ M.

### Alterazione delle proprietà isolanti della membrana mitocondriale

In figura 4.5 A si può notare l'ottima capacità isolante della membrana mitocondriale interna data dal valore del potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ) di circa 170 mV in presenza di succinato/rotenone. Lo stesso valore di  $\Delta\Psi$  è stato ottenuto anche in presenza dei substrati glutammato/malato e ascorbato/ferricinuuro (dati non riportati).



**Figura 4.5: Effetto di 1 sul potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ):** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. **1** è presente alla concentrazione 20, 50 e 100  $\mu\text{M}$  (A) e 100  $\mu\text{M}$  (B e C). In A: effetto dose dipendente. In B: confronto con FCCP ed effetto degli inibitori della MPT. In C: presenza dell'inibitore dell'ATP-sintasi, oligomicina, e confronto con FCCP. Sono presenti FCCP alla concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , CsA 1  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$ , NEM 30  $\mu\text{M}$ , ADP 1 mM, oligomicina 5  $\mu\text{M}$

Le osservazioni precedenti, che mettono in luce come **1** sia in grado di provocare la perdita delle capacità bioenergetiche mitocondriali (figura 4.3 e tabella 4.2), sono ulteriormente confermate dalla caduta del  $\Delta\Psi$  indotta da **1** (con andamento dose-dipendente), dimostrando un collasso quasi completo alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  (effetto ottenuto con tutti i substrati, dati non riportati) (figura 4.5 A). Si sottolinea il fatto che gli inibitori specifici della MPT quali ciclosporina (CsA), acido bongkreico (BKA), ditioeritritolo (DTE) e NEM (Zoratti e szabò, 1995) non sono in grado di esibire alcun effetto protettivo sul suddetto fenomeno (figura 4.5 B). Si sottolinea inoltre che, sebbene con minore effetto, **1** esibisce un comportamento analogo a quello dell'FCCP nel collassare il  $\Delta\Psi$  (figura 4.5 B).

Questi risultati suggeriscono che gli effetti causati da **1** possano essere riconducibili ad un danno o ad una disfunzione della membrana o, molto probabilmente, ad un effetto protonoforo del composto.

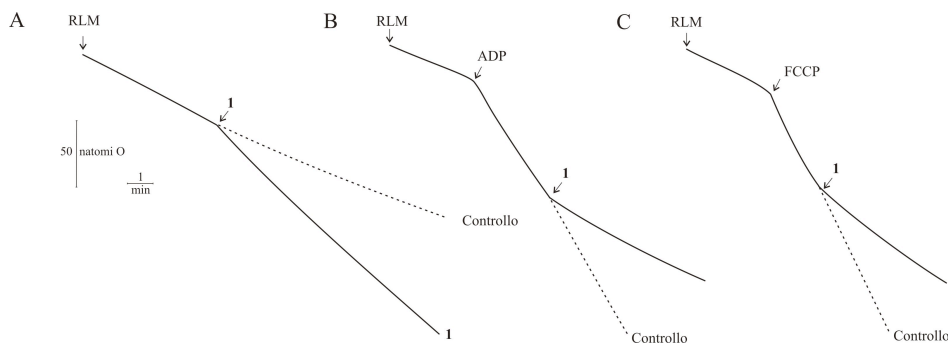
In figura 4.5 C vengono riportati i risultati relativi all'aggiunta di ADP agli RLM incubati in presenza di fosfato, che induce una significativa diminuzione del  $\Delta\Psi$  indicativo della trasduzione energetica dal gradiente elettrico alla sintesi di ATP. Una successiva aggiunta di oligomicina (inibitore dell'ATP-sintasi) ristabilisce il  $\Delta\Psi$  a valori normali (circa 170 mV) dimostrando un "reversal" della trasduzione energetica. Infine, l'aggiunta del protonoforo FCCP collassa completamente il  $\Delta\Psi$ . Se

l'FCCP viene sostituito con il composto **1**, l'effetto che si osserva risulta essere simile, anche se di minore entità (figura 4.5 C).

### Interazione con la catena respiratoria

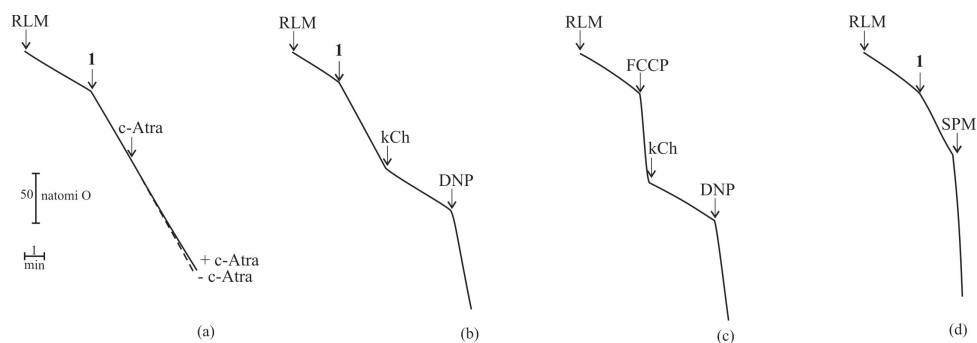
Gli esperimenti successivi sono stati effettuati con l'obiettivo di caratterizzare l'interazione di **1** con la catena respiratoria mitocondriale. I risultati riportati in figura 4.6 mostrano gli effetti di **1** sullo stato respiratorio 4 (traccia A), sullo stato respiratorio 3 (traccia B) e sullo stato disaccoppiato (traccia C), in presenza di succinato/rotenone quali agenti energizzanti.

L'aggiunta di **1** stimola il consumo di ossigeno nello stato 4 (traccia A), mentre esibisce un effetto inibitorio sia sullo stato 3 (traccia B) sia sullo stato disaccoppiato (traccia C). Gli stessi effetti sono stati osservati anche in presenza di glutammato/malato e ascorbato/ferricianuro (dati non riportati).



**Figura 4.6: Effetto di **1** sullo stato 4 della respirazione (A), sullo stato 3 (B) e sullo stato disaccoppiato (C):** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. **1** è presente alla concentrazione 100  $\mu$ M, l'ADP è aggiunto alla concentrazione di 1 mM e FCCP 1  $\mu$ M.

I risultati riportati in figura 4.7 permettono di chiarire se **1** è in grado di interagire con alcune proteine della membrana mitocondriale. Il carbossiatractiloside (c-Atra) è completamente inefficace nell'alterare il consumo di ossigeno indotto da **1** (traccia a), mentre il 6-chetocolestanolo (kCh) ristabilisce la respirazione con **1** a livelli normali come quelli osservati prima della sua aggiunta. Una successiva aggiunta di 2,4 dinitrofenolo (DNP) porta ad una velocità massima di respirazione (traccia b). Gli effetti esibiti da kCh e DNP sulla respirazione stimolata da **1** sono identici a quelli osservati sulla respirazione disaccoppiata da FCCP (traccia c), suggerendo in questo modo che **1** ed FCCP condividano lo stesso target che potrebbe essere la citocromo C ossidasi (Starkov A.A., 1997).

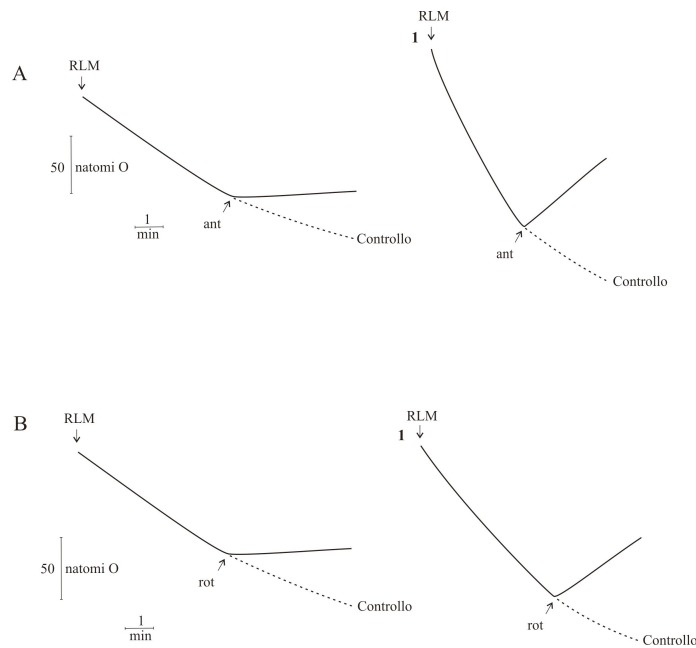


**Figura 4.7: Effetto di 6-chetocolestanolo (b) e SPM (d) sullo stato 4 della respirazione stimolato da 1 e confronto con FCCP (c):** RLM sono stati incubati nelle condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. 1 è presente alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , c-Atra 10  $\mu\text{M}$ , kCh 50  $\mu\text{M}$ , DNP 100  $\mu\text{M}$  e FCCP 1  $\mu\text{M}$ .

Invece, l'assenza di effetto da parte di c-Atra esclude che il bersaglio coinvolto nell'azione di 1 sia l'ANT (Starkov A.A. et al., 1997). Inoltre l'aggiunta di spermina (SPM) nella fase di aumentata stimolazione della respirazione da parte di 1, incrementa ulteriormente questo processo (traccia d). Essendo questa poliamina conosciuta come agente stabilizzante delle membrane, a causa della sua struttura policationica in grado quindi di prevenire eventuali leaks protonici, il suo effetto è probabilmente attribuibile all'eliminazione di un agente endogeno che regola l'attività di 1.

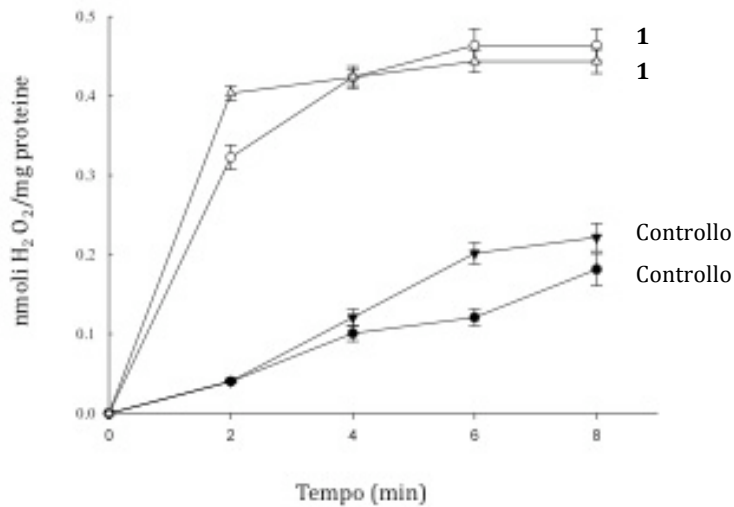
In figura 4.8 A vengono riportati gli effetti relativi all'aggiunta di antimicina A (ant) (la quale è in grado di bloccare la respirazione) (Salvi M. et al., 2007) durante l'ossidazione di succinato nello stato 4. Invece, in presenza di 1, l'aggiunta di antimicina A non solo causa un blocco della respirazione ma induce anche un'inversione di tendenza nella traccia del consumo di ossigeno, suggerendo una generazione dello stesso (Salvi M. et al., 2007). Effetti quasi simili sono stati ottenuti sostituendo l'antimicina A con il rotenone (rot), durante l'ossidazione del glutammato/malato (figura 4.8 B).





**Figura 4.8: stimolazione dello stato 4 della respirazione da parte di 1 in RLM energizzati con succinato/rotenone (A) o glutammato/malato (B). Effetti di antimicina A (A) o rotenone (B):** RLM sono stati incubati nelle condizioni sperimentali indicate in tabella 4.2 in presenza di succinato/rotenone o di glutammato/malato. **1** è presente alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , antimicina A (ant) 1  $\mu\text{M}$ , rotenone (rot) 1,25  $\mu\text{M}$ .

In base a queste osservazioni si potrebbe ipotizzare che la presenza di **1** induca la produzione di perossido di idrogeno e, successivamente, una parte di questo venga trasformato in ossigeno da parte dell'azione della catalasi mitocondriale (Salvi M. et al., 2007). Questa ipotesi è confermata dai risultati riportati in figura 4.9, nella quale si può osservare come **1** sia in grado di aumentare significativamente la produzione di perossido di idrogeno, se paragonato con i controlli, sia in presenza di succinato/rotenone che di glutammato/malato. La stessa prova, utilizzando come substrato ascorbato/ferricianuro non è stata eseguita a causa dell'interferenza con i reagenti di misura. La produzione di perossido di idrogeno molto probabilmente è indicativa della generazione di altre specie reattive dell'ossigeno (ROS), in conseguenza all'interazione di **1** con la catena respiratoria.



**Figura 4.9: Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dei mitocondri incubati in presenza di 1.** RLM sono stati incubati nelle condizioni sperimentali indicate in tabella 4.2 in presenza di succinato/rotenone (cerchi) o di glutammato/malato (triangoli). 1 è presente alla concentrazione 100  $\mu$ M. I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

## Discussione

L'energia richiesta per la sintesi di ATP nelle membrane trasducenti energia è fornita da una sequenza di reazioni redox lungo la catena di trasporto degli elettroni localizzata sulla membrana mitocondriale interna. A sua volta la catena respiratoria è alimentata dall'ossidazione dei substrati NAD e FAD-dipendenti. In questo processo l'ATP viene sintetizzato attraverso l'accoppiamento del trasporto di elettroni e la fosforilazione dell'ADP. (Echtay K.S., 2005)

I disaccoppianti bloccano la sintesi di ATP, impedendo questo accoppiamento, in modo tale che l'energia sviluppata dalle reazioni redox non venga utilizzata per i processi fosforilativi. Gli agenti disaccoppianti possiedono un'attività protonoforica in grado di dissipare il gradiente elettrochimico sotto forma di calore, stimolando al massimo il flusso degli elettroni e la velocità di respirazione, prevenendo così la sintesi di ATP.

In questo studio si dimostra come 1 sia in grado di comportarsi come un tipico agente disaccoppiante esibendo tutte le caratteristiche richieste per questo tipo di azione. Infatti il composto causa una diminuzione dose-dipendente dell'I.C.R.,

massima alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , indicativa di un collasso nella sintesi di ATP (figura 4.3 e tabella 4.2).

La caduta di questo parametro bioenergetico avviene in presenza di tutti i substrati utilizzati, suggerendo un coinvolgimento generale della catena respiratoria mitocondriale.

L'effetto disaccoppiante è inoltre confermato dal consumo di ossigeno ristabilito in presenza di **1** (effetto simile a quello ottenuto con FCCP), nei mitocondri aventi lo stato 3 della respirazione bloccato dall'oligomicina (figura 4.4).

Inoltre in figura 4.5 A vengono riportati risultati che confermano ulteriormente l'ipotesi di un effetto protonoforico esibito da **1**. Infatti il composto provoca un collasso del  $\Delta\Psi$  simile a quello causato dal protonoforo FCCP (figura 4.5 B), anche se di minore entità.

Si sottolinea il fatto che il collasso del  $\Delta\Psi$  osservato in figura 4.5 A, non è accompagnato da uno swelling mitocondriale (fig. 5.3, capitolo quinto) e non è protetto dai tipici inibitori della MPT (figura 4.5 B), suggerendo che la depolarizzazione non sia dovuta né ad un ingresso nei RLM di soluti osmoticamente attivi né all'apertura del poro della MPT, attraverso il quale si ha il re-uptake dei protoni.

L'osservazione che il composto **1** provoca una caduta del potenziale nei RLM in stato 3, addizionati di oligomicina, dimostra che l'effetto del composto non è dovuto ad una interazione con l'ATP-sintasi (figura 4.5 C). Infatti, in queste condizioni l'attività dell'enzima è bloccata bidirezionalmente dall'oligomicina ed un'eventuale interazione di **1** non dovrebbe provocare nessun effetto. In presenza di NEM, altro inibitore dell'ATP-sintasi, il composto **1** esibisce uno stesso effetto disaccoppiante (comparando le tracce b e c in figura 4.4), confermando ulteriormente che l'ATP-sintasi non è coinvolta in questo meccanismo.

Un'altra conferma del fatto che **1** esibisce un effetto disaccoppiante è data dal fatto che il composto aumenta la velocità di respirazione, in stato 4, durante l'ossidazione del succinato (figura 4.6 A), effetto osservato anche in presenza dei substrati glutammato/malato e ascorbato/ferricianuro (dati non riportati). Questi risultati sembrano suggerire che il composto non provochi alcuna inibizione né sul flusso degli elettroni lungo la catena respiratoria, né sul trasporto dei substrati. Il meccanismo con cui il composto **1** provoca disaccoppiamento è probabilmente correlato ad una sua interazione con alcune proteine di membrana fra le quali, come

riportato in precedenza, potrebbe esserci la citocromo c ossidasi (Starkov A.A., 1997).

In figura 4.6 B e C, si possono osservare gli effetti di **1** sulla respirazione in stato 3 e sullo stato disaccoppiato, rispettivamente, evidenziando un'importante differenza rispetto a quelli ottenuti in stato 4 (figura 4.6 A). Infatti il composto **1** inibisce la velocità della respirazione, stimolata in entrambe le condizioni, invece di aumentarla ulteriormente come nello stato 4. Se i risultati riguardanti gli effetti di **1** sullo stato 4 della respirazione dimostrano che il composto si comporta come un agente disaccoppiante, i dati ottenuti sia per lo stato 3, sia per lo stato disaccoppiato della respirazione supportano l'ipotesi che il composto possa indurre un particolare disaccoppiamento mitocondriale, il cosiddetto "mild uncoupling" (Starkov A.A., 1997). Le caratteristiche di questo fenomeno, tracciate da Starkov A.A. (1997), sono riportate di seguito:

- i mitocondri possiedono proteine, tra le quali l'ANT e la citocromo c ossidasi, che mediano e regolano la permeabilità della membrana mitocondriale interna ai protoni;
- tali proteine sono regolate dal legame con composti endogeni i quali hanno proprietà simili a quelle di disaccoppianti artificiali come ad esempio il radicale idroperossilico ( $HO_2^{\cdot}$ ) (Starkov A.A., 1997);
- l'interazione dei composti endogeni con le suddette proteine, può a sua volta, essere modulata in modo positivo o negativo da ormoni (Starkov A.A., 1997);

Il fatto che **1** inibisca sia lo stato 3 che lo stato disaccoppiato della respirazione, supportato dal fatto che la catena respiratoria viene alimentata a livello dei differenti complessi, suggerisce che il sito di azione del composto sia localizzato sull'ultimo componente della catena respiratoria, ossia sulla citocromo c ossidasi. Come discusso precedentemente, le proteine che potrebbero essere coinvolte nell'effetto disaccoppiante di **1** sono l'ANT e la citocromo c ossidasi. I risultati riportati in figura 4.3 dimostrano che l'ADP esibisce una bassa inibizione sulla respirazione disaccoppiata indotta da **1**, e i dati relativi alla figura 4.7 traccia a, mostrano un'assenza di efficacia da parte di c-Atra, escludendo quindi il possibile coinvolgimento dell'ANT nel suddetto fenomeno.

Il possibile coinvolgimento della citocromo c ossidasi è proponibile sulla base dei risultati ottenuti utilizzando il kCh e il DNP.

In un lavoro di Starkov e colleghi è stato riportato l'effetto del kCh nell'invertire l'azione disaccoppiante di alcuni protonofori quali FCCP, CCCP, SF6847, mentre altri composti come il DNP, non sono interessati dall'azione del kCh (Starkov A.A. et al

1997; Starkov A.A., 1997). In figura 4.7 traccia b, vengono riportati i risultati relativi alla capacità di kCh di causare un'inversione del disaccoppiamento della respirazione causato da **1** e conseguentemente la capacità del DNP di ristabilire il disaccoppiamento, supportando fortemente l'ipotesi che **1** si comporti come l'FCCP (figura 4.7 traccia c). Inoltre gli stessi autori hanno proposto che l'FCCP instauri la sua azione disaccoppiante attraverso l'interazione con la citocromo c ossidasi. Si potrebbe quindi affermare che anche il composto **1**, sulla base dei dati ottenuti, utilizzi la stessa proteina per la sua azione.

Dato che un regolatore della citocromo c ossidasi nel re-uptake dei protoni è il radicale idroperossilico, i risultati mostrati in figura 4.9, relativi alla produzione di perossido di idrogeno indotta da **1**, supportano ulteriormente la suddetta ipotesi. Questa possibilità è supportata anche dal fatto che la SPM, che agisce come "scavenger" del radicale idrossilico (Sava I.G. et al. 2006), rimuove l'effetto regolatore del radicale con un' aumentata respirazione mitocondriale (figura 4.7 traccia d).

Il meccanismo attraverso il quale il composto **1** provoca la produzione di ROS non è ancora stato chiarito, anche se **1** potrebbe interagire con la catena respiratoria a livello del pool dell'ubichinone con conseguente formazione del radicale semichinonico. Questo potrebbe favorire la generazione dell'anione superossido e conseguentemente, ad opera della superossido dismutasi, di perossido di idrogeno. Successivamente il perossido di idrogeno interagendo con i centri Fe-S può produrre il radicale idrossilico attraverso la reazione di Fenton (Kowaltowski A.J. et al., 2009; Moldovan L e Moldovan N.I., 2004).

## **Conclusioni**

In conclusione **1** alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , induce un collasso bioenergetico mitocondriale accompagnato da un effetto protonoforico, dimostrando così il tipico comportamento di un agente disaccoppiante. Inoltre, il fatto che **1** inibisce sia lo stato 3, sia lo stato disaccoppiato della respirazione, che l'ADP inibisce la stimolazione dello stato 4 indotto da **1** e che il composto è in grado di favorire la produzione di ROS, permette di affermare che **1** è un "mild" uncoupler.

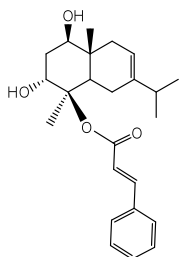


## Capitolo Quinto

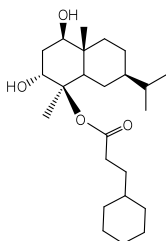
### Studio del meccanismo d'azione del composto **1** e dei suoi derivati di semisintesi

Dato l'effetto citotossico dimostrato da **1** su diverse linee cellulari tumorali umane (tabella 4.1 capitolo quarto e tabella 5.1) e la capacità del composto di agire a livello mitocondriale, si è voluto svolgere un ulteriore studio con l'obiettivo di verificare se tale sostanza fosse in grado di indurre il fenomeno della MPT, processo strettamente correlato con l'induzione dell'apoptosi, attraverso l'attivazione della via intrinseca.

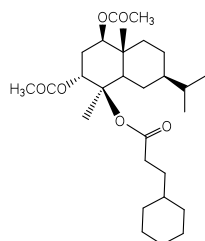
In questo capitolo inoltre verranno discussi gli studi dei meccanismi d'azione dei composti **2** e **3**, e parte dello studio del composto **4**, con l'obiettivo di tracciare rapporti struttura-attività tra il composto di partenza e i suoi derivati semisintetici. In questi ultimi composti (**2**, **3** e **4**), sono stati acetilati i gruppi ossidrilici e/o eliminati i doppi legami -C-C- dell'eudesmano isolato da *Verbesina persicifolia*.



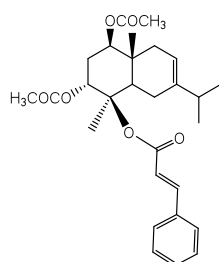
4β-cinnamoilossi,1β,3α diidrossieudesm-7,8-ene (composto **1**)



4β-(3-cicloesil)-propionilossi-1β,3α - diidrossieudesmano (composto **2**)



4β-(3-cicloesil)-propionilossi-1β, 3α -diacetilossi eudesmano (composto **3**)



4β- Cinnamoilossi, 1β, 3α - diacetilossi eudesmano - 7,8 - ene (composto **4**)

**Figura 5.1:** struttura chimica del composto **1** e dei derivati **2, 3 e 4**.

Dagli studi effettuati è emerso che i composti **1** e **2** sono entrambi in grado di esibire un effetto induttivo sul fenomeno della MPT. Verranno perciò riportati solo i dati relativi al composto **1**, non presentando **2** significative differenze rispetto all'eudesmano (**1**).

I derivati **3** e **4**, a differenza dei composti precedenti, presentano un comportamento diverso, in quanto non in grado di promuovere il processo di MPT, ma di provocare invece l'inibizione del complesso II (succinato deidrogenasi) della catena respiratoria, accompagnato da una condizione di stress ossidativo mitocondriale. Anche in questo caso verranno presentati soltanto i dati relativi allo studio del meccanismo d'azione del composto **3**, in quanto il derivato **4** esibisce un effetto simile.



## Studio dell'attività antiproliferativa

Per i tre derivati dell'eudesmano (**1**) sono stati effettuati innanzitutto studi di attività antiproliferativa, mediante saggi *in vitro*, su un ampio pannello di linee cellulari, allo scopo di verificare la capacità di inibire la proliferazione cellulare. In particolare, analogamente a quanto fatto per il composto **1**, riportato nel capitolo quarto, sono state prese in considerazione cinque linee cellulari tumorali umane. In tabella 5.1 sono riportati i risultati ottenuti, espressi come IC<sub>50</sub>, cioè concentrazione (μM) di composto in grado di provocare la morte del 50% delle cellule trattate rispetto ad un controllo non trattato. Vengono riportati per confronto anche i valori di IC<sub>50</sub> già presentati nel capitolo quarto (tabella 4.1) riguardanti la citotossicità relativa al composto **1**.

	A431 IC <sub>50</sub> (μM)	MSTO 211H IC <sub>50</sub> (μM)	HL-60 IC <sub>50</sub> (μM)	Hep G2 IC <sub>50</sub> (μM)	HeLa IC <sub>50</sub> (μM)	MET5A IC <sub>50</sub> (μM)
Composto <b>1</b>	27,6±4,4	14,7±2	32,3±2,3	17,2±1,3	15,6±1,2	32,3±3,6
Composto <b>2</b>	26,3±1	17,3±3,6	23±0,4	29,7±4,5	17,3±2,7	31,6±6,6
Composto <b>3</b>	22±3,9	35,2±1,3	36,4±2,7	22,4±2	17,4±3,1	47,8±4,1
Composto <b>4</b>	20,6±1,9	19,4±3,6	25,5±2,8	22,7±4,3	27,6±2,4	>50

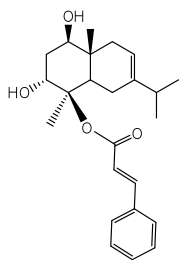
**Tabella 5.1:** Attività antiproliferativa dei composti studiati su cellule A-431, MSTO 211H, HL-60, Hep G2, HeLa. Sono riportati anche gli effetti citotossici su cellule MET5A. I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti ± deviazione standard.

I risultati ottenuti mostrano valori di IC<sub>50</sub> ≥ 20 μM per le due linee cellulari A431 e HL-60, che quindi possono essere considerate le meno sensibili, mentre i valori di IC<sub>50</sub> più significativi riguardano il composto **1** nelle cellule MSTO 211H e HeLa.

Tuttavia, le differenze di attività dei diversi composti nelle linee cellulari considerate non sembrano suggerire evidenti specificità d'azione.

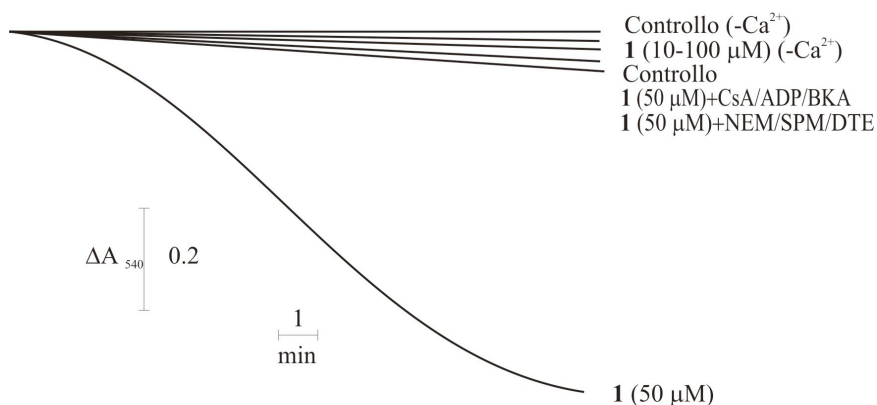
Vengono riportati anche i dati relativi alla citotossicità riscontrata sulle cellule **MET5A** (cellule mesoteliali umane, non tumorali) che mettono in luce una loro minore sensibilità all'azione dei composti, effetto apprezzabile in particolare per il composto **4**.

## 5.1 Studio dell'induzione dell'MPT da parte dell'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$ diidrossieudesm-7,8-ene, (**1**)



**Figura 5.2:** struttura chimica del composto **1**, 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$  diidrossieudesm-7,8-ene.

Un parametro fondamentale che solitamente si studia nella valutazione dell'induzione del fenomeno della transizione di permeabilità mitocondriale è lo swelling mitocondriale. La prova, consistente in una determinazione del rigonfiamento dei mitocondri (swelling colloidale-osmotico), viene valutata spettrofotometricamente mediante una diminuzione dell'assorbanza apparente, a 540 nm, di una sospensione mitocondriale.



**Figura 5.3: Effetto dei differenti inibitori della transizione di permeabilità e di antiossidanti sullo swelling mitocondriale:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu$ M, tranne dove indicato (-Ca<sup>2+</sup>); il composto **1** è presente ad una concentrazione 50  $\mu$ M. Sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu$ M, ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu$ M, DTE 5 mM, SPM 100  $\mu$ M, NEM 10  $\mu$ M.

In figura 5.3 si può notare come il composto **1**, dalla concentrazione 10  $\mu$ M alla 100  $\mu$ M, non presenti, in assenza di calcio, alcun effetto di carattere osmotico sulla membrana mitocondriale. Non si osserva, infatti, alcuna variazione dell'assorbanza apparente della sospensione mitocondriale a 540 nm, alle diverse concentrazioni.

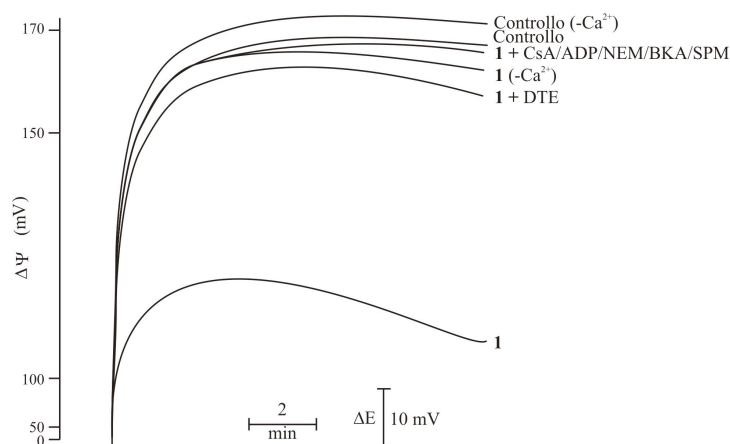
In presenza invece di calcio 20  $\mu$ M, concentrazione che non causa alterazioni di carattere osmotico sulla membrana mitocondriale, **1** alla concentrazione 50  $\mu$ M provoca una diminuzione dell'assorbanza apparente della sospensione

mitocondriale (con  $\Delta A$  di circa 0,8) indicando uno swelling della matrice di grande ampiezza. Questo dato permette di ipotizzare che **1** sia in grado di amplificare il leggero swelling indotto dal calcio e in grado quindi di agire come agente induttore della transizione della permeabilità mitocondriale. Si precisa, comunque, che **1** è in grado di provocare una diminuzione dell'assorbanza apparente con effetto dose-dipendente (dato non mostrato), ed è stata utilizzata una concentrazione di composto pari a 50  $\mu\text{M}$  in quanto concentrazione minima più efficace.

Sempre in figura 5.3 si può notare l'effetto protettivo di noti inibitori tipici della transizione di permeabilità mitocondriale sull'azione induttiva provocata da **1** (50  $\mu\text{M}$ ) in presenza di calcio: ciclosporina A (CsA), ADP, acido bongkreico (BKA). Viene riportato anche l'effetto degli antiossidanti ditioeritritolo (DTE) e spermina (SPM) e dell'agente alchilante N-etil maleimide (NEM) (Zoratti M. e Szabò I., 1995; Sava I.G. et al. 2006).

Questi primi risultati permettono di ipotizzare che l'eudesmano (**1**) alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  sia in grado, in presenza di calcio, di indurre uno swelling mitocondriale indicativo dell'induzione dell'MPT in quanto i principali inibitori di tale fenomeno e alcuni agenti antiossidanti sono in grado di esibire un effetto protettivo.

Parallelamente allo studio dell'induzione dello swelling mitocondriale è stato valutato un altro fenomeno che solitamente si accompagna al processo dell'MPT, ossia la caduta del  $\Delta\Psi$ .



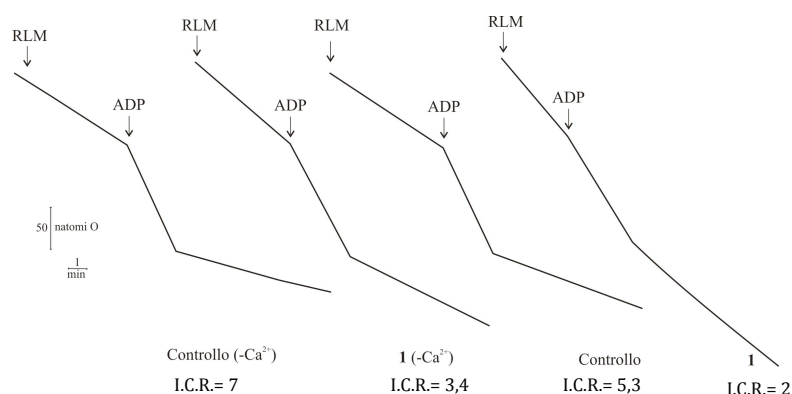
**Figura 5.4: Effetto di **1** sul potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ):** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (- $\text{Ca}^{2+}$ ); il composto **1** è presente ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, SPM 100  $\mu\text{M}$ , NEM 10  $\mu\text{M}$ .

Come osservabile in figura 5.4, il composto **1** (in assenza di calcio) provoca una lieve caduta di potenziale che viene fortemente aumentata dalla contemporanea presenza del catione nella sospensione mitocondriale.

Sempre in figura 5.4 vengono riportati gli effetti degli inibitori utilizzati nella valutazione dello swelling (figura 5.3), i quali esibiscono anche in questo caso una forte azione protettiva nei confronti del collasso del  $\Delta\Psi$  causato dalla contemporanea presenza di **1** 50  $\mu\text{M}$  e calcio nella sospensione mitocondriale. Questo dato conferma ulteriormente l'ipotesi che **1** sia in grado di provocare l'apertura del poro della MPT se presente anche il calcio. Inoltre, i risultati (protezione da parte di ADP e BKA) mettono in evidenza il coinvolgimento della traslocasi degli adenin nucleotidi, che, come noto è considerata una delle proteine maggiormente coinvolte nella formazione del poro (Zoratti M. e Szabò I., 1995).

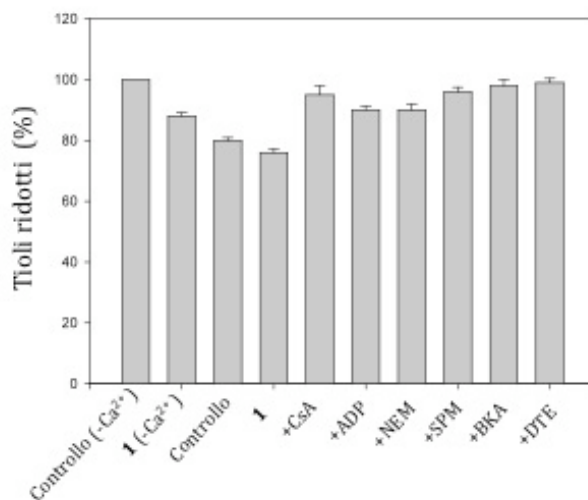
Per completare lo studio delle alterazioni di carattere bioenergetico a carico dei mitocondri da parte di **1**, si è valutato inoltre l'I.C.R. (Indice di Controllo Respiratorio), parametro che fornisce un'importante informazione sullo stato funzionale e bioenergetico dei mitocondri, in particolare permette di determinare il grado di accoppiamento del processo ossidativo con quello fosforilativo.

In figura 5.5 vengono riportati i risultati relativi alla determinazione dell'I.C.R. dai quali risulta evidente come il composto **1** (50  $\mu\text{M}$ ) provochi un disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa (I.C.R.=3,4) (come già descritto nel capitolo quarto), se comparato all'ottimo stato fosforilativo della prova di controllo (I.C.R.=7). È da sottolineare che il disaccoppiamento provocato da **1** viene fortemente aumentato dalla presenza del calcio (I.C.R.=2) indicando il verificarsi di un danno sulla membrana mitocondriale, come ad esempio l'apertura del poro della transizione.



**Figura 5.5: Effetto di **1** sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) mitocondriale:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. Tutte le incubazioni sono state condotte in presenza di calcio 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (-Ca<sup>2+</sup>); **1** è presente alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . I valori di ICR sono riportati in figura.

Come ormai ben noto, l'induzione dell'MPT è strettamente correlata con l'instaurarsi di uno stress ossidativo a carico di componenti mitocondriali. In particolare l'apertura del poro può avvenire in conseguenza all'ossidazione di due cisteine critiche situate sull'ANT (McStay G.P. et al., 2002). Sulla base di ciò è stato quindi determinato lo stato redox dei gruppi tiolici mitocondriali.

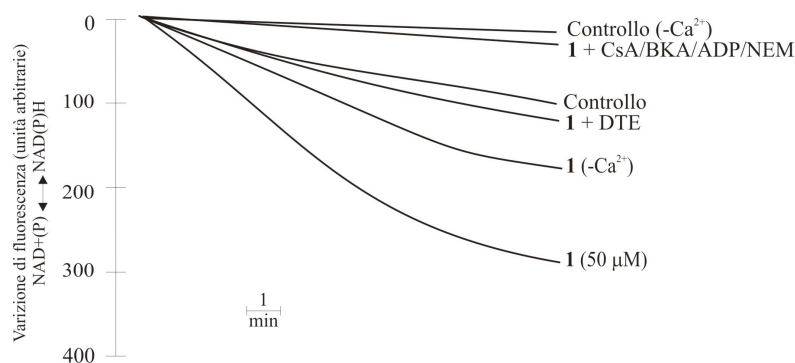


**Figura 5.6: Effetto dei differenti inibitori della transizione di permeabilità e di antiossidanti sullo stato redox dei gruppi sulfidrilici:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (-Ca<sup>2+</sup>) e nel controllo; il composto **1** è presente ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, SPM 100  $\mu\text{M}$ , NEM 10  $\mu\text{M}$ . I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

Dai dati riportati nell'istogramma di figura 5.6 si può notare come l'eudesmano **1** alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  (in assenza di calcio) sia in grado di provocare un'ossidazione dei gruppi sulfidrilici (valutata come diminuzione dei gruppi -SH) di circa un 13%, che viene aumentata a circa 25% in presenza di calcio. Tuttavia, è da considerare che il calcio da solo provoca un'ossidazione di circa il 20%. Nello stesso istogramma vengono riportati anche gli effetti degli inibitori e degli antiossidanti utilizzati nelle prove di determinazione di swelling e di  $\Delta\Psi$  che, come si può notare, sono in grado di prevenire l'effetto ossidativo indotto da **1** e calcio.

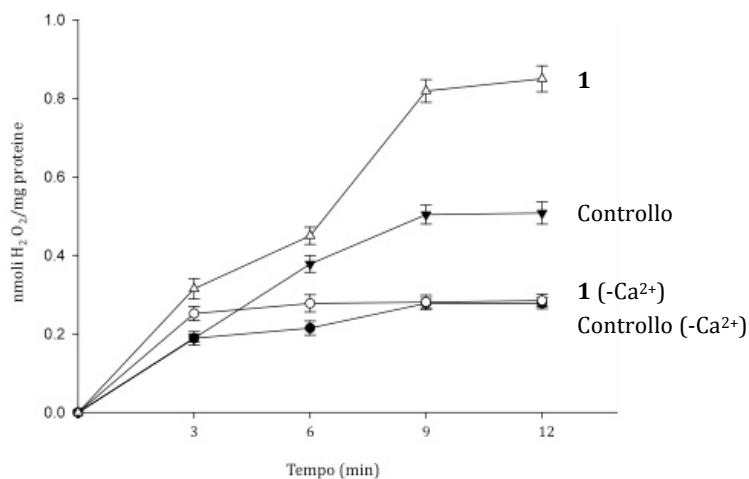
Data l'ossidazione a carico dei gruppi tiolici, si è voluto valutare se lo stress ossidativo fosse estendibile anche a livello dei nucleotidi piridinici. In figura 5.7 vengono riportati i risultati relativi a questo saggio. Il composto **1** (50  $\mu\text{M}$ ) in assenza di calcio è in grado di provocare un'ossidazione (valutabile come diminuzione di fluorescenza) dei piridin nucleotidi di quasi 200 U di fluorescenza.

La contemporanea presenza di **1** e calcio nella sospensione mitocondriale aumenta ulteriormente tale ossidazione, valutabile con una diminuzione della fluorescenza di quasi 300 U. Anche in questo caso i principali inibitori dell'apertura del poro (CsA, ADP, BKA) proteggono dall'effetto ossidativo causato da **1** e calcio. Anche l'agente alchilante NEM è in grado di proteggere tale effetto. L'agente riducente DTE invece presenta una parziale protezione.



**Figura 5.7: Effetto dei differenti inibitori della transizione di permeabilità e di antiossidanti sullo stato redox dei nucleotidi piridinici:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (- $\text{Ca}^{2+}$ ); il composto **1** è presente ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, NEM 10  $\mu\text{M}$ .

L'analisi dell'effetto ossidante causato da **1** 50  $\mu\text{M}$  in presenza di calcio sui componenti mitocondriali (gruppi tiolici e piridin nucleotidi) ha portato ad indagare sulla possibile capacità da parte del composto, di indurre generazione di perossido di idrogeno anche a questa concentrazione.



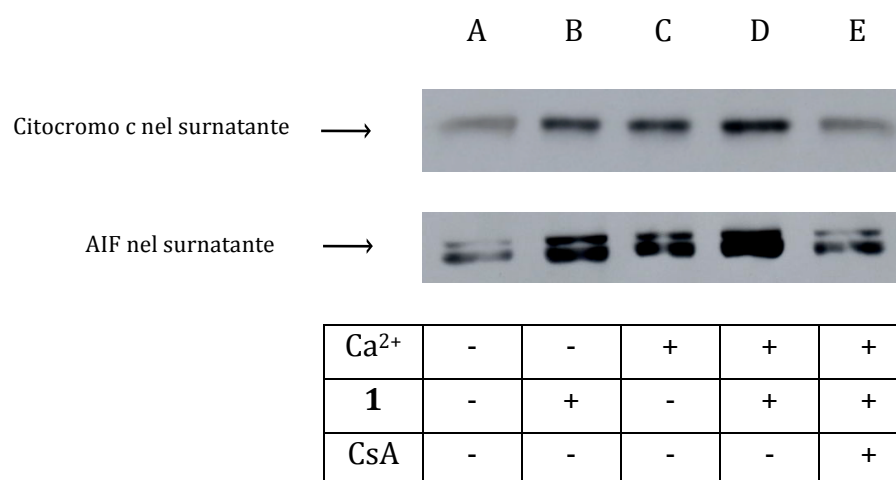
**Figura 5.8: Produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  da parte dei mitocondri incubati in presenza di **1**:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di **1** alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Il calcio è presente ad una concentrazione di 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (- $\text{Ca}^{2+}$ ). Il grafico esprime la quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  prodotta nelle diverse condizioni. I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

Dai risultati riportati in figura 5.8 è possibile notare che **1** (in assenza di calcio) è in grado di provocare produzione di acqua ossigenata anche alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ .

Inoltre, se **1** 50  $\mu\text{M}$  e calcio sono contemporaneamente presenti nel mezzo di incubazione, incrementano ulteriormente lo sviluppo di perossido di idrogeno. Tale specie è probabilmente responsabile dell'ossidazione dei componenti mitocondriali e, in conseguenza, anche dell'apertura del poro.

### Rilascio dei fattori pro-apoptotici

Si è analizzata infine, la capacità da parte dell'eudesmano **1** di provocare il rilascio dei fattori pro-apoptotici citocromo c e AIF, i quali in conseguenza all'apertura del poro e quindi ad alterazioni strutturali dei mitocondri, possono essere rilasciati dagli stessi ed innescare il processo apoptotico.



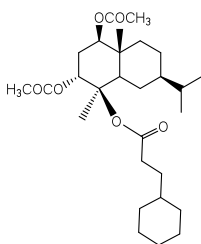
**Figura 5.9: Rilascio del citocromo c e dell'AIF indotto da 1:** in figura il risultato del Western blotting sulle frazioni del soprannatante. RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. Il composto **1** è presente ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ , il calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$  e CsA 1  $\mu\text{M}$ .

Come evidenziato in figura 5.9 il composto **1** alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  (bande B) è in grado di provocare in assenza di calcio il rilascio dei due fattori pro-apoptotici, se paragonato ai controlli (bande A). L'aggiunta di calcio, che anche da solo provoca un certo rilascio dei due fattori (bande C), va ad aumentare significativamente l'efflusso sia di citocromo c sia di AIF dai mitocondri (bande D). Quest'ultimo effetto viene quasi completamente inibito dalla presenza di CsA (bande E). Questo risultato conferma l'avvenuta apertura del poro della transizione di permeabilità provocato dalla sinergica azione di **1** e calcio.



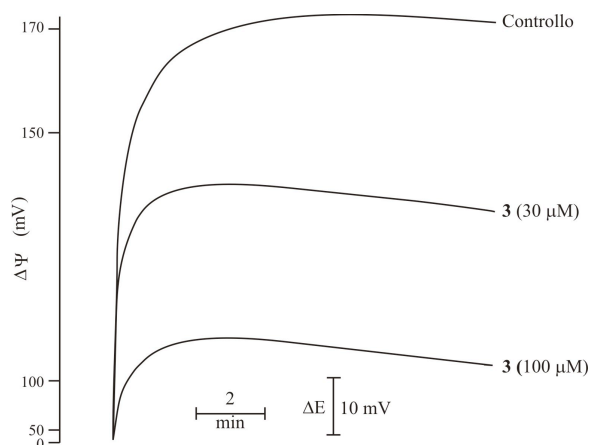


### 5.3 Studio del meccanismo d'azione del composto 4 $\beta$ -(3-cicloesil)-propionilossi-1 $\beta$ , 3 $\alpha$ -diacetilossi eudesmano, (**3**)



**Figura 5.10:** struttura chimica del composto **3**, 4 $\beta$ -(3-cicloesil)-propionilossi-1 $\beta$ , 3 $\alpha$  -diacetilossi eudesmano.

Da un primo screening effettuato sul composto **3**, utilizzato a diverse concentrazioni (figura 5.11) e volto allo studio dell'effetto del composto sul potenziale elettrico della membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi$ ), si può notare come esso sia in grado di provocare una forte diminuzione del  $\Delta\Psi$  rispetto al controllo. In particolare alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , provoca rispetto al controllo, una diminuzione da 170 mV a circa 100 mV. Ad una concentrazione più bassa (30  $\mu\text{M}$ ) si osserva comunque una diminuzione del  $\Delta\Psi$ , anche se di minore entità.

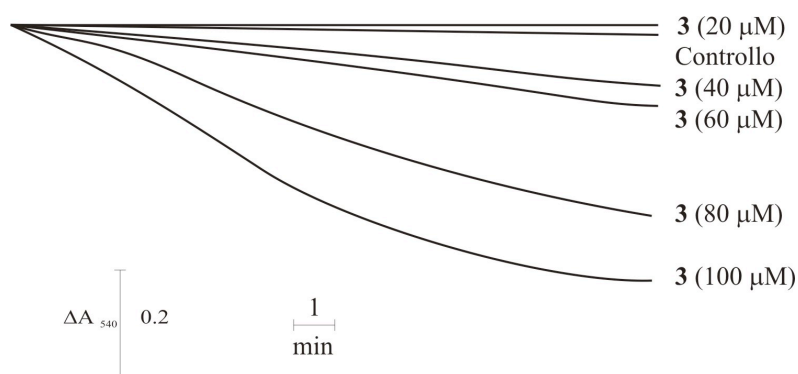


**Figura 5.11: Effetto di 3 sul potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ):** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. Le concentrazioni di **3** sono indicate in figura.

L'osservazione che **3** provoca una caduta del  $\Delta\Psi$ , indicativa di un'alterazione di permeabilità della membrana, suggerisce la possibilità che questa sostanza possa indurre anche fenomeni di natura colloidale negli organelli. A questo riguardo (per mettere in evidenza una possibile attività di **3** quale agente induttore

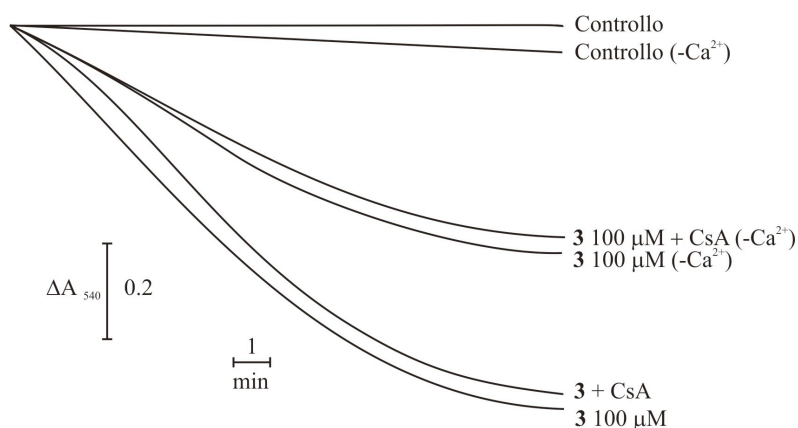
della transizione di permeabilità mitocondriale) è stata valutata anche l'induzione dello swelling

Come già precedentemente descritto uno "swelling" di grande ampiezza può instaurarsi quando forti quantità di soluti, presenti nel medium di incubazione, entrano nella matrice mitocondriale causando un aumento della pressione osmotica. La prova è valutabile allo spettrofotometro mediante una diminuzione dell'assorbanza apparente, valutata a 540 nm, della sospensione mitocondriale.



**Figura 5.12: Effetto di 3 sullo swelling mitocondriale:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. Le concentrazioni di 3 sono indicate in figura.

I risultati riportati in figura 5.12 evidenziano come 3, aggiunta alle diverse concentrazioni ai mitocondri incubati nel medium standard, provochi una diminuzione dell'assorbanza apparente della sospensione mitocondriale, in dipendenza della dose utilizzata, rispetto al solo controllo. Questo risultato è indicativo dell'induzione di uno swelling della matrice.



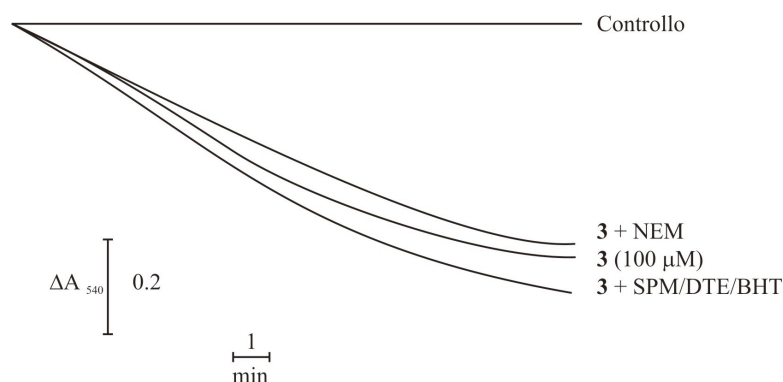
**Figura 5.13: Effetto di 3 sullo swelling mitocondriale:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$  tranne dove indicato (- $\text{Ca}^{2+}$ ); il composto 3 è presente ad una concentrazione 100  $\mu\text{M}$  e CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ .

In figura 5.13, **3** presente alla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$  (ossia la concentrazione in grado di provocare la massima diminuzione di assorbanza apparente), aggiunto ai mitocondri incubati nel medium standard, contenente succinato quale substrato energizzante e calcio 20  $\mu\text{M}$ , provoca un'ulteriore diminuzione dell'assorbanza apparente della sospensione mitocondriale rispetto alla condizione con solo **3**.

L'osservazione che **3**, in presenza di calcio, provoca un intenso swelling dei mitocondri, suggerisce che il composto possa essere in grado di indurre il fenomeno della MPT.

Tuttavia, sempre i risultati riportati in figura 5.13, non permettono di confermare questa ipotesi, in quanto l'aggiunta nel mezzo di incubazione di CsA, tipico inibitore della MPT, non è in grado di proteggere l'effetto provocato da **3** in presenza di calcio. Inoltre l'aggiunta di CsA non è in grado di inibire nemmeno l'effetto provocato dal solo derivato **3**.

Questi dati permettono quindi di concludere che l'effetto osservato in seguito al trattamento con **3** non è dovuto all'induzione del fenomeno della transizione della permeabilità mitocondriale, sia in presenza che in assenza di calcio.



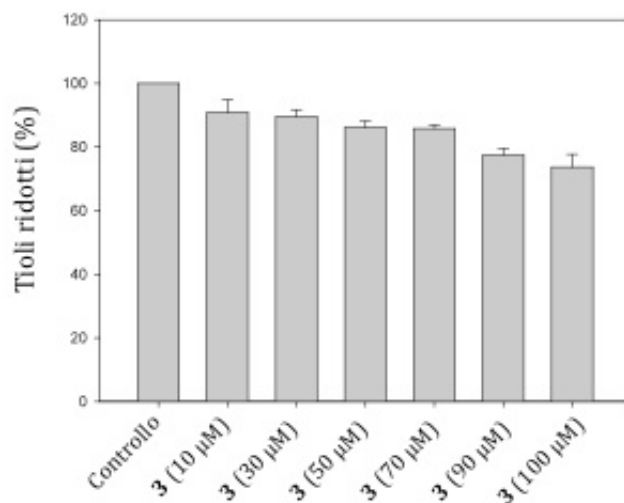
**Figura 5.14: Effetto dei differenti antiossidanti sullo swelling mitocondriale:** RLM (1mg/ml) sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. Il composto **3** è presente ad una concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, SPM 100  $\mu\text{M}$ , NEM 10  $\mu\text{M}$ , BHT 50  $\mu\text{M}$ .

Inoltre, i risultati riportati in figura 5.14 mostrano che l'effetto osmotico provocato da **3**, in assenza di calcio, non viene bloccato se nel mezzo di incubazione è presente l'agente alchilante N-etil-maleimmide (NEM) e gli agenti antiossidanti ditioeritritolo (DTE), spermina (SPM) e butilidrossitoluene (BHT).

Pertanto, i risultati complessivamente riportati permettono di ipotizzare che **3** sia in grado di provocare un'alterazione della membrana mitocondriale. Un'ipotesi formulata per spiegare questo effetto è stata quella di un possibile stress ossidativo indotto dal composto.

La determinazione dei tioli di membrana ridotti permette di correlare l'effetto di **3** alle variazioni dello stato redox mitocondriale, che si potrebbero verificare in seguito a danni a carico della membrana.

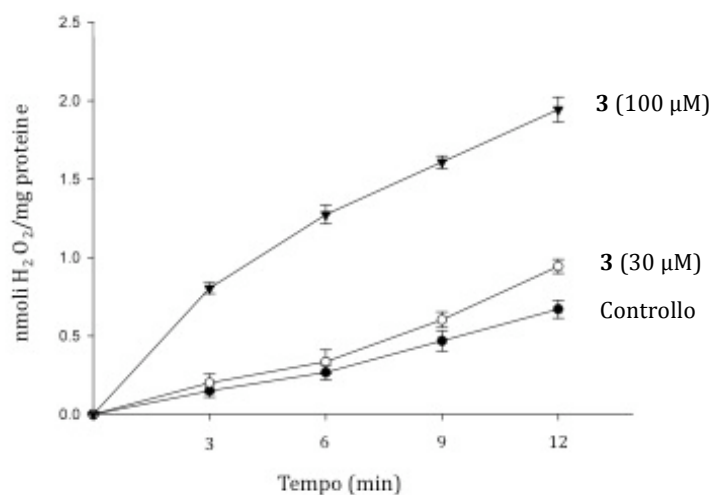
I risultati riportati in figura 5.15 dimostrano che **3** è in grado di provocare una marcata ossidazione dei gruppi tiolici mitocondriali, valutata come diminuzione dei gruppi -SH, con un effetto dose dipendente.



**Figura 5.15: Determinazione dello stato redox dei gruppi sulfidrilici mitocondriali:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. **3** è presente alle diverse concentrazioni indicate in figura I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

È da sottolineare il fatto che **3**, presente nella sospensione mitocondriale alle concentrazioni 30 µM e 100 µM, provoca un'ossidazione di circa 10 % e 28 % dei tioli di membrana, rispettivamente, rispetto al controllo.

L'osservazione che **3** induce uno stress ossidativo ha spinto ad indagare se è anche in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno. È importante sottolineare che i mitocondri in condizioni fisiologiche sono in grado di produrre perossido di idrogeno come conseguenza della loro respirazione; tuttavia, in condizioni normali, i sistemi "scavenger" endogeni provvedono ad eliminare questa molecola tossica (Kowaltowski A.J. et al., 2009).

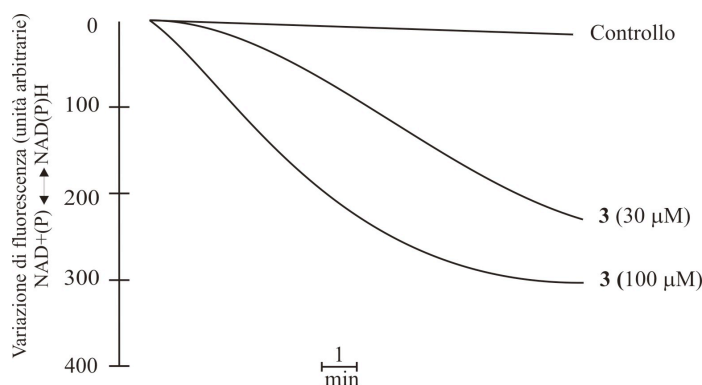


**Figura 5.16: Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte dei mitocondri incubati in presenza di 3:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di **3** alle concentrazioni 30 e 100 μM. Il grafico esprime la quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta nelle diverse condizioni. I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti ± deviazione standard.

A tale scopo, mediante metodo fluorimetrico, è stato eseguito il dosaggio del perossido d'idrogeno ed i risultati riportati in figura 5.16 dimostrano che **3** alla concentrazione 30 μM, produce una quantità di perossido di idrogeno di poco maggiore rispetto al controllo. Al contrario, alla concentrazione 100 μM, **3** è in grado di incrementare significativamente la produzione di acqua ossigenata mitocondriale rispetto al controllo.

Sulla base dei risultati precedenti, nei quali si dimostra che **3** è in grado di produrre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, quindi, di esibire un effetto ossidante sui gruppi sulfidrilici, si è voluto verificare se questa azione fosse estendibile anche a nucleotidi, responsabili del mantenimento dell'omeostasi redox, quali i nucleotidi piridinici NAD e NADP.

In figura 5.17 vengono riportati i risultati dello stato di ossidazione di questi nucleotidi in presenza di **3** alle concentrazioni 100 μM e 30 μM.



**Figura 5.17: Effetto di 3 sullo stato redox dei nucleotidi piridinici:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. 3 è presente a concentrazioni indicate.

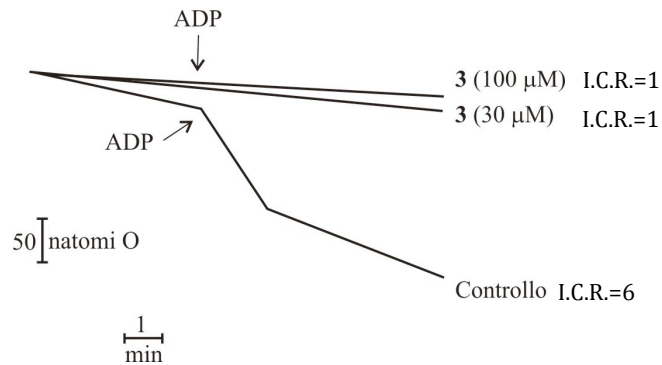
Si può notare come la presenza, nella sospensione mitocondriale, del derivato **3** 100  $\mu\text{M}$  sia in grado di provocare una marcata ossidazione dei piridin nucleotidi, quantificabile con una diminuzione di circa 300 U di fluorescenza.

Pertanto, la dimostrazione dell'ossidazione dei gruppi tiolici di membrana, di produzione di acqua ossigenata e di ossidazione dei piridin nucleotidi indica chiaramente l'induzione di uno stress ossidativo mitocondriale da parte di **3**. Tali risultati suggeriscono l'ipotesi che il composto sia in grado di interagire con la membrana mitocondriale, con meccanismo ancora sconosciuto, provocando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste specie reattive sarebbero responsabili dello stress ossidativo osservato.

I risultati riportati hanno messo in evidenza gli effetti dannosi di **3** sulla membrana mitocondriale e indicano anche una possibile compromissione delle capacità energetiche dei mitocondri stessi.

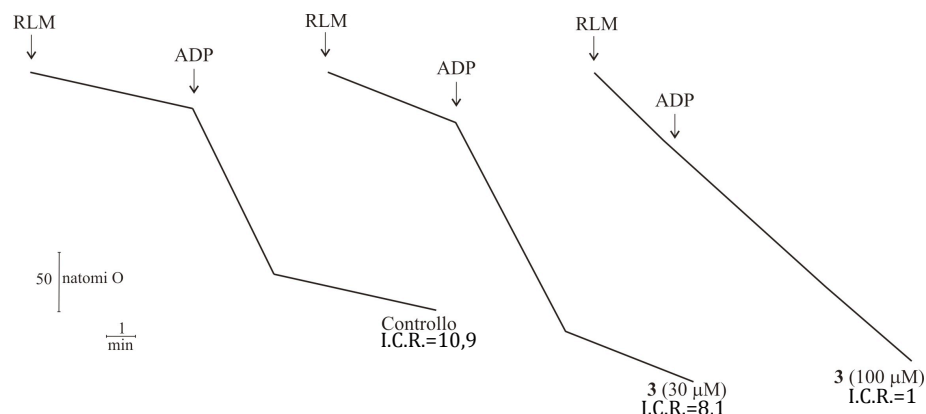
In figura 5.18 si riferiscono all'esperimento per il calcolo dell'I.C.R. Nella prova di controllo i mitocondri esibiscono un I.C.R. di 6 a dimostrazione di un'ottima capacità energetica degli organelli.

La presenza di **3** a due diverse concentrazioni, 30  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , provoca una forte inibizione della respirazione mitocondriale, sia in presenza che in assenza della sintesi di ATP, dovuta probabilmente ad una interazione da parte del derivato con il secondo complesso della catena respiratoria. Ma è anche evidente, dalla completa mancanza di un I.C.R. (è uguale a 1), che ci sia una compromissione del sistema ATP-sintetasi.



**Figura 5.18: Effetto di 3 sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) mitocondriale:** RLM sono stati incubati nelle stesse condizioni sperimentali indicate in *Materiali e metodi*. 3 è presente alle concentrazioni indicate, l'ADP è aggiunto alla concentrazione di 300 µM. I valori di I.C.R. sono indicati in figura.

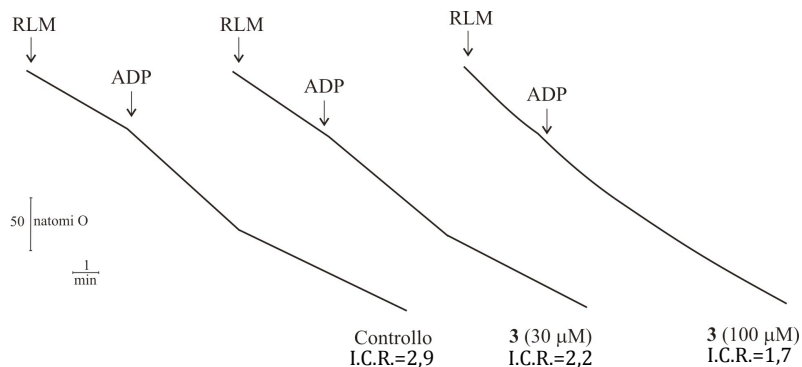
Come già accennato in precedenza, considerando che il substrato utilizzato è il succinato, la cui ossidazione avviene in presenza di rotenone, inibitore dell'ossidazione dei substrati NAD-dipendenti, è possibile suggerire che il complesso respiratorio coinvolto nell'inibizione sia il II. Per avvalorare questa ipotesi sono state condotte ulteriori prove utilizzando differenti substrati specifici della catena respiratoria.



**Figura 5.19: Effetto di 3 sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) mitocondriale:** RLM sono stati incubati nel medium (Saccarosio 200 mM, Na-Hepes 10 mM, β-idrossibutirrato 5 mM, Fosfato 1 mM). 3 è presente alle concentrazioni indicate, l'ADP è aggiunto alla concentrazione di 300 µM. I valori di I.C.R. sono indicati in figura.

I risultati di figura 5.19 dimostrano che utilizzando β-idrossibutirrato quale substrato energizzante, che invia elettroni al I complesso della catena respiratoria, i mitocondri trattati con il composto 3 non presentano alcuna inibizione del complesso I. Si può quindi escludere una possibile interazione da parte del composto 3 con il I complesso della catena respiratoria. Si può inoltre notare come la presenza del composto sia in grado di provocare un disaccoppiamento della

respirazione con la fosforilazione ossidativa, risultato che ulteriormente supporta una possibile interazione da parte del composto con l'ATP-sintetasi.



**Figura 5.20: Effetto di 3 sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.):** RLM sono stati incubati nel medium (Saccarosio 200 mM, Na-Hepes 10 mM, Ascorbato 6 mM, Ferricianuro 500 μM, Fosfato 1 mM). 3 è presente alle diverse concentrazioni indicate. L'ADP è aggiunto alla concentrazione di 300 μM.

Sono state effettuate inoltre altre prove utilizzando un medium di incubazione contenente un substrato artificiale, ascorbato in presenza di ferricianuro, che funge da "shuttle" di elettroni verso il citocromo c e quindi al IV complesso della catena respiratoria.

La sospensione mitocondriale corrispondente al controllo presenta un I.C.R. pari a 2,9, figura 5.20, mentre la sospensione mitocondriale trattata con il composto 3 presenta un I.C.R. pari a 2,2 per la concentrazione 30 μM e un I.C.R. pari ad 1,7 per la concentrazione 100 μM, con un'evidente diminuzione dell'attività fosforilativa senza, tuttavia attività inibitoria del consumo di ossigeno.

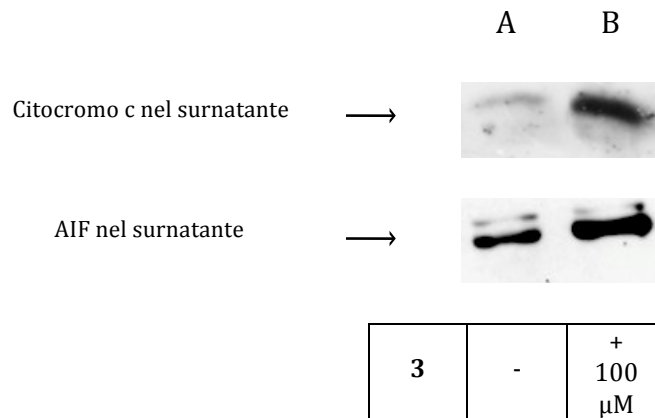
Si può quindi ipotizzare, dai dati ottenuti, che il composto 3 sia in grado di interagire con il complesso II della catena respiratoria esplicando un'attività inibitoria, ma che sia anche in grado di esercitare una compromissione del sistema ATP-sintasi.



### Rilascio dei fattori pro-apoptotici

Si è voluto infine valutare se **3** fosse in grado di provocare il rilascio dei due fattori pro-apoptotici quali il citocromo c e l'AIF.

I risultati riportati nell'immunoblot in figura 5.21 evidenziano come **3** alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  (B) sia in grado di determinare un forte rilascio sia di citocromo c sia di AIF, come riscontrabile dall'aumento dell'intensità delle bande corrispondenti, rispetto al controllo (A).



**Figura 5.21: Rilascio del citocromo c e dell'AIF indotto da 3:** in figura il risultato del Western blotting sulle frazioni del soprannatante. RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. Il composto **3** è presente ad una concentrazione 100  $\mu\text{M}$ .

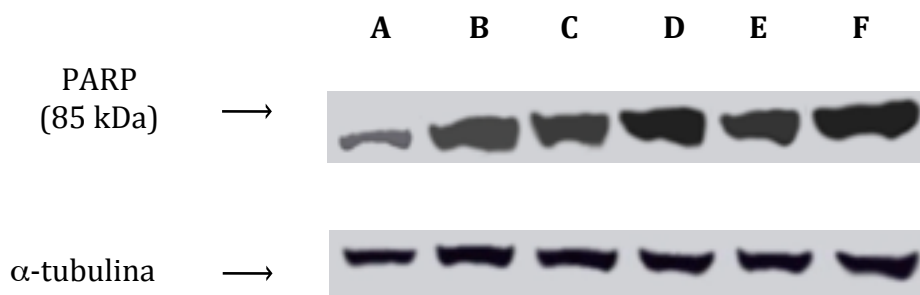
## Determinazione della frammentazione di PARP

Come descritto in precedenza il taglio della proteina PARP (da parte della caspasi 3) è uno dei principali marker dell'induzione del processo apoptotico (Cohen G.M., 1997).

In figura 5.22 vengono riportati i risultati riguardanti l'effetto sulla proteina PARP, stratta da lisati totali di cellule HeLa, trattate con i composti **1- 4**.

Si può notare come i composti in esame (bande C-F) siano in grado di provocare il taglio della proteina (frammento di 85 kDa) se paragonati alle sole cellule non trattate (A), come dimostrato dalla maggiore intensità delle bande C-F rispetto ad A. Come farmaco di riferimento viene riportato l'effetto dell'etoposide (B) utilizzato alla stessa concentrazione.

Per conferma che in ogni campione, impiegato nel Western blotting, fosse presente la stessa quantità di proteine cellulari, è stato utilizzato parallelamente un anticorpo anti  $\alpha$ -tubulina. Come si può notare, ciascuna delle sei bande ha intensità simile, indice che in ognuno dei campioni è presente la stessa quantità di questa proteina.



**Figura 5.22: Taglio di PARP indotto da 1, 2, 3 e 4 estratto da cellule HeLa.** Il frammento di 85 kDa di PARP tagliato nell'estratto totale di proteine, è stato analizzato mediante Western blotting.

Bande:

A: controllo non trattate

B: etoposide (25  $\mu$ M)

C: composto **1** (25  $\mu$ M)

D: composto **2** (25  $\mu$ M)

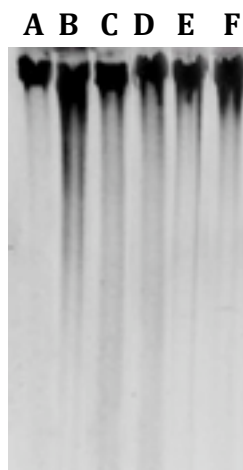
E: composto **3** (25  $\mu$ M)

F: composto **4** (25  $\mu$ M)

## Saggio di frammentazione del DNA

La capacità dei composti studiati di indurre apoptosi delle cellule tumorali è stata valutata anche mediante il saggio di frammentazione del DNA, utilizzando come farmaco di riferimento il cis-platino.

Di seguito è riportata l'elettroforesi su gel di agarosio del DNA nucleare estratto da cellule HeLa trattate con i composti in esame.



**Figura 5.23: elettroforesi su gel di agarosio di DNA estratto da cellule HeLa.**

Bande:

**A:** controllo non trattate

**B:** cis-platino (50  $\mu\text{M}$ )

**C:** composto **1** (50  $\mu\text{M}$ )

**D:** composto **2** (50  $\mu\text{M}$ )

**E:** composto **3** (50  $\mu\text{M}$ )

**F:** composto **4** (50  $\mu\text{M}$ )

Dall'analisi della corsa elettroforetica riportata in figura 5.23 si può notare che il DNA estratto dalle cellule non trattate (A), data la notevole dimensione e compattezza, migra nel gel di elettroforesi con una velocità piuttosto bassa. Diversamente, l'acido nucleico estratto da cellule cui è stato aggiunto il farmaco di riferimento cis-platino (B), poiché è stato frammentato in oligonucleotidi più piccoli, è caratterizzato da una corsa più veloce ed evidenzia una serie continua di bande.

Nel saggio in esame il DNA nucleare estratto dalle cellule trattate con i composti **1-4** (C-F) alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$  migra più velocemente del DNA non trattato (banda A), e mostra un aumento della quantità di frammenti presenti.

Si può quindi confermare che i composti **1-4** possiedono attività pro-apoptotica, sebbene non paragonabile al farmaco di riferimento (B).

## Discussione

In questo capitolo è stato messo in evidenza l'effetto biologico dell'eudesmano 4 $\beta$ -cinnamoilossi,1 $\beta$ ,3 $\alpha$  diidrossieudesm-7,8-ene (**1**) e dei suoi tre derivati di semisintesi (**2-4**). Tali composti, come rilevabile dalla tabella 5.1, esercitano un effetto citotossico su alcune linee cellulari tumorali umane. Dai risultati riportati in tabella appare evidente come il composto **1** sia in grado di esplicare una maggiore attività sulle cellule MSTO 211H e HeLa, mentre per tutti e quattro i composti si hanno valori di IC<sub>50</sub>  $\geq$  20  $\mu$ M sulle cellule A431 e HL-60, risultando quindi, queste ultime, le meno sensibili. Non è possibile tuttavia, dai valori di citotossicità ottenuti, trarre delle conclusioni sulla specificità d'azione.

Dato il ruolo rilevante giocato dai mitocondri nell'induzione del processo apoptotico attraverso la formazione del poro della MPT (Tsujimoto Y. et al., 2006) e vista la capacità del composto **1** di agire a livello mitocondriale (come dimostrato nel capitolo quarto), si è voluta analizzare la capacità dell'eudesmano (**1**) e dei tre derivati di provocare il suddetto fenomeno.

Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che il composto **1** sia in grado di causare, alla concentrazione 50  $\mu$ M ed in presenza di calcio, un rigonfiamento della matrice mitocondriale (swelling colloidale-osmotico) valutabile dalla diminuzione dell'assorbimento apparente della sospensione mitocondriale (figura 5.3). Questo effetto è chiaramente indice dell'apertura del poro della MPT, in quanto i principali inibitori di tale fenomeno presentano un evidente effetto protettivo (figura 5.3). Questa ipotesi è ulteriormente confermata dai risultati riportati in figura 5.4, relativi al collasso del potenziale. Anche in questo caso gli inibitori utilizzati nelle prove di swelling, proteggono l'effetto provocato da **1** in presenza di calcio sulla caduta di potenziale. Inoltre, dato che inibitori quali BKA e ADP dimostrano un effetto protettivo, i risultati suggeriscono il coinvolgimento dell'ANT nell'apertura del poro. Un ulteriore dato che supporta l'ipotesi che **1** in presenza di calcio è in grado di provocare modifiche strutturali e funzionali a carico della membrana mitocondriale, è stato ottenuto attraverso la valutazione dell'I.C.R. In figura 5.5 infatti si nota come il disaccoppiamento del processo della fosforilazione ossidativa indotto dal solo composto **1**, viene ulteriormente aumentato dalla presenza del catione. Questi dati hanno quindi permesso di mettere in risalto un'altra proprietà del composto **1**, ossia la capacità dello stesso (in presenza di calcio in qualità di co-induttore) di promuovere l'instaurarsi del processo della MPT. Inoltre, dallo studio condotto, è stato possibile ottenere informazioni aggiuntive sulla capacità del composto di indurre stress ossidativo, condizione che, come ormai ben noto, accompagna

l'innescò della MPT (Kowaltowski A.J. et al., 2001). Infatti, **1** da solo provoca un'ossidazione di circa il 13% (istogramma di figura 5.6) dei gruppi tiolici mitocondriali che viene incrementata al 25% dalla contemporanea presenza di calcio e oltre a ciò gli inibitori della MPT usati nelle prove di swelling e potenziale manifestano anche in questo caso un effetto protettivo. L'effetto ossidativo provocato dall'eudesmano (**1**) in presenza di calcio avviene anche a carico di altri componenti mitocondriali come i piridin nucleotidi (figura 5.7), i quali subiscono un'ossidazione valutabile con una diminuzione della loro fluorescenza di circa 300 U, con completa protezione da parte degli inibitori utilizzati nelle prove precedenti e parzialmente protetta dall'agente riducente DTE. Tali ossidazioni sono probabilmente dovute alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, in particolare alla generazione di perossido di idrogeno, causata dalla concomitante presenza nella sospensione mitocondriale di **1** e calcio (figura 5.8). I dati riportati in questo studio hanno anche permesso di evidenziare il fatto che in conseguenza all'apertura del poro della MPT, si ha rilascio dei fattori pro-apoptotici citocromo c e AIF (figura 5.9), correlando in questo modo l'attività citotossica riscontrata sulle cellule tumorali con l'attività del composto a livello mitocondriale.

Come riportato all'inizio del capitolo, il composto **2** mostra un comportamento del tutto simile a quello esibito dal composto **1**. Infatti anche **2** è in grado di indurre il fenomeno della MPT, provocando quindi, alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  ed in presenza di calcio, swelling mitocondriale e collasso del potenziale elettrico (dati non mostrati). Tali effetti sono inibiti dai principali inibitori della MPT e dagli agenti antiossidanti ed alchilanti.

Inoltre valutando l'I.C.R., (tabella 5.2) appare evidente che **2**, in presenza di calcio, provoca un disaccoppiamento del processo di ossidazione con quello di fosforilazione. Confrontando il controllo che presenta un valore ottimale di I.C.R. (pari a 8,4), con le altre condizioni, si nota chiaramente che **2** in presenza di calcio (I.C.R.=2,2), induce un danno della membrana mitocondriale tale da provocare un disaccoppiamento della respirazione.

	I.C.R.
Controllo	8,4
<b>2</b> (-Ca <sup>2+</sup> )	3,8
Ca <sup>2+</sup>	7,9
<b>2</b> +Ca <sup>2+</sup>	2,2

**Tabella 5.2: calcolo dell'I.C.R. in presenza di **2** e calcio:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato (-Ca<sup>2+</sup>) e nel controllo; il composto **2** è presente ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ .

In aggiunta alle misure di swelling, di potenziale e alla determinazione dell'I.C.R. è stato valutato anche l'effetto ossidativo indotto da **2**, sempre in presenza di calcio, a carico dei vari componenti mitocondriali (gruppi tiolici e piridin nucleotidi) e la generazione del perossido di idrogeno (tabella 5.3).

<b>Effetti ossidativi del composto 2</b>	
<b>Ossidazione dei gruppi SH</b>	33% rispetto al controllo
<b>Ossidazione dei piridin nucleotidi</b>	Aumento dell'ossidazione misurata attraverso una diminuzione di fluorescenza di circa 200 U rispetto al controllo
<b>Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	264% rispetto al controllo

**Tabella 5.3: effetti ossidativi in presenza di 2 (50 µM) e calcio (20 µM) e produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Dai risultati ottenuti nello studio del meccanismo d'azione del composto **2**, è emerso quindi come il composto sia in grado di comportarsi analogamente al composto **1**, e di agire perciò in presenza di calcio, come induttore del fenomeno della MPT, provocando inoltre una condizione di stress ossidativo che accompagna il suddetto fenomeno. Il composto **2** è anche in grado di provocare il rilascio dei fattori pro-apoptotici citocromo c e AIF, effetto aumentato dalla presenza del calcio e inibito dalla CsA, risultato quest'ultimo che conferma l'apertura del poro della MPT (dati non mostrati).

In questo lavoro è presentato anche lo studio del meccanismo d'azione del composto **3** per il quale è emerso un comportamento diverso rispetto a quello dei composti **1** e **2**. Infatti **3** induce swelling mitocondriale anche in assenza di calcio con effetto dose-dipendente, massimo alla concentrazione 100 µM (figura 5.12) ed è in grado di provocare un completo collasso del  $\Delta\Psi$  alla concentrazione 100 µM (figura 5.11). Tuttavia questi effetti non sono dovuti all'apertura del poro della MPT in quanto il principale inibitore di tale fenomeno, la CsA, non è in grado di inibire lo swelling provocato da **3** alla concentrazione 100 µM sia in assenza che in presenza di calcio, il quale amplifica ulteriormente la diminuzione di assorbanza indotta da **3** (figura 5.13). Si sottolinea il fatto che **3** è anche in grado di instaurare una condizione di stress ossidativo con conseguente ossidazione dei componenti mitocondriali quali i gruppi tiolici (figura 5.15) provocandone, alla concentrazione 100 µM, un'ossidazione massima di circa 28%. Tale ossidazione si osserva anche a carico dei piridin nucleotidi (figura 5.17) con una diminuzione della fluorescenza di circa 300 U. L'effetto ossidativo è dovuto molto probabilmente alla produzione di perossido di idrogeno (figura 5.16).

Un particolare effetto del derivato **3** evidenziato in questo studio, è la capacità dello stesso di provocare inibizione del complesso II (succinato deidrogenasi), come riportato dalla determinazione dell'I.C.R. in figura 5.18. I dati dimostrano infatti come alle due diverse concentrazioni, 30 e 100  $\mu\text{M}$ , **3** sia in grado di inibire il consumo di ossigeno e anche il processo fosforilativo dell'ADP. Inoltre, utilizzando specifici substrati della catena respiratoria come  $\beta$ -idrossibutirrato quale substrato energizzante, che invia elettroni al I complesso della catena respiratoria (figura 5.19) e ascorbato in presenza di ferricianuro, che funge da "shuttle" di elettroni verso il citocromo c e quindi al IV complesso (figura 5.20), il composto **3** non inibisce la respirazione, confermando l'ipotesi che il derivato interagisce con il II complesso della catena respiratoria inibendolo. Il composto **3**, in seguito alle alterazioni strutturali e bioenergetiche provocate a livello mitocondriale, induce anche il rilascio dei fattori pro-apoptotici citocromo c e AIF (figura 5.21).

Lo studio preliminare del meccanismo d'azione del derivato **4**, ha permesso di mettere in evidenza un suo comportamento analogo a quello del composto **3**. In tabella 5.4 vengono indicati i valori di I.C.R. determinati utilizzando i diversi e specifici substrati dei complessi della catena respiratoria, utilizzati anche nello studio del composto **3**. Dai risultati riportati in tabella si evidenzia anche per il derivato **4** un'attività inibitoria sul complesso II della catena respiratoria mitocondriale.

	I.C.R. (succinato/rotenone)	I.C.R. ( $\beta$ -idrossibutirrato)	I.C.R. (ferricianuro/ascorbato)
Controllo	7,6	6,5	2,5
<b>4</b> (30 $\mu\text{M}$ )	1 (inibizione)	2,5	2
<b>4</b> (100 $\mu\text{M}$ )	1 (inibizione)	2,3	1,6

**Tabella 5.2: calcolo dell'I.C.R. in presenza di 4.**

Infine, il saggio di frammentazione del DNA estratto dalle cellule HeLa (figura 5.23) ha permesso di evidenziare che i composti **1-4** possiedono attività pro-apoptotica molto probabilmente in conseguenza all'attivazione della via intrinseca con rilascio dei fattori pro-apoptotici AIF e citocromo c. Quest'ultimo in particolare promuove l'attivazione della caspasi 3 (Fulda S., 2010), enzima importante nell'esecuzione dell'apoptosi e responsabile, totalmente o parzialmente, del taglio proteolitico di proteine chiave coinvolte nel processo apoptotico, come l'enzima nucleare PARP (figura 5.22) (Cohen G.M., 1997).

## Conclusioni

Dallo studio svolto e riportato in questo capitolo si può concludere che l'eudesmano (**1**) e i suoi tre derivati di semisintesi esibiscono un effetto antiproliferativo su linee cellulari tumorali umane ed in particolare esplicano la loro azione a livello mitocondriale, sebbene con meccanismi d'azione diversi.

Dai dati presentati è stato possibile evidenziare delle differenze di attività dei composti, suggerendo così delle apprezzabili specificità d'azione. Sulla base di ciò è pertanto possibile formulare alcune considerazioni sui rapporti struttura-attività.

In particolare i composti **1** e **2**, i quali non presentano acetilazione dei gruppi idrossilici, agiscono stimolando in presenza di calcio il processo della MPT, fenomeno accompagnato da una condizione di stress ossidativo a carico dei diversi componenti mitocondriali e conseguente rilascio dei fattori pro-apoptotici.

I composti **3** e **4**, che presentano i gruppi idrossilici acetilati sono in grado di inibire la succinato deidrogenasi (complesso II della catena respiratoria). In particolare, dallo studio presentato per il composto **3**, si è potuto constatare come il derivato sia in grado di provocare generazione di specie radicaliche dell'ossigeno (nel dettaglio perossido di idrogeno), probabilmente proprio in conseguenza all'inibizione del II complesso, causando in questo modo danni bioenergetici e strutturali mitocondriali con conseguente rilascio dei fattori pro-apoptotici.

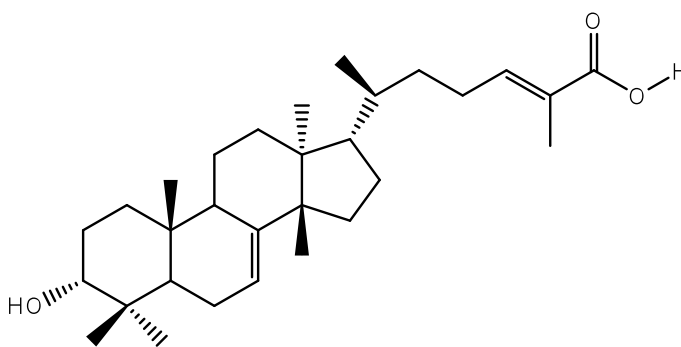
Sembra quindi che l'acetilazione dei gruppi idrossilici conferisca ai derivati (**3** e **4**) la capacità di inibire il complesso della succinato deidrogenasi, mentre i gruppi idrossilici liberi (**1** e **2**) dirigono l'azione verso la stimolazione del processo di MPT. Inoltre l'eliminazione dei doppi legami -C-C- (composti **2** e **3**) sembra non influire sulla specificità d'azione.



## Capitolo Sesto

### *Amphipterygium adstringens*

*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schelecht è un piccolo albero originario del Messico, appartenente alla famiglia delle Julianaceae, dalla cui corteccia è stato isolato un triterpene ossia l'acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD) (figura 6.1) (Navarrete A. et al, 1998; Oviedo-Chavez I. et al., 2004).



**Figura 6.1:** acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD), isolato da *Amphipterygium adstringens*

Questa pianta, conosciuta in Messico con il nome di “cuachalalate” o “cuachalalà”, viene estensivamente utilizzata nella medicina tradizionale e la sua importanza etnofarmacologica è stata determinata dal fatto che per questa specie sono stati riportati diversi usi tradizionali. In particolare, viene comunemente usata per il trattamento di colelitiasi, ulcera gastrica, cancro gastrointestinale, ipercolesterolemia e varie condizioni infiammatorie ; Oviedo-Chavez I. et al., 2004; (Navarrete A. et al, 1998; Olivera Ortega A.G. et al., 1999; ).

Queste conoscenze hanno stimolato studi riguardanti le proprietà biologiche dell'estratto organico della corteccia e dei suoi principali costituenti (acido masticadienonico e l'acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico). Gli studi sono stati direzionati principalmente alla valutazione delle proprietà antiinfiammatorie e hanno dimostrato, in alcuni casi, l'inibizione di edema nei ratti e la produzione di ossido nitrico nei macrofagi (Oviedo-Chavez I. et al., 2004; Olivera Ortega A.G. et al., 1999; Oviedo-Chavez I. et al., 2005). Inoltre è stata riportata anche la capacità di

questi triterpeni, di esibire attività citotossica su cellule tumorali umane (Oviedo-Chavez I. et al., 2005).

Quindi, sulla base di queste considerazioni è stata valutata l'attività antiproliferativa di AMD su tre linee cellulari tumorali umane, ne è stato determinato inoltre l'effetto sulle funzioni bioenergetiche di mitocondri isolati da fegato di ratto e valutata una sua possibile capacità di indurre il fenomeno della MPT attraverso la stimolazione di uno stress ossidativo. Infine è stato dimostrato il rilascio di fattori pro-apoptotici (cyt c e AIF) dai mitocondri.

## RISULTATI

### Studio dell'attività antiproliferativa dell'acido 3 $\alpha$ -idrossimasticadienonico (AMD)

Per evidenziare la capacità di inibire la proliferazione cellulare, il triterpene AMD è stato studiato mediante saggi *in vitro* su tre linee cellulari tumorali umane:

- **HeLa**
- **A-431**
- **Hep-G2**

Le concentrazioni di composto utilizzate nei test di attività antiproliferativa sono comprese tra 1 e 100  $\mu$ M. I risultati espressi come valore di IC<sub>50</sub>, sono presentati in Tabella 6.1. AMD esibisce un significativo effetto antiproliferativo con valori di IC<sub>50</sub> nel range del micromolare. È interessante notare come il composto sembri essere più attivo nei confronti delle cellule Hep-G2: infatti il valore di IC<sub>50</sub> ottenuto per questo tipo di linea cellulare tumorale è minore rispetto a quelli ottenuti su HeLa e A-431.

	<b>HeLa</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>HepG2</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	<b>A431</b> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>AMD</b>	28,9 $\pm$ 3,5	20,1 $\pm$ 2,6	40 $\pm$ 5,2

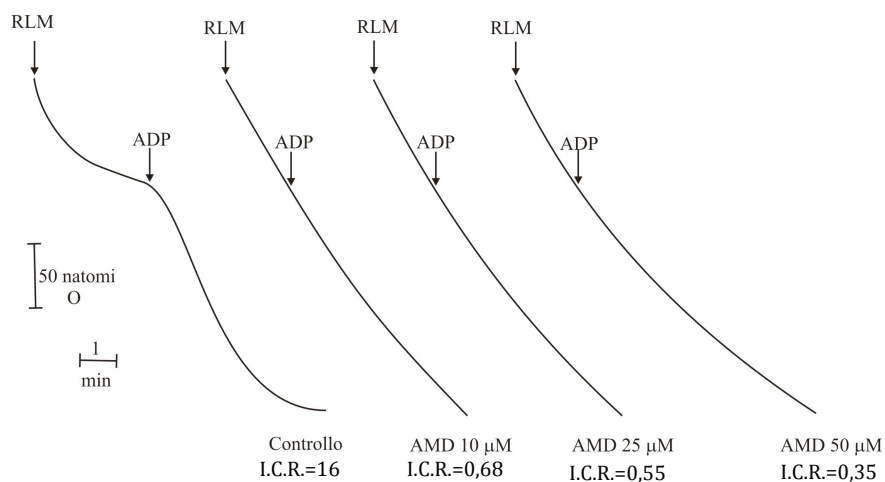
**Tabella 6.2:** Attività antiproliferativa di AMD su cellule HeLa, HepG2 e A-431. I valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

## Effetti di AMD sulle funzioni mitocondriali

Dato il significativo effetto citotossico esibito da AMD sulle tre linee cellulari tumorali prese in considerazione, il passo successivo è stato quello di studiare il meccanismo molecolare responsabile di tale attività. In particolare, vista la capacità dei mitocondri di indurre il processo apoptotico attraverso l'attivazione della via intrinseca correlata nello specifico con l'induzione della MPT, è stata valutata l'azione del composto su RLM, analizzandone così gli effetti sia sulle funzioni bioenergetiche mitocondriali sia sulla possibile induzione del fenomeno della MPT.

### Determinazione dell'indice di controllo respiratorio (I.C.R.)

I risultati riportati in figura 6.2 dimostrano come AMD alle concentrazioni 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  sia in grado di abolire completamente l'I.C.R. della sospensione mitocondriale trattata rispetto al controllo che presenta invece un valore di I.C.R. pari a 16, indice di un'ottima funzionalità bioenergetica mitocondriale. AMD è in grado di inibire il consumo di ossigeno dopo l'aggiunta di ADP con una riduzione del valore di I.C.R. sotto l'unità, suggerendo una compromissione della funzionalità bioenergetica mitocondriale.

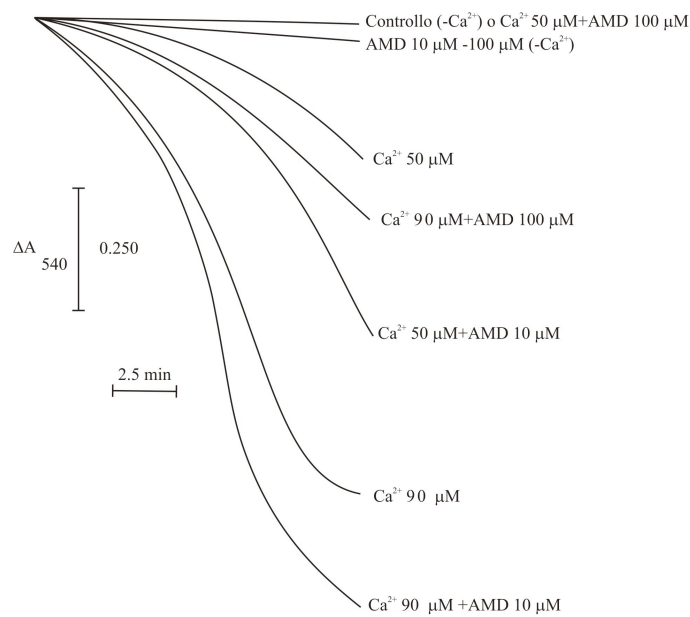


**Figura 6.2: Effetto di AMD sull'indice di controllo respiratorio (I.C.R.) mitocondriale:** RLM sono stati incubati nelle condizioni sperimentali indicate in. AMD è presente alla concentrazione 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ . I valori di ICR sono riportati in figura.

## Induzione dello “swelling” mitocondriale

La successiva valutazione dello “swelling” mitocondriale è stata effettuata con lo scopo di ottenere informazioni riguardanti la possibile capacità del composto di indurre la MPT. In figura 6.3 vengono riportati i risultati riguardanti l’effetto di AMD 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  sul suddetto fenomeno indotto da calcio alle concentrazioni 50  $\mu\text{M}$  e 90  $\mu\text{M}$ , in presenza di fosfato.

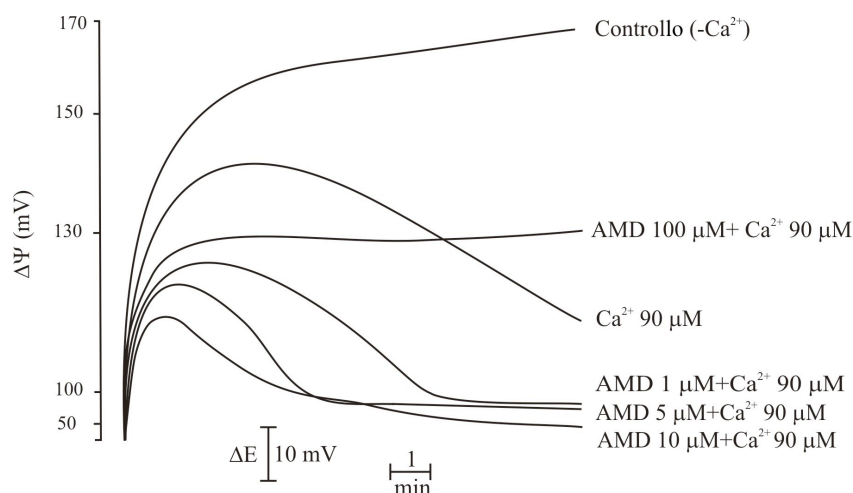
Si può notare come uno swelling di piccola ampiezza indotto da calcio 50  $\mu\text{M}$ , sia significativamente aumentato da AMD 10  $\mu\text{M}$ , mentre viene completamente inibito da AMD 100  $\mu\text{M}$ . Si può osservare inoltre che lo swelling di elevata ampiezza indotto da calcio 90  $\mu\text{M}$ , viene ulteriormente aumentato da AMD 10  $\mu\text{M}$  e fortemente inibito da AMD 100  $\mu\text{M}$ . È da sottolineare il fatto che AMD, in assenza di calcio, alle due concentrazioni 10 e 100  $\mu\text{M}$  sia completamente inefficace nell’instaurare lo swelling mitocondriale.



**Figura 6.3: Effetto di AMD sullo swelling mitocondriale:**RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio a concentrazioni 50  $\mu\text{M}$  o 90  $\mu\text{M}$  eccetto dove indicato (-Ca<sup>2+</sup>); AMD è presente a concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  come indicato.

## Misura del potenziale elettrico ( $\Delta\Psi$ ) della membrana mitocondriale

La valutazione del  $\Delta\Psi$ , saggio che normalmente viene effettuato per ottenere maggiori informazioni sull'eventuale induzione dell'MPT, viene riportato in figura 6.4. Gli RLM di controllo (in assenza di calcio) mostrano un valore  $\Delta\Psi$  di circa 170 mV, mentre la traccia riguardante la sospensione mitocondriale trattata con solo calcio presenta una graduale diminuzione tempo-dipendente del  $\Delta\Psi$ . L'aggiunta di AMD alle concentrazioni 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  causa un rapido collasso del  $\Delta\Psi$ .

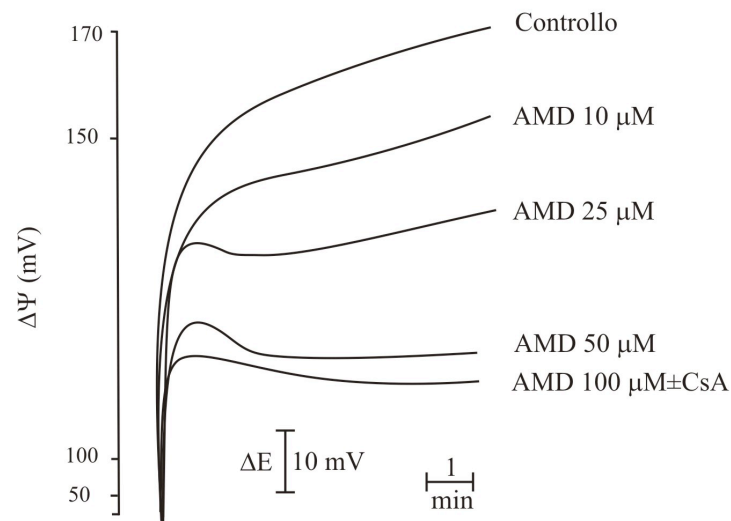


**Figura 6.4: Effetto di AMD sul potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ):** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 90  $\mu\text{M}$  eccetto dove indicato ( $-\text{Ca}^{2+}$ ); AMD è presente alle concentrazioni indicate in figura.

Al contrario, in presenza di AMD alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , si hanno valori di  $\Delta\Psi$  di circa 130 mV, che si mantengono costanti per tutto l'esperimento. Quindi, in presenza di calcio AMD esibisce una particolare azione con effetto dose-dipendente opposto rispetto a quello osservato in figura 6.2, dove l'incremento della concentrazione di AMD causa un aumento del danno mitocondriale. Infatti i risultati riportati nelle figura 6.3 e 6.4 mostrano che il composto a basse concentrazioni (10  $\mu\text{M}$ ) amplifica lo swelling e aumenta il collasso del  $\Delta\Psi$  indotto dal calcio, mentre ad alte concentrazioni (100  $\mu\text{M}$ ) protegge entrambi gli effetti.

In assenza di calcio (figura 6.5), AMD (10-100  $\mu\text{M}$ ) provoca una diminuzione del  $\Delta\Psi$  concentrazione-dipendente. Si sottolinea il fatto che in queste condizioni il composto non provoca un totale collasso del  $\Delta\Psi$ , cosa che invece avviene in

presenza di calcio (figura 6.4). In particolare, si deve sottolineare che l'effetto provocato da AMD 100  $\mu\text{M}$  non viene protetto dal tipico inibitore dell'MPT, CsA.

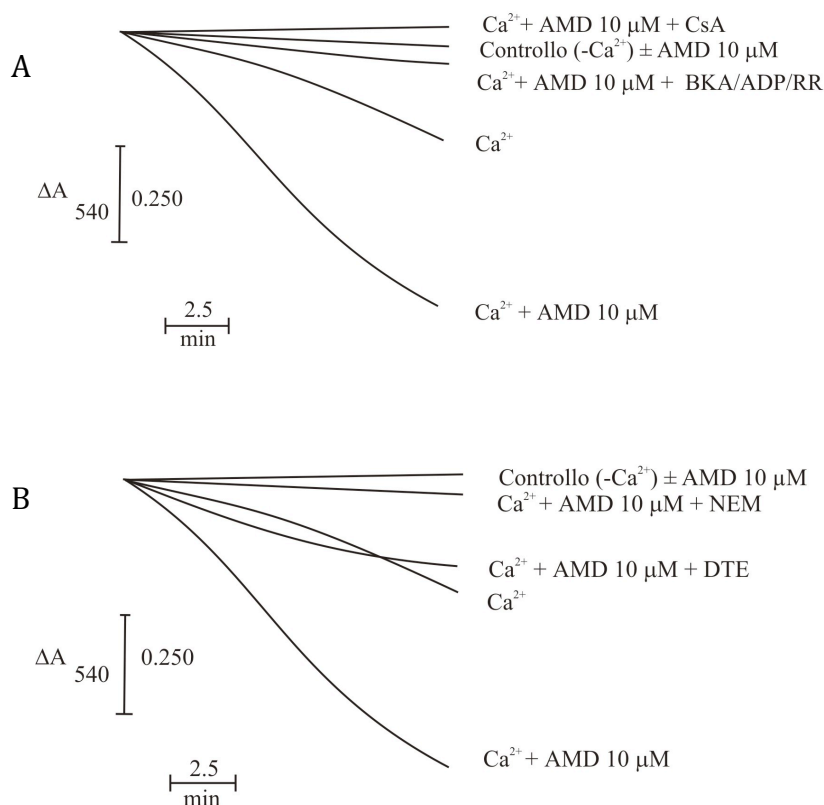


**Figura 6.5: Effetto di AMD sul potenziale elettrico di membrana ( $\Delta\Psi$ ):** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. AMD è presente alle concentrazioni indicate in figura; CsA è presente ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ .

Questi risultati, insieme a quelli riportati in figura 6.2 nei quali il composto si comporta come un agente disaccoppiante, dimostrano come AMD esibisca un effetto simile a quello di un tipico protonoforo con apertura di leak protonici. È da sottolineare che le alterazioni a carico della membrana mitocondriale interna causate da AMD non possono essere attribuite all'induzione della MPT, in quanto il composto, da solo, non è in grado di causare swelling (figura 6.3) e anche perché la CsA non esibisce alcuna protezione sulla caduta del  $\Delta\Psi$  indotta da AMD 100  $\mu\text{M}$  (figura 6.5).

In figura 6.6 A, vengono mostrati gli effetti di tipici inibitori del poro sullo swelling indotto dal calcio 50  $\mu\text{M}$  ed amplificato da AMD 10  $\mu\text{M}$ . CsA, BKA, ADP e RR, inibitore del trasporto del calcio, sono in grado di prevenire completamente il suddetto swelling (Zoratti M. e Szabò I., 1995).

In figura 6.6 B vengono riportati invece gli effetti di DTE e NEM, i quali proteggono in modo parziale e completo, rispettivamente lo swelling indotto da calcio 50  $\mu\text{M}$  e AMD 10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 6.6: Effetto dei differenti inibitori della transizione di permeabilità e di antiossidanti sullo swelling mitocondriale:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio ad una concentrazione 50  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato ( $-\text{Ca}^{2+}$ ); AMD è presente ad una concentrazione 10  $\mu\text{M}$ . in A sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$  e RR 2  $\mu\text{M}$ ; in B sono presenti DTE 5 mM, NEM 10  $\mu\text{M}$ .

Questi risultati suggeriscono che l'amplificazione dello swelling indotto da AMD a basse concentrazioni, in presenza di calcio, sia dovuto all'apertura del poro di transizione e come questo processo sia probabilmente correlato con lo stato ossidato dei mitocondri.

### Determinazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) mitocondriali

Per poter confermare l'ultima ipotesi formulata, ossia che l'apertura del poro indotta da AMD in presenza di calcio sia correlata allo stato ossidato dei mitocondri, è stato valutato lo stato redox dei gruppi tiolici mitocondriali.

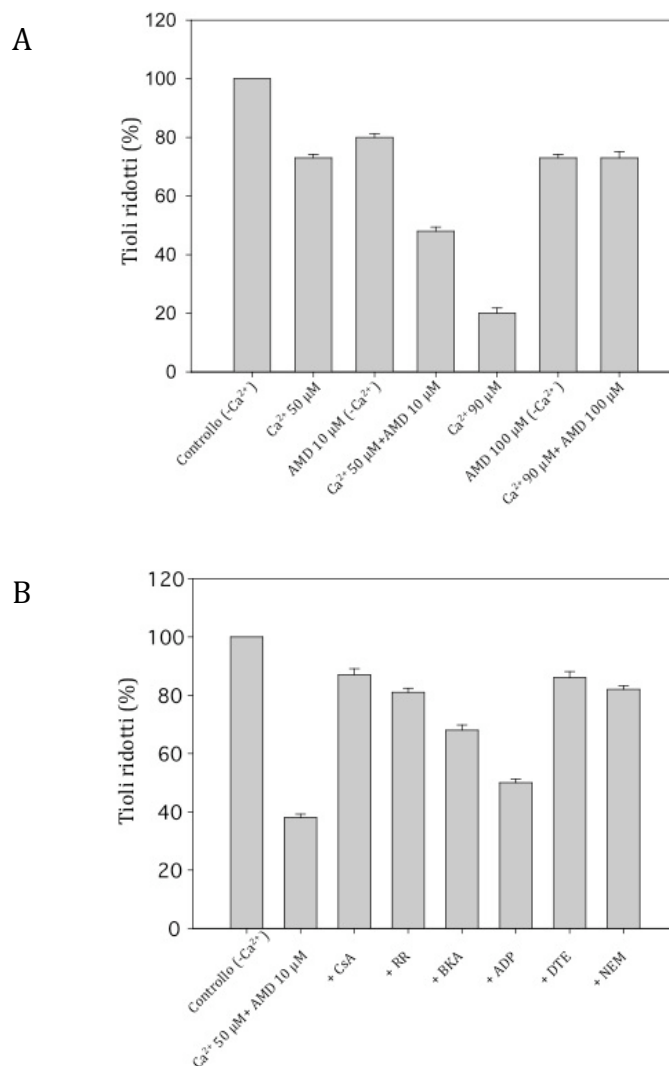
In figura 6.7A viene riportato l'istogramma relativo allo stato redox dei gruppi sulfidrilici che mostra come il calcio, alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ , induca una diminuzione dei tioli ridotti di circa 25% mentre AMD 10  $\mu\text{M}$  (in assenza di calcio)



provochi una riduzione dei tioli ridotti di circa 20%. La contemporanea presenza di AMD 10  $\mu\text{M}$  e calcio 50  $\mu\text{M}$  provoca un abbassamento fino al 50%. Da notare che la diminuzione dei gruppi tiolici corrisponde ad una loro parallela ossidazione con formazione di ponti disolfuro.

Calcio 90  $\mu\text{M}$  e AMD 100  $\mu\text{M}$  causano rispettivamente una diminuzione dei gruppi tiolici di circa 80% e 25% e la loro contemporanea presenza nella sospensione mitocondriale mantiene la diminuzione all'incirca al 25%.

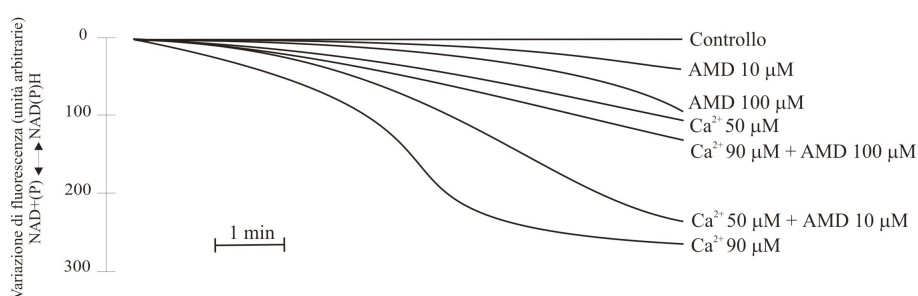
L'ossidazione provocata da calcio 50  $\mu\text{M}$  e AMD 10  $\mu\text{M}$  contemporaneamente presenti nel medium di incubazione, è completamente inibita da RR, CsA, DTE e NEM, mentre BKA e ADP esibiscono solo una lieve protezione (figura 6.7B).



**Figura 6.7: Effetto di AMD e  $\text{Ca}^{2+}$  sullo stato redox dei gruppi sulfidrilici:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio, tranne dove indicato ( $-\text{Ca}^{2+}$ ) alle concentrazioni indicate; AMD è presente alle concentrazioni indicate. In B sono presenti CsA ad una concentrazione 1  $\mu\text{M}$ , ADP 0,5 mM, BKA 6  $\mu\text{M}$ , RR 2  $\mu\text{M}$ , DTE 5 mM, NEM 10  $\mu\text{M}$ . I valori sono stati calcolati come media di cinque esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

## Determinazione dell'ossidazione dei nucleotidi piridinici

In figura 6.8 viene riportato l'esperimento relativo all'analisi dello stato redox dei nucleotidi piridinici. Il calcio, da solo, alle concentrazioni 50  $\mu\text{M}$  e 90  $\mu\text{M}$  provoca un'ossidazione dei piridin nucleotidi con andamento dose-dipendente. AMD alla concentrazione 10  $\mu\text{M}$  è in grado di incrementare significativamente l'ossidazione indotta dal calcio alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ , mentre AMD alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  inibisce l'ossidazione indotta dal calcio 90  $\mu\text{M}$ . AMD 10 e 100  $\mu\text{M}$ , da solo, induce un'ossidazione di bassa entità.



**Figura 6.8: Effetto di AMD e  $\text{Ca}^{2+}$  sullo stato redox dei nucleotidi piridinici:** RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, in presenza di calcio a una concentrazioni 50  $\mu\text{M}$  e 90  $\mu\text{M}$ , tranne dove indicato ( $-\text{Ca}^{2+}$ ); AMD è presente alle concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ .

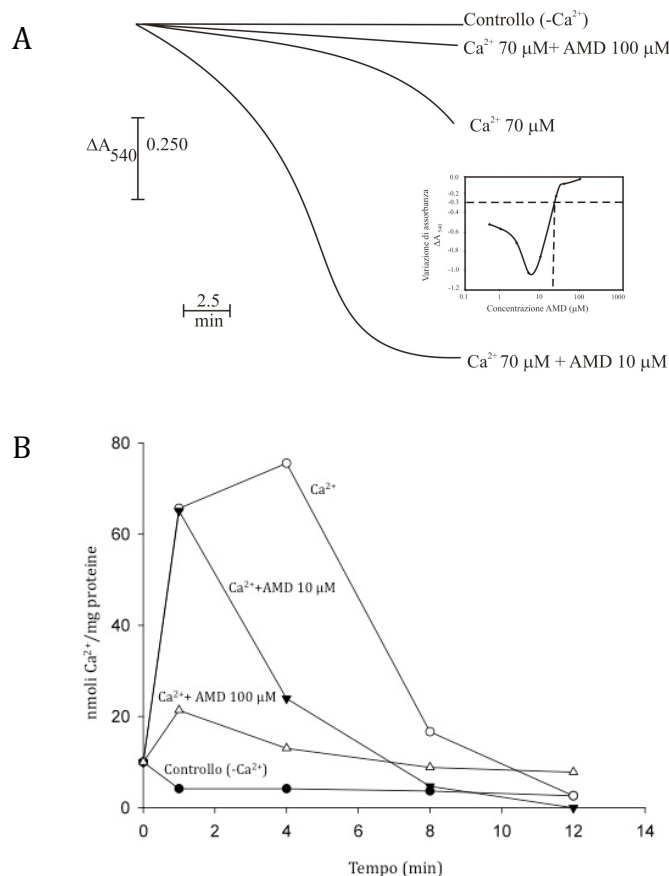
L'ossidazione dei gruppi tiolici (figura 6.7) e dei piridin nucleotidi (figura 6.8) indotta da AMD da solo dimostra che il composto è in grado di indurre stress ossidativo. L'ossidazione dei gruppi tiolici di circa il 50% osservata in presenza di calcio e AMD 10  $\mu\text{M}$  può essere considerato il risultato dell'apertura del poro della transizione, che ulteriormente aumenta lo stress ossidativo. Si specifica che l'ossidazione dei gruppi tiolici appartenenti a due cisteine localizzate sulla ANT, insieme all'interazione del calcio con specifici siti dell'ANT, è un requisito fondamentale per l'induzione della MPT (McStay G.P. et al., 2002).

## Determinazione dell'accumulo di calcio nei mitocondri

Per poter spiegare perchè AMD alle basse concentrazioni amplifichi fortemente lo swelling mitocondriale, mentre alle alte concentrazioni lo inibisca, è stata effettuata una valutazione dello swelling, utilizzando una concentrazione di calcio 70  $\mu\text{M}$ , intermedia tra le due precedentemente usate. Parallelamente è stata anche effettuata la misura della quantità di calcio presente nei mitocondri nelle stesse condizioni del suddetto esperimento.

In figura 6.9A viene confermato che AMD 10  $\mu\text{M}$  è in grado di amplificare lo swelling indotto dal calcio alla concentrazione 70  $\mu\text{M}$ , mentre AMD 100  $\mu\text{M}$  lo inibisce completamente.

È stata inoltre determinata, come osservabile nel riquadro riportato in figura 6.9, la concentrazione soglia di AMD (circa 20  $\mu\text{M}$ ), al di sotto della quale si ha amplificazione dello swelling e al di sopra inibizione.



**Figura 6.9: Effetto di AMD sull'accumulo di calcio:** In A: effetto di AMD alle concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  sullo swelling indotto dal Ca<sup>2+</sup> 70  $\mu\text{M}$ . In B effetti di AMD alle concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  sull'accumulo di calcio 70  $\mu\text{M}$ . RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*, L'insero in A mostra i cambiamenti di assorbanza dose-dipendenti indotti da AMD sulla diminuzione di assorbanza causata da AMD e calcio. La linea orizzontale indica la diminuzione di assorbanza di circa 0,300 unità indotta dal solo calcio. La curva individua la concentrazione soglia ( $\approx 20 \mu\text{M}$ ) (linea tratteggiata) tra l'amplificazione o l'inibizione della MPT. L'ascissa viene riportata in scala logaritmica.

In figura 6.9 B viene mostrato il movimento del calcio attraverso la membrana mitocondriale. Come si può notare il calcio esterno viene rapidamente accumulato all'interno dei mitocondri per poi essere rilasciato nel mezzo di incubazione dopo 5 minuti in conseguenza all'apertura del poro. Se nella sospensione mitocondriale sono contemporaneamente presenti calcio e AMD 10  $\mu\text{M}$ , si ha ugualmente un rapido accumulo di calcio ma, data l'amplificazione dello swelling indotta da AMD 10  $\mu\text{M}$  in conseguenza ad una più rapida apertura del poro, il calcio viene rilasciato più velocemente nel mezzo di incubazione (dopo circa 1-2 minuti).

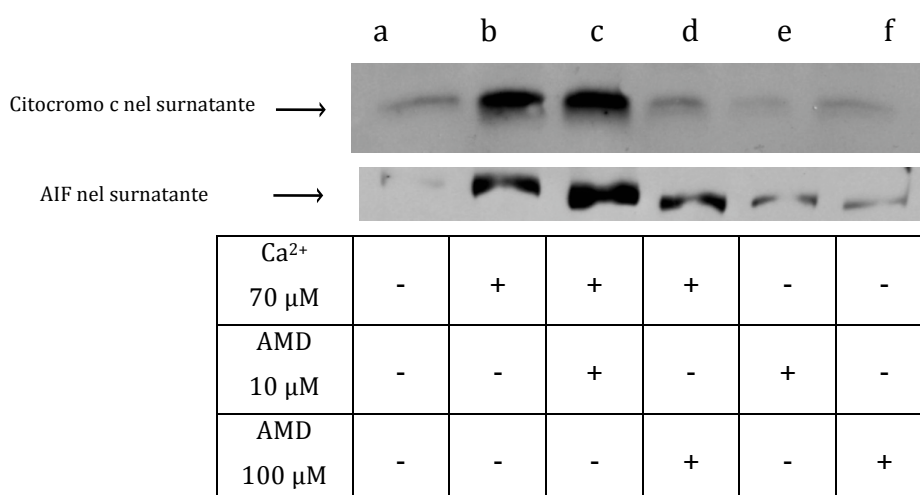
Al contrario, in presenza di AMD 100  $\mu\text{M}$ , si ha un blocco completo dell'accumulo di calcio (ad eccezione di un ridotto uptake iniziale di circa 20 nmol/mg proteine) non essendo in grado di provocare l'apertura del poro, come osservabile anche dalla completa assenza di swelling nelle medesime condizioni riportate in figura 6.9A.

### Rilascio dei fattori pro-apoptotici

In figura 6.10 viene riportato il risultato del Western blot relativo agli effetti di AMD alle concentrazioni 10 e 100  $\mu\text{M}$  sul rilascio del citocromo c e AIF indotto dal calcio.

Come dimostrato dalla maggiore intensità delle bande c, AMD 10  $\mu\text{M}$ , in presenza di calcio, è in grado di provocare un forte rilascio di citocromo c e di AIF dai mitocondri, mentre alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$  AMD è inefficace nell'indurre tale fenomeno (bande d). Da notare che comunque anche il calcio è in grado di stimolare un certo rilascio dei due fattori (bande b).

È da notare che AMD alle due diverse concentrazioni (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) e in assenza di calcio, non esibisce alcun effetto (bande e ed f).



**Figura 6.10: Rilascio del citocromo c e dell'AIF indotto da AMD:** in figura il risultato del Western blotting sulle frazioni del soprannatante. RLM sono stati incubati nel medium standard, nelle condizioni indicate in *Materiali e metodi*. Il composto AMD è presente alle concentrazioni 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , il calcio ad una concentrazione 70  $\mu\text{M}$ .

## Discussione

Dai risultati presentati risulta che il composto AMD è in grado di esercitare una significativa attività antiproliferativa su tre linee cellulari tumorali umane, mostrando un maggiore effetto sulle cellule HepG2 (carcinoma epatocellulare).

Sulla base dei risultati ottenuti, si può chiaramente affermare che AMD è in grado di provocare una compromissione dell'attività mitocondriale, in particolare del processo di fosforilazione ossidativa, diminuendo il valore dell'I.C.R. al di sotto dell'unità (figura 6.2). Inoltre, sempre dai risultati riportati nello stesso esperimento, si ha stimolazione della respirazione nello stato 4 ed inibizione nello stato 3 e questi dati suggeriscono che AMD si comporti come un tipico disaccoppiante.

Questi risultati sono ulteriormente confermati dall'effetto dose-dipendente esibito da AMD sulla caduta del  $\Delta\Psi$  (figura 6.5), evidenziando un effetto del composto simile a quello dei protonofori. Tuttavia, l'azione di AMD non è ascrivibile all'apertura del poro della transizione in quanto il composto alla concentrazione 10  $\mu\text{M}$ , in assenza di calcio, non è in grado di provocare swelling mitocondriale (figura 6.6). Inoltre, un tipico inibitore dell'MPT, la CsA, non esibisce alcuna protezione sulla caduta di potenziale provocata da AMD 100  $\mu\text{M}$  (figura 6.5).

Tuttavia un particolare effetto di AMD viene messo in evidenza, se nella sospensione mitocondriale è presente anche il calcio. Infatti, AMD 10  $\mu\text{M}$  in presenza di calcio 50  $\mu\text{M}$  è in grado di provocare un marcato aumento dello swelling mitocondriale indice dell'instaurarsi del fenomeno della transizione di permeabilità (figura 6.3) Dato ulteriormente confermato dalla completa protezione esibita dagli inibitori dell'MPT CsA, BKA e ADP. Inoltre la protezione esercitata dagli agenti riducente DTE e alchilante NEM (figura 6.6), sebbene con diversa efficacia, dimostra che il fenomeno è correlato con uno stress ossidativo. Un ulteriore dato che supporta quest'ultima ipotesi, è la dimostrazione che AMD, da solo, provoca stress ossidativo attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici mitocondriali (figura 6.7) e dei piridin nucleotidi (figura 6.8). Inoltre, l'ossidazione di circa il 50% osservata in presenza di calcio e AMD 10  $\mu\text{M}$ , è il risultato dell'apertura del poro di transizione che ulteriormente aumenta lo stress ossidativo. È ormai ben noto che i requisiti fondamentali per l'apertura del poro sono l'ossidazione di gruppi tiolici critici appartenenti a cisteine localizzate sulla ANT e l'interazione del calcio con siti specifici situati sempre a livello dell'ANT (McStay G.P. et al., 2002)..

Per quanto riguarda il meccanismo con cui AMD a basse concentrazioni induce stress ossidativo, una possibile spiegazione potrebbe essere che AMD 10  $\mu\text{M}$  possa esibire un effetto sinergico con il calcio alterando il flusso degli elettroni lungo la

catena respiratoria tra il II complesso e l'ubichinone favorendo un aumento della concentrazione di semichinone radicalico. Quest'ultimo interagendo con l'ossigeno molecolare può dar luogo alla generazione di anione superossido ( $O_2^{\bullet -}$ ), il quale può essere trasformato dalla superossido dismutasi in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) che a sua volta, attraverso la reazione di Fenton con gruppi FeS della catena respiratoria, può generare il radicale idrossilico ( $\cdot OH$ ), probabilmente responsabile dello stress ossidativo (Kowaltowski A.J. et al., 2009; Moldovan L e Moldovan N.I., 2004).

Ad alte concentrazioni (100  $\mu M$ ), AMD esibisce invece un effetto protettivo sullo swelling indotto da alte concentrazioni di calcio (figure 6.3 e 6.9) e protegge lo stress ossidativo promosso dal calcio sui gruppi sulfidrilici (figura 6.7) e piridin nucleotidi (figura 6.8). Il meccanismo con cui AMD ad elevate concentrazioni mostra un effetto protettivo, può essere attribuito ad una azione inibitoria esercitata sull'uniporto del calcio (figura 6.9). In questo modo infatti non si ha accumulo di calcio all'interno dei mitocondri, il quale non può interagire con i suoi siti specifici sull'ANT, impedendo così l'apertura del poro.

## **Conclusioni**

In conclusione dai dati ottenuti è possibile affermare che AMD esplica la sua attività antiproliferativa agendo a livello mitocondriale con effetto regolatore sulla produzione di energia, sull'omeostasi del calcio e sull'induzione dell'MPT.

È possibile ipotizzare che AMD agisca attraverso due diversi meccanismi. A basse concentrazioni il composto si comporta come un agente pro-apoptotico promuovendo l'induzione del processo di MPT e il conseguente rilascio di fattori pro-apoptotici. Ad elevate concentrazioni, AMD blocca l'entrata del calcio nei mitocondri impedendo l'instaurarsi del fenomeno di MPT. In quest'ultimo caso, il processo di morte cellulare potrebbe essere mediato dall'effetto protonoforico (concentrazione-dipendente) indotto da ADM, con compromissione della sintesi di ATP e del  $\Delta\Psi$ , funzioni mitocondriali essenziali per la cellula.





## BIBLIOGRAFIA

- Affolter H., Sigel E. (1979): *A simple system for the measurement of ion activities with solvent polymeric membrane electrodes*. Anal. Biochem. 97, 315-319.
- Andrade-Cetto A. e Heinrich M. (2005): *Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes*. J Ethnopharmacol 99, 325-348.
- Armstrong J.S. (2006): *Mitochondria: a target for cancer therapy*. Br J Phamacol 147, 239-248.
- Baker D.D., Chu M, Oza U., Rajgarhia V. (2007): *The value of natural products to future pharmaceutical discovery* Nat Prod. Rep. 24, 1225-1244.
- Balunas M.J. e Kinghorn A.D., (2005): *Drug discovery from medicinal plants*. Life Science 78, 431-441.
- Battaglia V., Brunati A.M., Fiore C., Rossi C.A., Salvi M., Tibaldi E., Palermo M., Armanini D., Toninello A. (2008): *Glycyrrhetic acid as inhibitor of amplifier of permeability transition in rat heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta 1778, 313-323.
- Bindoli A., Rigobello M.P. (2002): *Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status*. Meth Enzymol 347, 307-316.
- Boulares A.H., Zoltoski A.J., Contreras F.J., Yakovlev A.G., Yoshihara K., Smulson M.E. (2002): *Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by Poly(ADP-ribosyl)ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage in endonuclease activation*. JBC 277(1), 372-378.
- Carlson E.E. (2010): *Natural products as chemical probes*. ACS Chem Biol. 5(7), 639-653.
- Chiara F., Castellaro D., Marin O., Petronilli V., Brusilow S.W., Juhaszova M., Sollott S.J., Forte M., Bernerdi P., Rasola A. (2008): *Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels*. PLoS One 3(3), e1852
- Cohen G.M. (1997): *Caspases: the executioners of apoptotsis*. Biochem J. 326, 1-16.
- Cragg G.M. e Newman D.J., (2005): *Plants as source of anti-cancer agents*. J Ethnopharmacology 100, 72-79.

Crompton M., Costi A., Hayat L. (1987): *Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria* Biochem. J. 245, 915-918.

Debatin K.M. and Krammer P., (2004): *Death receptors in chemotherapy and cancer*. Oncogene 23, 2950-2966.

Debnath J., Baehrecke R.H., Kroemer G. (2005): *Does autophagy contribute to cell death?* Autophagy 1(2), 66-74.

Di Lisa F., Carpi A., Giorgio V., Bernardi P., (2011): *The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection*. Biochim Biophys Acta 1813, 1316-1322.

Echtay K.S., Pakay J.L., Esteves T.C., Brand M.D. (2005): *Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage*. Biofactors 24, 119-130.

Elmann G.E. (1959): *Tissue sulphydryl groups*. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.

Elmore S. (2007): *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol. 35, 495-516.

Fiore C., Salvi M., Palermo M., Sinigaglia G., Armanini D., Toninello A. (2004): *On the mechanism of mitochondrial permeability transition induction by glycyrrhetic acid*. Biochim Biophys Acta 1658, 195-201.

Fulda S. (2010): *Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy*. Planta Med 76, 1075-1079.

Fulda S., Galluzzi L., Kroemer G. (2010): *Targeting mitochondria for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov 9, 447-464.

Fruehauf J.P. e Meyskens L.F. Jr. (2007): *Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death?*. Clin Cancer Res 13, 789-794.

Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. (1949): *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. J. Biol. Chem. 177, 751-766.

Gottlieb R.A. (2001): *Mitochondria and apoptosis*. Biol Signals Recept. 10, 147-161.

Grimm S. e Brdiczka D. (2007): *The permeability transition pore in cell death*. Apoptosis 12, 841-855.

- Gulbins E., Dreschers S., Bock J. (2003): *Role of mitochondria in apoptosis*. Exp Physiol 88, 85-90.
- Gurib-Fakim A. (2006): *Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Mol Aspects Med 27, 1-93.
- Halestrap A.P. (2009): *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol 46, 821-831
- Halestrap A.P. e Brenner C. (2003): *The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death*. Curr Med Chem 10, 1507-1525
- Halestrap A.P. e Davidson A.M. (1990): *Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochem J 268, 153-160.
- Halliwell B. e Chirico S. (1993): *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr 57(5 Suppl), 715S-724S
- Hong S. e Pedersen P.L. (2008): *ATP Synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas*. Microbiol Mol Biol Rev 72, 590-641.
- Jakupovic J., Ellmauerer E., Jia Y., Bohlmann F., Dominguez X.A., Schmeda-Hirschmann G. (1987): *Further eudesmane derivatives from Verbesina species*. Planta Med 53, 39-42.
- Javadov S., Karmazyn M., Escobales N. (2009): *Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases*. J Pharmacol Exp Ther 330(3), 670-678.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011): *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin 61, 69-90.
- Jensen B.D., Gunter K.K. e Gunter T.E. (1986): *The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II: Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation*. Arch. Biochem. Biophys. 248, 305-323

Kamo N., Muratsuu M., Hongoh R., Kobatake Y. (1979): *Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state.* J. Membr. Biol. 49, 105-121.

Kohen F.E. e Carter G.T., (2005): *The evolving role of natural products in drug discovery.* Nat Rev Drug Discov. 4(3), 206-220.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2001): *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress.* FEBS Lett, 495, 12-15

Kowaltowski A.J., de Souza-Pinton N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2009): *Mitochondria and reactive oxygen species.* Free Radic Biol Med 47, 333-343

Krishnakumar R., Kraus W.L. (2010): *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets.* Molecular Cell 39, 8-23.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nunez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. (2009): *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.* Cell Death Differ 16, 3-11

Laemmli UK (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227, 680-685.

Leung A.W.C., Halestrap A.P. (2008): *Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore.* Biochim Biophys Acta 1777, 946-952.

Leung A.W.C., Varanyuwatana P., Halestrap A.P. (2008): *The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition* J Biol Chem 283, 26312-26323.

Li J.W.H., Vederas J.C. (2009): *Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?* Science 325, 161-165.

Loschen G., Flohè L., Chance B. (1971): *Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria.* FEBS Lett. 18, 261-264.

- Martínez A.M., Evangelista O.V., Mendoza C.M., Morales G.G., Toledo O.G., Wong L.A. (2001): *Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla*. Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM. México.
- Martínez-Vázquez M., Romo de Vivar A., Ortega A., Quintero M.L., García C., Fronczek F.R. (1983): *Eudesmane triols from *Verbesina virgata**. *Phytochemistry* 22 (4), 979-982.
- McChesney J.D., Venkataraman S.K., Henri J.T. (2007): *Plant natural products: back to the future or into extinction?*. *Phytochemistry* 68, 2015-2022.
- McStay G.P., Clarke S.J., Halestrap A.P. (2002): *Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore*. *Biochem J* 367, 541-548
- Mitchell P. (1961): *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. *Nature* 191, 144-148
- Moldovan L. e Moldovan N.I. (2004): *Oxygen free radicals and redox biology of organelles*. *Histochem Cell Biol* 122, 395-412
- Navarrete A., Martínez-Uribe L.S., Reyes B. (1998): *Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats*. *Phytother Res* 12, 1-4
- Ott M. Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2007): *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. *Apoptosis* 12, 913-922.
- Olivera Ortega A.G., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M., Terrazas Salgado T., Solares Arenas F. (1999): *Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, *Schiede ex Schlecht*)*. *J Ethnopharmacol* 68, 109-113
- Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Martínez-Vázquez M. (2005): *Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes*. *J Pharm Pharmacol* 57, 1087-1091
- Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M. (2004): *Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (*Julianaceae*) with anti-inflammatory activity*. *Phytomedicine* 11, 436-445.
- Palmieri F., Klingenberg M (1979): *Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria*. *Meth. Enzymol.* 56, 279-301.

- Rasola A., Bernardi P. (2007): *The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis*. Apoptosis 12, 815-833
- Rasola A., Sciacovelli M., Pantic B., Bernardi P. (2010): *Signal transduction to the permeability transition pore*. FEBS Lett. 584, 1989-1996
- Ravagnan L., Roumier T., Kroemer G. (2002): *Mitochondria, the killer organelles and their weapons*. J Cell Physiol. 192, 131-137.
- Salvi M., Battaglia V., Brunati A.M., La Rocca N., Tibaldi E., Pietrangeli P., Marcocci L., Mondovì B, Rossi C.A., Toninello A. (2007): *Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense*. J Biol Chem 282, 24407-24415.
- Salvi M., Fiore C., Armanini D., Toninello A. (2003): *Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria*, Biochem. Pharmacol. 66, 2375-2379.
- Salvi M., Fiore C., Battaglia V., Palermo M., Armanini D., Toninello A. (2005): *Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening*. Endocrinology 146, 2306-2312.
- Salvi M., Brunati A.M., Clari G., Toninello A.: (2002): *Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore*. Biochim Biophys Acta 1556, 187-196.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratori Press 1989; 9.14-9.16.
- Sava I.G., Battaglia V., Rossi C.A., Salvi M., Toninello A. (2006): *Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria*. Free Radic Biol Med 41, 1272-1281.
- Schneider W.C., Hogeboom H.G. (1950): *Intracellular distribution of enzymes:V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenate*. J. Biol. Chem. 183, 123-128.
- Soldani C., Scovassi A.I. (2002): *Poly(ADP-ribose)polimerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. Apoptosis 7, 321-328.
- Starkov A.A. (1997): *"Mild" uncoupling of mitochondria*. Biosci Rep 17, 273-279

Starkov A.A., Bloch D.A., Chernyak B.V., Dedukhova V.I., Mansurova S.E., Severina I.I., Simonyan R.A., Vygodina T.V., Skulachev V.P. (1997): *6-ketocholestanol is a recoupler for mitochondria, chromatophores and cytochrome oxidase proteoliposomes*. Biochim Biophys Acta 1318, 159-172.

Sun S.Y., Hail N. Jr, Lotan R. (2004): Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. J Natl Cancer Inst 96, 662-672.

Thannickal V.J. e Fanburg B.L. (2000): *Reactive oxygen species in cell signaling* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279, L1005-L1028.

Tsujimoto Y., Nakagawa T., Shimizu S. (2006): *Mitochondrial membrane permeability transition and cell death*. Biochim Biophys Acta 1757, 1297-1300

Toninello A., Di Lisa F., Siliprandi D., Siliprandi N. (1985): *Uptake of spermine by rat liver mitochondria and its influence on the transport of phosphate*. Biochim Biophys Acta 815, 399-404

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J, Izakovic M., Mazur M. (2006): *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact 160, 1-40.

Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B.A., Boulares A.H., Spoonde A.Y., Yoshihara K., Smulson M.E. (2000): *A role of the Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by Poly(ADP-ribose)polymerase*. JBC 275(28), 21302-21308.

Zoratti M. e Szabò I. (1995): *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta 1241, 139-176.





Si ringrazia il Prof. Toninello Antonio, del Dipartimento di Chimica Biologica dell'Università degli Studi di Padova, per aver permesso lo svolgimento di parte degli esperimenti presentati in questa tesi.