



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XXI

AMMINO OSSIDASI UMANA SENSIBILE ALLA SEMICARBAZIDE: DALLA CARATTERIZZAZIONE CINETICA AGLI STUDI CELLULARI IN ADIPOCITI

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Supervisore: Ch.mo Prof. Adelio Rigo

Correlatrice: Ch.ma Dott.ssa Maria Luisa Di Paolo

Dottoranda: Emanuela Bonaiuto

31 gennaio 2009

*Al mio piccolo Lorenzo, ad Andrea
ed a mia nonna Maria scomparsa da poco.*

INDICE

RIASSUNTO / ABSTRACT	PAG.	1
INTRODUZIONE	PAG.	5
1.1. STRUTTURA DELL'AMMINO OSSIDASI UMANA VAP-1	PAG.	8
1.2. FUNZIONI DI SSAO/VAP-1	PAG.	11
1.3. SSAO/VAP-1 PLASMATICA E CONDIZIONI PATOLOGICHE.....	PAG.	14
1.4. INIBITORI DI SSAO/VAP-1	PAG.	15
1.5. SUBSTRATI DI SSAO/VAP-1	PAG.	16
MATERIALI E METODI	PAG.	18
2.1. MATERIALI	PAG.	18
2.1.1. REAGENTI.....	PAG.	18
2.1.2. STRUMENTAZIONE	PAG.	19
2.2. METODI	PAG.	20
2.2.1. ISOLAMENTO DI ADIPOCITI DA TESSUTO ADIPOSO ED INCUBAZIONE CON VARI FATTORI	PAG.	20
2.2.2. PREPARAZIONE DI MEMBRANE DA ADIPOCITI.....	PAG.	21
2.2.3. MISURE DI ATTIVITA' AMMINO OSSIDASICA CON IL METODO DELL'AMPLEX RED ACCOPPIATO ALLA PEROSSIDASI	PAG.	21
2.2.4. MISURE DI ATTIVITA' IN FUNZIONE DEL PH	PAG.	22
2.2.5. MISURE DI ATTIVITA' IN FUNZIONE DELLA FORZA IONICA	PAG.	23
2.2.6. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' SUPEROSSIDO DISMUTASI.....	PAG.	23
2.2.7. ELETTROFORESI DI PROTEINE (SDS-PAGE).....	PAG.	24
2.2.8. PROCEDURA DI WESTERN BLOT E IMMUNORIVELAZIONE.....	PAG.	24
2.2.9. PREPARAZIONE DELL'ANTICORPO PER L'AMMINO OSSIDASI UMANA VAP-1	PAG.	25
2.2.10. DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINA SSAO/VAP-1 NEL PLASMA UMANO	PAG.	26
2.2.11. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA.....	PAG.	26
2.2.12. ANALISI DEI DATI.....	PAG.	27

RISULTATI E DISCUSSIONE.....	PAG.	28
3.1. AMMINO OSSIDASI UMANA SENSIBILE ALLA SEMICARBAZIDE		
(SSAO/VAP-1): CARATTERIZZAZIONE CINETICA.....	PAG.	28
3.1.1. <i>POTENZIALI SUBSTRATI UTILIZZATI COME “SONDE” PER</i>		
<i>LO STUDIO DEL SITO ATTIVO DI SSAO/VAP-1</i>	PAG.	28
3.1.1.A. <i>DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI CINETICI DELLA</i>		
<i>SSAO/VAP-1 IN CONDIZIONI DI STATO STAZIONARIO.</i>		
<i>EFFETTO DI INIBIZIONE DA SUBSTRATO.....</i>	PAG.	29
3.1.1.B. <i>N-ALCHILAMMINE COME SUBSTRATI PER SSAO/VAP-1:</i>		
<i>DIPENDENZA DI PARAMETRI CINETICI DALLA LUNGHEZZA</i>		
<i>DELLA CATENA (MONOAMMINE E DIAMMINE ALIFATICHE)</i>	PAG.	31
3.1.1.C. <i>EFFETTO DEI SOSTITUENTI SULL’ATTIVITÀ DELLA</i>		
<i>SSAO/VAP-1 NEL CASO DI SUBSTRATI</i>		
<i>CON UNA CATENA ALIFATICA “CORTA”</i>	PAG.	33
3.1.1.D. <i>EFFETTO DEI SOSTITUENTI SULL’ATTIVITÀ DELLA</i>		
<i>SSAO/VAP-1 NEL CASO DI SUBSTRATI CON CATENA</i>		
<i>ALIFATICA “LUNGA”</i>	PAG.	35
3.1.1.E. <i>POTENZIALI SUBSTRATI FISIOLGICI PER SSAO/VAP-1</i>	PAG.	36
3.1.2. <i>POTENZIALI INIBITORI PER SSAO/VAP-1</i>	PAG.	37
3.1.3. <i>DIPENDENZA DAL PH DEI PARAMETRI CINETICI DI</i>		
<i>SSAO/VAP-1 PER LA METILAMMINA</i>	PAG.	40
3.1.4. <i>EFFETTO DEL PH SULL’AFFINITÀ DI SSAO/VAP-1</i>		
<i>PER ALCUNI SUBSTRATI E CONFRONTO CON</i>		
<i>L’ENZIMA BOVINO (BSAO)</i>	PAG.	42
3.1.5. <i>DIPENDENZA DELL’EFFICIENZA</i>		
<i>CATALITICA DALLA FORZA IONICA</i>	PAG.	43
3.1.6. <i>EFFETTO DELLA VARIAZIONE DELLA</i>		
<i>TEMPERATURA SULL’AFFINITÀ DI ALCUNI SUBSTRATI.....</i>	PAG.	44
3.1.7. <i>DIFFERENZE NEL SITO ATTIVO DI</i>		
<i>BSAO RISPETTO A SSAO/VAP-1</i>	PAG.	44
3.2. DETERMINAZIONE FLUORIMETRICA DELL’ATTIVITÀ DI		
SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO UMANO	PAG.	47
3.2.1. <i>MESSA A PUNTO DEL METODO</i>	PAG.	47

3.2.2.	<i>VALIDAZIONE DEL METODO</i>	PAG.	49
3.2.3.	<i>APPLICAZIONE DEL FAD-NAD⁺ METODO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA UMANO</i>	PAG.	51
3.2.4.	<i>DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO DI PAZIENTI CON MALATTIA DI ALZHEIMER E CON IMPIANTO DI STENT</i>	PAG.	53
3.2.5.	<i>DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO DI PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA</i>	PAG.	56
3.3.	<i>ALCUNI ASPETTI FISIOLGICI DI SSAO/VAP-1 IN ADIPOCITI</i>	PAG.	59
3.3.1.	<i>ATTIVITÀ SSAO/VAP-1 IN ADIPOCITI UMANI: EFFETTO DEL SUBSTRATO, DELLA CATALASI E DEL COMPOSTO ANTIOSSIDANTE</i>	PAG.	60
3.3.2.	<i>ATTIVITÀ DELLE MONOAMMINO OSSIDASI (MAO) IN ADIPOCITI UMANI: EFFETTO DEL SUBSTRATO, DELLA CATALASI E DEL COMPOSTO ANTIOSSIDANTE</i>	PAG.	63
3.3.3.	<i>ANALISI SDS-PAGE IN GRADIENTE DI ACRILAMMIDE: UN DIFFERENTE PROFILO DI ESPRESSIONE PROTEICA IN ADIPOCITI UMANI INCUBATI IN PRESENZA ED IN ASSENZA DI INSULINA</i>	PAG.	67
CONCLUSIONI	PAG.	66
BIBLIOGRAFIA	PAG.	69
RINGRAZIAMENTI			

RIASSUNTO

L'ammino ossidasi umana sensibile alla semicarbazide (SSAO/VAP-1) è una glicoproteina transmembrana, che catalizza la deamminazione ossidativa di ammine primarie ad aldeidi, con rilascio dello ione ammonio e perossido di idrogeno. Il suo ruolo fisiologico non è ancora chiaro: in adipociti, l'attività SSAO/VAP-1 ha un effetto che mima quello dell'insulina, mentre nell'endotelio vascolare e sinusoidale epatico, SSAO/VAP-1 è coinvolta nell'extravasazione dei leucociti ai siti di infiammazione. Su queste basi, lo sviluppo di nuovi specifici inibitori per SSAO/VAP-1 è un target importante per lo sviluppo di nuovi farmaci antinfiammatori, mentre lo sviluppo di nuovi specifici substrati può contribuire a chiarire le funzioni fisio-patologiche di questo enzima.

Per ottenere informazioni sulle caratteristiche che una molecola dovrebbe possedere per essere riconosciuta dal sito attivo dell'enzima umano SSAO, è stata eseguita una caratterizzazione cinetica di SSAO/VAP-1 da adipociti, utilizzando ammine primarie, caratterizzate da differente lunghezza, ingombro sterico e distribuzione di carica. L'1,12 diamminododecano e la cis-4-cloro-butenilammina sono risultati i substrati con la più alta efficienza catalitica fra quelli provati. È stato possibile stimare il valore di costante dielettrica del sito attivo di SSAO/VAP-1, che è compreso in un intervallo di circa 10-20. Dall'effetto del pH sul rapporto V_{max}/K_M della SSAO/VAP-1 per alcuni substrati, è stato possibile evidenziare che un residuo nella sua forma protonata inibisce la catalisi. Da un'analisi preliminare delle strutture 3D di VAP-1, questo residuo potrebbe essere la lisina 393. Dall'effetto della forza ionica e della temperatura sull'attività enzimatica è stato possibile dedurre che l'effetto idrofobico sembra avere un ruolo importante nella fase di riconoscimento substrato - sito attivo della SSAO/VAP-1. Sono state anche provate varie classi di composti (sali di fosfonio ed ammonio, piridina, anilina e i suoi derivati e gli N-ossidi), che sebbene siano buoni inibitori per l'enzima da siero bovino, si sono rivelati inibitori poco efficienti per l'enzima umano SSAO/VAP-1 (valori minimi di $K_i=3-4$ mM), anche se l'omologia di sequenza fra i due enzimi è elevata (82%). Dall'insieme di questi studi, è emerso che un buon substrato o inibitore per l'enzima umano SSAO/VAP-1 dovrebbe essere una molecola caratterizzata da una larga porzione apolare e dalla presenza di una carica positiva ad una distanza maggiore di 10-12 Å dal gruppo amminico reattivo.

Per ovviare all'impiego di isotopi radioattivi, è stato messo a punto un metodo fluorimetrico discontinuo per la misura dell'attività di SSAO/VAP-1 nel plasma umano. Il metodo è stato validato e applicato alla misura dell'attività della forma solubile di SSAO/VAP-1 nel plasma umano di individui controllo e in pazienti affetti da diverse patologie. Un aumento significativo dei livelli di attività SSAO/VAP-1 plasmatica è stato trovato in pazienti con Alzheimer "moderato-grave" ed in pazienti con impianto di stent coronarico. In questi pazienti oltre a SSAO/VAP-1, è stato trovato inoltre un aumento dei livelli di attività della superossido dismutasi circolante nel plasma, suggerendo una condizione di "stress ossidativo", probabilmente dovuta alla presenza dello stent. Nel caso dei pazienti con cirrosi epatica esotossica (indotta da abuso di alcool), è stato messo in luce un aumento dell'attività della forma solubile di SSAO/VAP-1 nei pazienti con cirrosi epatica "lieve-moderata" (classificazione Child), mentre nei pazienti con cirrosi epatica "grave", questo aumento si riduce. I risultati ottenuti suggeriscono che elevati livelli della forma solubile di SSAO/VAP-1, sono la conseguenza di un'intensa risposta infiammatoria, mentre la relativa diminuzione del livello di SSAO/VAP-1 nello stato più grave della patologia, potrebbe essere dovuto ad un crollo delle difese immunitarie in questi pazienti.

Per cercare di chiarire un possibile ruolo dell'attività di SSAO/VAP-1 negli adipociti, è stato condotto uno studio preliminare trattando le cellule con fattori quali insulina, metilamina, catalasi e malvidina 3-glucoside. L'analisi SDS-PAGE, evidenzia che alcune proteine sono espresse in maniera differente nell'incubazione degli adipociti con questi fattori. In particolare, la presenza di questi composti modula l'espressione di SSAO/VAP-1 e delle MAO, suggerendo che entrambi gli enzimi sono coinvolti in una comune via di segnale, mediata dall'insulina. In futuro l'identificazione delle proteine espresse tramite Spettrometria di Massa, associata ad analisi tramite Immunoblotting con anticorpi specifici, potrà contribuire a chiarire il collegamento tra SSAO/VAP-1 e la via di segnale mediata dall'insulina e a dare nuove informazioni sul ruolo di questo enzima.

ABSTRACT

Human Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO/VAP-1) is a transmembrane glycoprotein, which catalyzes the oxidative deamination of primary amines to aldehydes, with the release of the ammonium ion and hydrogen peroxide. The physiological role of SSAO/VAP-1 is not still clear: in adipocytes, SSAO/VAP-1 activity has an “insuline” like effect, while in vascular and sinusoidal hepatic endothelium, SSAO/VAP-1 is involved in the leucocyte extravasation at sites of inflammation. On these basis, the development of new specific inhibitors for SSAO/VAP-1 is an important target for the development of new anti-inflammatory drugs, while the development of new specific substrates can help to clarify the physio-pathological functions of this enzyme.

To obtain information about the characteristics of a molecule to be recognized by human SSAO active site, a kinetic characterization of SSAO/VAP-1 from adipocytes was performed. Primary amines, with different size, sterical hindrance and charge distribution were used as “probe-substrates”. 1,12 diaminododecane and cis-4-chlorobutenylamine resulted the substrates with the higher catalytic efficiency among those tested. From these measurements, it was possible to estimate the value of the dielectric constant of the active site of SSAO/VAP-1, that was found to be in the range 10-20. From the effect of pH on V_{max}/K_M of SSAO/VAP-1 for some substrates, it was possible to highlight that a residue in its protonated form impedes the catalysis. The preliminary analysis of the 3D structures of VAP-1 shows that this residue could be Lys 393. From the effect of ionic strength and of temperature on the enzyme activity it appeared that the hydrophobic effect has an important role in the active site-substrate recognition step. Various classes of compounds (phosphonium and ammonium salts, pyridine and aniline derivatives and N-oxides) as SSAO/VAP-1 inhibitors were also tested. Although they are good inhibitors of the bovine serum enzyme and of 82% of sequence homology between the two enzymes, they resulted poor inhibitors of the human SSAO/VAP-1 (with $K_i=3-4mM$).

From these studies, it emerges that a potential good substrate (or inhibitor) for the human SSAO/VAP-1 should be a molecule characterized by a large apolar moiety and by the presence of a positive charge at a distance higher than 10-12 Å from the reactive amino group.

To obviate the use of radioactive isotopes, a discontinuous fluorimetric method for the detection of SSAO/VAP-1 activity in human plasma was set up. The method was validated and applied to the measurement of soluble SSAO/VAP-1 activity in human plasma from healthy controls and from patients with various diseases. A significant increase of soluble SSAO/VAP-1 activity was found in patients with “moderate-severe” Alzheimer disease and in patients with coronary stent implantation. In these patients in addition to SSAO/VAP-1 augment, an increase of circulating extracellular superoxide dismutase activity was also found, suggesting a condition of “oxidative stress”, probably due to the presence of the stent. In the patients with hepatic cirrhosis (induced by alcohol abuse) it was possible to highlight an increase of soluble SSAO/VAP-1 activity in the patients with “mild-moderate” hepatic cirrhosis (according to Child score), while in the patients with “severe” hepatic cirrhosis this increase of activity is lower. These results suggest that high levels of soluble SSAO/VAP-1 are the consequence of an intense inflammatory response, while the relative decrease of the SSAO/VAP-1 level in plasma in the severe state of cirrhosis, could be due to a fall down of the immune defences in these patients.

To investigate a possible role of SSAO/VAP-1 activity in adipocytes, a preliminary study was carried out incubating the cells with insuline, methylamine, catalase and malvidine 3-glucoside. From this study, it appears that some proteins are differently expressed in the presence of these factors. In particular, the presence of insuline, methylamine and malvidine 3-glucoside appears to modulate the expression of SSAO/VAP-1 and of MAO, suggesting that both the enzymes are involved in a common signaling pathway, mediated by the insuline. In future the identification of the expressed proteins by Mass-Spectrometry, associated with Immunoblotting, using specific antibodies may contribute to clarify the connection between SSAO/VAP-1 and insuline pathway and will contribute to obtain new information about the role of this enzyme.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Le ammino ossidasi (AO) sono una famiglia di enzimi, che catalizzano la deaminazione ossidativa di ammine biogene in aldeidi, ione ammonio e perossido di idrogeno. In base alla natura del loro cofattore carbonilico, le AO si suddividono in due gruppi: Le AO FAD-dipendenti, che contengono flavin adenin dinucleotide, e le AO che contengono un altro cofattore carbonilico ed uno ione rame (Cu-AO) (Lyles G. A., 1996). Questi due gruppi di enzimi si differenziano per la loro localizzazione cellulare, per la loro specificità di substrati e di inibitori e per la loro funzione fisiologica.

Le monoammine ossidasi (MAO A e B) e le poliammine ossidasi (PAO) appartengono al gruppo delle AO-FAD dipendenti. Le MAO si trovano sulla membrana mitocondriale esterna nella maggior parte delle cellule, hanno un importante ruolo nel metabolismo di alcuni neurotrasmettitori (noradrenalina, dopamina, 5-idrossitriptamina), ed altre ammine biogene (β -fenetilamina, tiramina, triptamina, octopamina); sono inibite da clorgillina (inibitore specifico delle MAO A), deprenil (inibitore specifico delle MAO B) e pargillina (inibitore delle MAO A e B). Sono inoltre associate a numerose malattie del sistema nervoso.

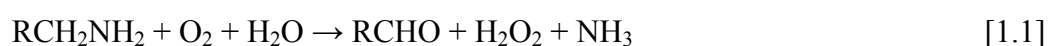
Le poliammine ossidasi (PAO) hanno localizzazione intracellulare, sono specifiche per le poliammine (spermina, spermidina ed i loro N-acetil derivati), sono in grado di ossidare anche i gruppi amminici secondari intracatena, e sono coinvolte nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare (Morgan D.M., 1985).

Al gruppo delle AO contenenti rame appartengono le AO che contengono come secondo cofattore il 2,4,5 triidrossi-fenilalanilchinone (TPQ), derivato da una modificazione post-traduzionale di una tirosina conservata in tutte le AO. Fanno eccezione le lisilossidasi che contengono il lisina-tirosilchinone (LTP). Le lisilossidasi sono specifiche per la lisina del collagene e per l'elastina e regolano la formazione della matrice extracellulare del tessuto connettivo (Kagan H.M. et al., 1991). Il cofattore carbonilico delle Cu-AO è inibito dalla semicarbazide e da altri reagenti specifici per i gruppi carbonilici e per questo questo gruppo di enzimi è anche noto come Ammino Ossidasi Sensibili alla Semicarbazide (SSAO). Le SSAO (EC 1.4.3.6) sono enzimi

ubiquitari, che si trovano dai batteri ai funghi, dagli organismi vegetali a quelli animali. Fanno parte di questo gruppo le diammino ossidasi (DAO), enzimi intracellulari con alta specificità per le diammine (putrescina, cadaverina, istamina) (Gorkin V.Z., 1983), e preferenzialmente espresse nella placenta, nel rene e nell'intestino. Le DAO sono coinvolte nei processi infiammatori, nelle reazioni allergiche e sembra anche nella divisione cellulare. Alle SSAO contenenti TPQ e non specifiche per le diammine appartengono una forma solubile di SSAO presente nel plasma ed una forma ancorata alla membrana cellulare e presente in molti tessuti. La specificità di substrato di queste SSAO dipende dalla loro fonte e dal tessuto che le esprimono. Diversamente dalle MAO, per le SSAO il ruolo biologico non è ancora completamente chiaro in quanto sono coinvolte in numerosi processi fisiologici, quali la detossificazione di ammine xenobiotiche, la regolazione dell'assorbimento cellulare del glucosio, l'adesione cellulare ed l'extravasazione dei leucociti e la regolazione della crescita e del differenziamento cellulare. Nel genoma umano sono stati clonati tre geni per le SSAO ed uno pseudogene: il gene AOC1 che codifica per le diammino ossidasi (DAO), AOC2 che codifica per una SSAO specifica di retina (RAO), e AOC3 per l'ammino ossidasi umana di membrana SSAO/VAP-1. Lo pseudogene AOC4, nell'uomo, come anche nei roditori, è un gene difettoso che non produce la proteina matura. Negli altri mammiferi, invece AOC4 è espresso principalmente dagli epatociti e codifica per una SSAO solubile che viene secreta nel plasma (Schwelberger H.G., 2007).

Dal punto di vista molecolare, le SSAO sono delle glicoproteine costituite da due subunità identiche, unite da ponti disolfuro. Ogni subunità contiene il fattore carbonilico identificato come TPQ da Janes S.M. et al., 1992, ed uno ione rame allo stato cuprico.

La reazione di deamminazione ossidativa catalizzata dalle SSAO (reazione 1.1) si svolge con un meccanismo cinetico tipo ping-pong, che si può suddividere in due semireazioni: nella prima semireazione il TPQ viene ridotto dall'ammina substrato che viene rilasciata come aldeide. Il TPQ, viene quindi riossidato dall'ossigeno molecolare nella seconda semireazione di ossidazione, con il concomitante rilascio di acqua ossigenata e ammonio.



Numerosi ed eleganti studi cinetici condotti da diversi gruppi hanno ormai chiarito in dettaglio il meccanismo catalitico delle SSAO (Mure M. et al., 2002; Dooley D.M. et al., 1999; Padiglia A. et al., 2001; Brazeau B.J. et al., 2004), che è riportato in figura 1.1.

I passaggi principali della reazione complessiva sono i seguenti:

1. entrata del substrato nel sito attivo e deprotonazione del gruppo amminico reattivo;
2. condensazione del gruppo amminico primario con il gruppo carbonilico (in posizione 5 del TPQ) e formazione del substrato della base di Schiff (b) [Cu²⁺-chetoimmmina];
3. isomerizzazione dell'immmina con estrazione dell'idrogeno dal carbonio in α (C₁) del substrato, catalizzata da una base altamente conservata nelle SSAO (residuo di acido aspartico). Si forma l'intermedio Cu²⁺-carbanione (c), che velocemente si "riarrangia" per formare il prodotto della base di Schiff [(b), Cu²⁺-chinoaldimmmina];
4. in seguito con l'idrolisi dell'immmina si ha il rilascio dell'aldeide ed il TPQ è nella sua forma ridotta [(e), Cu²⁺-amminoresorcinolo];
5. il TPQ ridotto è quindi riossidato dall'ossigeno molecolare e vengono rilasciati acqua ossigenata e ione ammonio. In questo stadio sembra intervenire il rame.

Nelle piante è stato osservato che l'amminoresorcinolo (e) è in equilibrio con una forma radicalica (f, Cu²⁺-semichinone radicalico) ed entrambe queste due specie reagiscono con l'ossigeno per produrre il TPQ e chiudere così il ciclo catalitico.

Nelle SSAO di mammifero, in condizioni di saturazione di ammina ed ossigeno, lo stadio limitante la costante catalitica è quello relativo all'estrazione dell'idrogeno dal C₁ del substrato (passaggio della base di Schiff del substrato alla base di Schiff del prodotto).

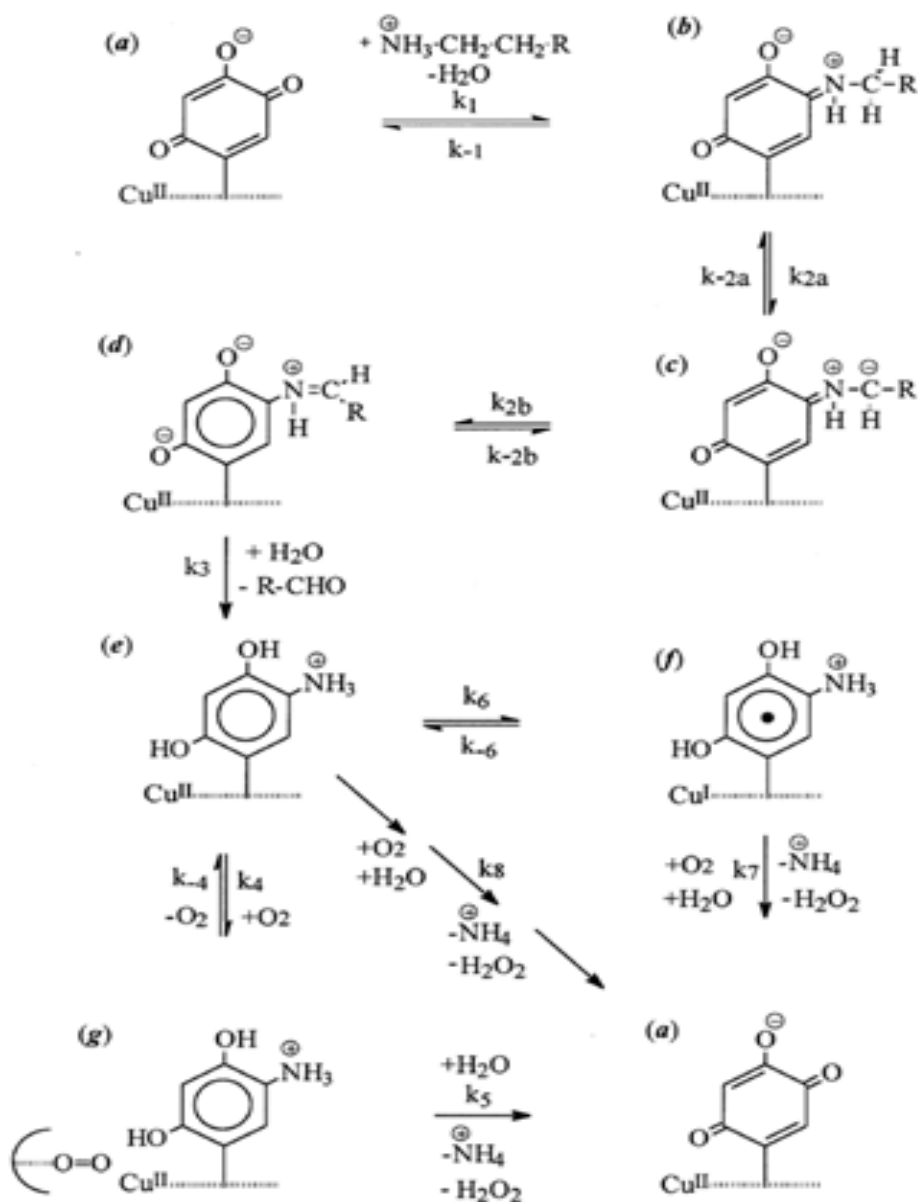


Figura 1.1. Schema del meccanismo catalitico di deaminazione ossidativa delle ammino ossidasi contenenti rame. Meccanismo proposto da (Padiglia A. et al., 2001). (a) enzima ossidato, (b) Cu^{II}-chetimmina, (c) Cu^{II}-specie anionica, (d) Cu^{II}-chinolaldimina, (e) Cu^{II}-amminoresorcinolo, (f) Cu^{II}-semichinone radicalico.

1.1. STRUTTURA DELL'AMMINO OSSIDASI UMANA VAP-1.

Poiché l'argomento della mia tesi di dottorato è l'SSAO/VAP-1 umana, da adesso in poi focalizzerò la mia attenzione su questa specifica SSAO.

L'enzima umano VAP-1 è una glicoproteina di membrana omodimerica di 180 kDa (monomero di 761 amminoacidi), costituita da una piccola coda citoplasmatica N-

terminale, un corto segmento transmembrana ed una larga porzione extracellulare (dall'amminoacido 55 a 761) (Salmi M. et al., 1992; Smith D. et al., 1998). La risoluzione della prima struttura cristallografica dell'ammino ossidasi umana VAP-1 è stata fatta da Airene T. et al, 2005 (PDB 1US1). Successivamente, nel 2006, è stata pubblicata la struttura 3D dell'enzima umano VAP-1 ricombinante, dove la regione extracellulare è stata espressa nelle cellule di embrione di rene in fusione con glutatione S-transferasi (GST) (Öhman J. et al., 2006). L'ammino ossidasi umana VAP-1 ha una struttura a forma di cuore, costituita da tre domini proteici D2, D3 e D4 (figura 1.3). Questo tipo di struttura è simile a quella di altre ammino ossidasi contenenti rame e cristallizzate, in particolare a quella dell'enzima ottenuto da siero bovino (BSAO) (82% di omologia di sequenza). Il dominio D4 è il più grande, è nel centro della proteina e si interfaccia con il dominio D4 dell'altro monomero. Sui superficie più esterna, si trovano D2 e D3 come mostrato in figura 1.3.

Il sito attivo, localizzato nel dominio D4 si trova in profondità all'interno della proteina, comprende il cofattore TPQ, la base catalitica Asp 386, residuo altamente conservato in tutte CuAO e tre residui di istidina (His 520, His 522 e His 684) che coordinano lo ione Cu^{2+} . Il sito attivo di VAP-1 è accessibile attraverso un lungo canale circondato principalmente da amminoacidi dei domini D3 e D4. Il canale del sito attivo è ristretto da un residuo di leucina (Leu 469), che funge da "cancello". Le proprietà degli amminoacidi che formano il canale del sito attivo hanno un ruolo importante nel determinare la specificità del substrato delle diverse ammino ossidasi. L'enzima umano VAP-1 possiede inoltre un motivo rigido RGD (Arg-Gly-Asp), esposto sulla superficie, che è coinvolto nella funzione di adesione cellulare. Infatti, la mancanza di RGD nella sequenza porta ad una diminuzione di adesione del linfocita alle cellule endoteliali (Salmi M. et al., 2000). Il monomero dell'enzima umano possiede alcuni potenziali siti di glicosilazione, che sembrano essere fondamentali nel regolare e modulare l'adesione del linfocita alla VAP-1 espressa sull'endotelio (Maula S.M. et al., 2005).

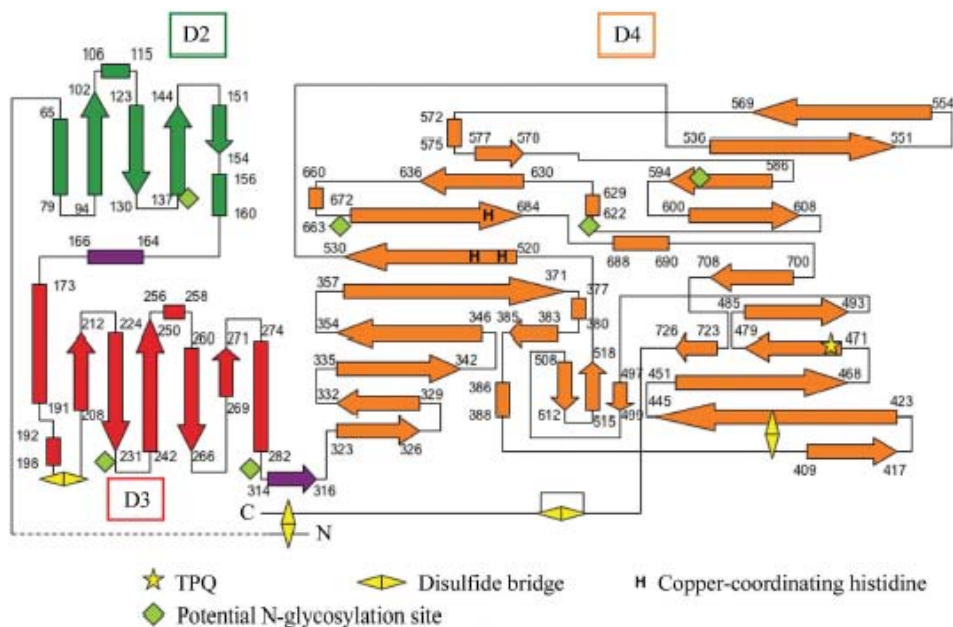
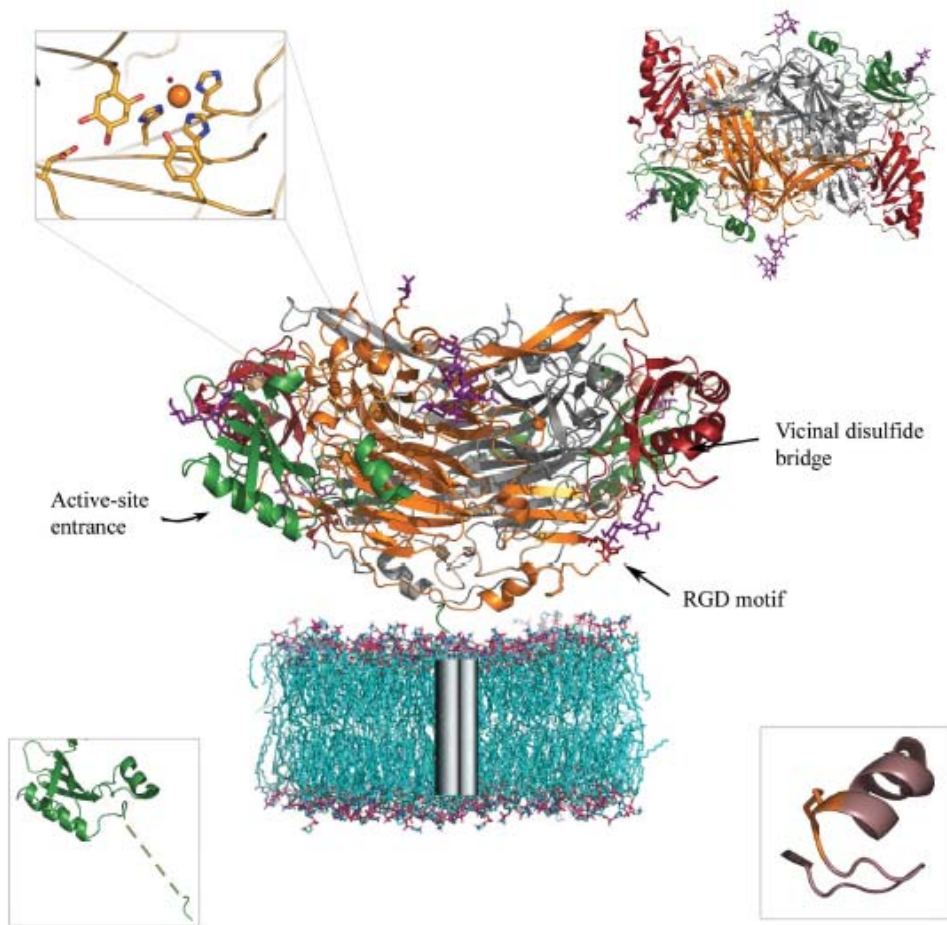


Figura 1.3. Struttura dell'ammino ossidasi umana SSAO/VAP-1. Il dominio D2 è mostrato in verde, il dominio D3 in rosso e il dominio D4 in grigio (monomero A) o in arancio (monomero B) e i carboidrati sono mostrati in viola. I cilindri grigi rappresentano la coda che “ancora” l'enzima alla membrana (Jakobsson E. et al., 2005).

1.2. FUNZIONI DI SSAO/VAP-1.

Il ruolo fisiologico di SSAO/VAP-1 non è ancora ben chiaro, oltre a degradare ammine biogene e xeno biotiche è ormai certo che svolge anche altre funzioni che dipendono dal tessuto dove essa è espressa (figura 1.4). SSAO/VAP-1, nell'uomo è principalmente espressa dalle cellule endoteliali vascolari, dalle cellule muscolari lisce, dalle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici e negli adipociti.

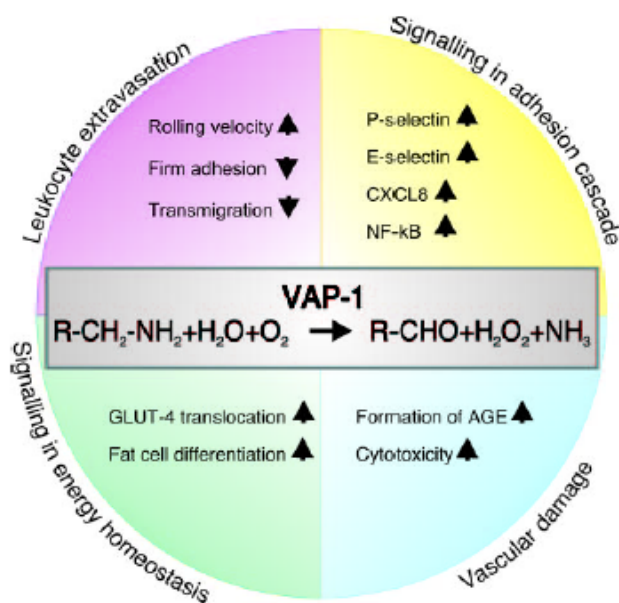


Figura 1.4. Natura multifunzionale di VAP-1. L'attività enzimatica di VAP-1 contribuisce all'adesione e all'extravasazione dei leucociti, processo complesso e nel quale intervengono altre molecole di adesione. I prodotti finali del meccanismo catalitico di SSAO/VAP-1 hanno effetti simili a quelli dell'insulina nel metabolismo energetico e possono causare danno vascolare a causa della loro citotossicità (Jalkanen S. et al., 2008).

Nelle cellule endoteliali vascolari e nelle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici, SSAO/VAP-1 esplica la funzione di molecola di adesione cellulare: in presenza di uno stimolo pro infiammatorio (ad esempio $\text{TNF-}\alpha$) “rallenta” alcuni tipi di leucociti ed interviene per determinarne l'extravasazione verso i siti di infiammazione.

Nella reazione di adesione sarebbero coinvolti il dominio catalitico, che “agganciando” un substrato non identificato e presente sul leucocita ne determinerebbe il rallentamento, ed un dominio di “adesione” ricco di carboidrati (Jalkanen S. et al., 2001). Recentemente un modello di topo knockout per il gene AOC3 (AOC3KO)

(Stolen C.M. et al., 2005) ha confermato il ruolo questo enzima nella risposta immunitaria (Salmi M. et al., 2005).

E' da sottolineare che le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici esprimono costitutivamente SSAO/VAP-1 e non esprimono le altre molecole di adesione quali PECAM-1 ed E-Selectina.

Nelle cellule muscolari lisce l'attività di SSAO/VAP-1 con la metilammina come substrato, sembrerebbe essere fonte di molecole segnale (H_2O_2 e/o formaldeide), che indurrebbero il rilassamento dei vasi sanguigni con un meccanismo non ancora noto (Conklin D.J. et al., 2004).

Negli adipociti l'attività SSAO/VAP-1 mima gli effetti indotti dall'insulina. In queste cellule VAP-1 colocalizza con CD36 (trasportatore di acidi grassi a catena lunga e delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate) nelle caveole della membrana plasmatica ed inoltre è presente nelle vescicole intracellulari nelle quali è compartimentato il trasportatore di glucosio GLUT 4. E' stato dimostrato che in presenza di un suo substrato, SSAO/VAP-1 induce la traslocazione di GLUT 4 sulla membrana plasmatica e quindi favorisce l'assorbimento del glucosio. L'acqua ossigenata prodotta dall'attività ammino ossidasica sembra infatti attivare, in presenza di vanadato, la via di segnale del recettore dell'insulina (figura 1.5). In questa via si ha la fosforilazione dei substrati del recettore dell'insulina (IRS1 e IRS 3), con la conseguente attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi, che attiva la traslocazione delle vescicole contenenti GLUT 4 (Morin N. et al., 2002; Zorzano et al., 2003). Altri effetti dell'attività enzimatica di SSAO/VAP-1 che mimano quelli indotti dall'insulina negli adipociti sono: l'inibizione del processo lipolitico con conseguente stimolazione della lipogenesi (Visentin V. et al., 2003) e la regolazione del rilascio di lattato (Bairras C. et al., 2003). Promuove inoltre l'adipogenesi, cioè la differenziazione e la maturazione degli adipociti (Bour S. et al., 2007).

Per queste sue particolari proprietà nel tessuto adiposo SSAO/VAP-1 è considerata un potenziale target nel trattamento dell'obesità (Bour S. et al., 2007).

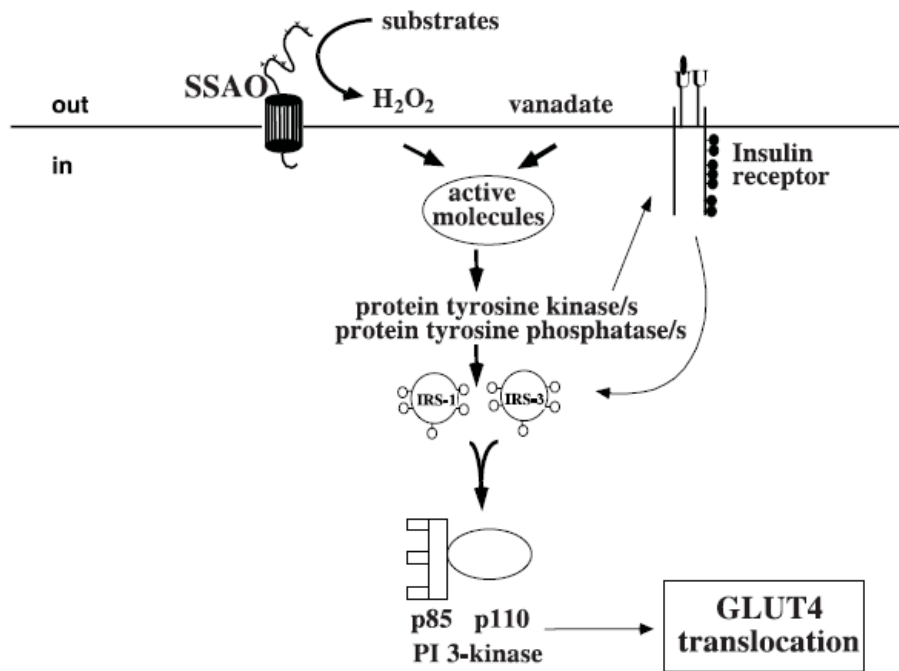


Figura 1.5. Effetto dell'attività SSAO negli adipociti. In presenza di benzilammina o metilammina e vanadato, SSAO/VAP-1 induce la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT 4 sulla superficie cellulare, mimando l'azione dell'insulina (Zorzano A. et al., 2003).

Se numerosi sono gli studi sul ruolo fisiologico di SSAO/VAP-1, altri studi evidenziano invece la citotossicità dei prodotti della sua reazione enzimatica (acqua ossigenata ed aldeidi), correlabili all'insorgenza di varie patologie. La formaldeide (derivata dalla metilammina) è infatti un agente altamente reattivo, citotossico e potenzialmente cancerogeno, è capace di reagire con proteine e DNA, alterandone la funzionalità. Questi effetti sarebbero particolarmente evidenti nei vasi sanguigni, in quanto nel plasma non è presente la formaldeide deidrogenasi. Inoltre, anche l'acqua ossigenata, oltre a svolgere la sua funzione di messaggero secondario, potrebbe formare radicali liberi idrossilici molto reattivi attraverso la reazione di Fenton, contribuendo in questo modo all'insorgenza di una condizione definita "stress ossidativo" (figura 1.2) (Yu P. et al., 2003).

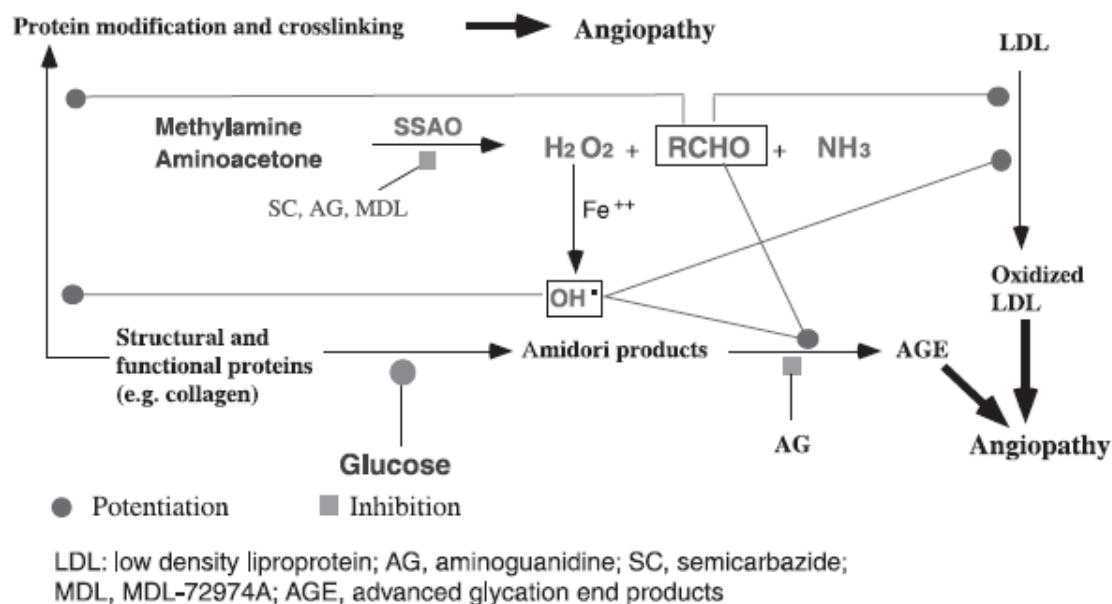


Figura 1.2. Schema dei meccanismi di citotossicità dei prodotti della deamminazione ossidativa delle SSAO nelle malattie vascolari (Yu P. et al., 2003).

1.3. SSAO/VAP-1 PLASMATICA E CONDIZIONI PATOLOGICHE.

Nell'uomo la SSAO solubile presente nel plasma deriva dalla SSAO/VAP-1 di membrana. La proteolisi della codina transmembrana da parte di metalloproteasi di matrice, con meccanismi e regolazione non ancora noti, rilascia nel plasma la porzione di proteina extracellulare. In individui sani, i livelli di attività della forma solubile/plasmatica di SSAO/VAP-1 è piuttosto bassa (circa $400 \text{ pmol}_{\text{BZA}}/\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}}$), ma questa attività risulta alterata in varie condizioni patologiche (Boomsma F. et al., 2003). E' ancora controverso se queste variazioni dei livelli plasmatici di SSAO/VAP-1 siano la causa o l'effetto di tali condizioni patologiche. Elevati livelli di attività SSAO/VAP-1 plasmatica sono stati osservati nel caso del diabete (tipo I e II, soprattutto in presenza di complicazioni come retinopatia nefritica) (Boomsma F. et al., 2003), nell'obesità (indice di massa corporea BMI > 35), nei disfunzioni renali, in alcune patologie del fegato (cirrosi, epatiti virali ed altre malattie del fegato) (Kurkijarvi R. et al., 1998) e nella sclerosi multipla (Airas L. et al., 2006). Elevati livelli di SSAO/VAP-1 plasmatica ed un'elevata espressione della proteina, sono stati riportati anche nella psoriasi (Madej A. et al., 2007), nell'eczema atopico, e nella malattia di Alzheimer (del Mar Hernandez M. et al., 2005). Una diminuzione dell'attività di

SSAO/VAP-1 si riscontra solo raramente ad esempio in alcuni tipi di cancro solido oppure recentemente in pazienti affetti da depressione e in pazienti schizofrenici trattati con antipsicotici di seconda generazione (Roessner V. et al., 2007). L'attività SSAO/VAP-1 è stata studiata come un possibile marker biologico per l'aterosclerosi e le complicazioni macrovascolari nei due tipi di diabete. La regolazione dei livelli plasmatici di SSAO/VAP-1 non è ancora ben conosciuta. E' stato però visto che il TNF- α , fattore che promuove il meccanismo di insulino-resistenza, promuove un aumento della forma solubile di SSAO/VAP-1, attivando delle metalloproteasi, e contemporaneamente inibisce la sintesi della forma di membrana (García-Vicente S. et al., 2005).

1.4. INIBITORI DI SSAO/VAP-1.

Inibitori efficaci ma non specifici della SSAO/VAP-1 sono composti contenenti un gruppo funzionale idrazinico (con IC_{50} = 0.2-06 μ M), e sono principalmente fenilalilidrazine (ad esempio LJP-1207), degli alcool dell'idrazina (WO 0202090), degli idrazino-indani (ad esempio il BTT-2052), semicarbazide (0.1-1mM) e idrossilammina. Composti con altri gruppi funzionali, diversi da quello idrazinico, ad esempio carbossiammidi e sulfonammidi e composti con un gruppo guanidinico, hanno valori di IC_{50} dell'ordine del nanomolare. Molti farmaci usati in terapie si comportano da inibitori dell'SSAO/VAP-1 (derivati dell'idrazina, come ad esempio isoniazide, fenelzina, amminoguanidina, idralazina, carbidopa, e gli antidepressivi zimeldina, imipramina, maprotilina e nomifensina) (Obata T. et al., 2000). L'interesse crescente per VAP-1 come un nuovo target antinfiammatorio è dovuto al suo ruolo nell'extravasazione dei linfociti nei siti di infiammazione (Jaakkola K. et al., 2000). A questo proposito, è stata avanzata l'ipotesi che degli ammino zuccheri e delle proteine con un gruppo amminico libero presenti sulla superficie del leucocita potrebbero essere potenziali substrati per SSAO/VAP-1 (Jalkanen S. et al., 2001). Anche la L-lisina è stata recentemente studiata come possibile substrato/inibitore di VAP-1. Sulle basi di un modello molecolare sono stati prodotti dei peptidi sintetici che interagiscono con il canale di VAP-1. Il più potente inibitore così ottenuto (P1) ha una IC_{50} di 534.0 ± 28.2 μ M sulla VAP-1 ricombinante. In saggi biologici, è stato provato che P1 è un inibitore selettivo dell'attività di SSAO/VAP-1, bloccando l'adesione del linfocita sulle cellule

endoteliali dove è espressa VAP-1. E' stato anche riportato un debole effetto inibitorio di amminoesosi, come ad esempio galattosamina, glucosammina e mannosammina ($K_i=2-5\text{mM}$). Recentemente si è inoltre visto che alcuni antibiotici aminoglicosidici, fra i quali la gentamicina, la tobramicina, l'amikacina e la purmicina, si comportano anche da inibitori di VAP-1 (Jalkanen S. et al., 2005). Sono inoltre in fase di studio e produzione degli anticorpi per VAP-1, specifici per il dominio di "adesione", che dovrebbero impedire l'interazione e quindi la trasmigrazione dei leucociti e conseguentemente dovrebbero bloccare la risposta infiammatoria. In saggi di adesione e di trasmigrazione, i nuovi anticorpi prodotti risultano abbastanza efficaci e riducono anche in maniera significativa la risposta infiammatoria in un modello acuto di peritonite. Il blocco di VAP-1 da parte di "vapalimomab", anticorpo specifico per VAP-1, è già stato provato in vivo su pazienti con dermatite da contatto (Vainio P.J. et al., 2005). Questo trattamento risulta ben tollerato in vivo in tali pazienti e presenta solo moderati effetti collaterali. I risultati ottenuti da questi studi suggeriscono che VAP-1 è un potenziale target anche per un trattamento di malattie infiammatorie della cute. Con lo scopo di inibire entrambe le funzioni dell'enzima umano VAP-1 (la funzione di adesione e quella enzimatica), sono state sintetizzate piccole molecole di RNA interferente (siRNA) dirette ad un sito di bersaglio selettivo del mRNA di VAP-1, che ne bloccherebbe l'espressione. Il vantaggio di quest'ultimo approccio è che questo tipo di intervento è il solo modo di inibire entrambe le funzioni dell'enzima umano, mentre le piccole molecole di inibitori o gli anticorpi prodotti contro VAP-1 agiscono sulle due funzioni dell'enzima separatamente.

1.5. SUBSTRATI DI SSAO/VAP-1.

L'amminoacetone (derivato dal metabolismo della glicina e della treonina) e la metilammina (derivata dal metabolismo dell'adrenalina, creatina, creatinina tramite la sarcosina e della colina, o ingerita da cibo, bevande e dal fumo di sigaretta) sono le uniche ammine finora identificate come substrati endogeni e fisiologici dell'enzima umano SSAO/VAP-1. L'esistenza di altri substrati e quali essi siano è ancora una questione aperta e oggetto di studio. Uno dei migliori substrati non fisiologici di SSAO/VAP-1 è la benzilammina.

In studi di correlazione fra struttura ed attività, è stato analizzato l'effetto dei vari sostituenti sull'attività SSAO, utilizzando la benzilammina e la m-xilenediammina come substrati di riferimento (Yraola F. et al., 2006). Il substrato aromatico con il più alto valore di costante catalitica (circa il doppio rispetto alla benzilammina) trovato in questo studio è la 4-fenilbutilammina, mentre il substrato con migliore efficienza catalitica è la 4-fluorobenzilammina (avente efficienza catalitica quasi doppia rispetto a quella della benzilammina).

Poiché è dimostrato che la somministrazione di substrati per le ammino ossidasi (ad esempio benzilammina e metilammina) e vanadato produce un effetto anti iperglicemico (l' H_2O_2 prodotta, esercita un effetto simile all'insulina potenziato in combinazione con vanadato, attraverso la formazione di peroxovanadato), i sali di vanadio (V) delle arilalchilammine sono state proposte per il trattamento e la prevenzione del diabete mellito. Altri metalli oltre al vanadio, appartenenti ai gruppi VIa e VIb, (ad esempio il selenio, il molibdeno o il tungsteno), potrebbero essere utilizzati sotto forma di sali di arilalchilammine come substrati di SSAO/VAP-1 (Albericio F. et al., 2006).

In questo contesto, studi finalizzati al disegno e alla sintesi di nuovi substrati e inibitori specifici di SSAO/VAP-1 umana, contribuiranno a chiarire il ruolo di questo enzima nelle varie condizioni fisiologiche e patologiche e a sviluppare nuove terapie per le patologie correlate a SSAO/VAP-1, in particolare per il diabete e per le disfunzioni associate all'obesità.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1. MATERIALI.

2.1.1. REAGENTI.

I reagenti chimici utilizzati nel lavoro sperimentale di questa tesi sono stati forniti dalla ditta Sigma- Fluka Aldrich S.R.L (Milano, Italia), tranne alcuni qui di seguito elencati. Il composto fluorescente Amplex Red, utilizzato per le misure di attività enzimatica è stato fornito dalla ditta Molecular Probes Invitrogen (Invitrogen S.R.L, San Giuliano Milanese (MI) Italia). Il reattivo di sviluppo 5-Bromo-4- Cloro-3-indolilfosfato/ Nitroblue di tetrazolio (BCIP/NBT) è stato fornito dalla ditta Calbiochem(Germania). L'anticorpo secondario Goat anti-rabbit IGg, coniugato alla fosfatasi alcalina è stato fornito dalla ditta Calbiochem (Germania).

Campioni biologici.

Il tessuto adiposo è stato gentilmente fornito da interventi di addominoplastica presso l'ospedale di Padova.

I campioni di plasm e sieri sono stati ottenuti da volontari sani e da pazienti con varie patologie, nell'ambito dello svolgimento dei progetti di ricerca "Sperimentazione di Nuovi Materiali e Nanotecnologie nella Prevenzione della Restenosi", grant 2004 e il progetto "il microcircolo come target terapeutico nelle demenze", grant 2005. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato.

Le caratteristiche dei campioni di plasma sono le seguenti:

- 31 campioni di plasma sono stati prelevati da volontari sani in età compresa tra 25 e 85 anni (24 maschi e 7 femmine, età media 52.4 ± 21.1 anni);
- 9 campioni di plasma sono stati prelevati da pazienti cardiopatici dopo 6 mesi di impianto percutaneo di stent coronarico (8 maschi e 1 femmina, età fra 44-82 anni, età media 65.3 ± 10.9 anni). Fra questi pazienti, 5

soggetti (4 maschi ed 1 femmina) sono affetti da restenosi, con restringimento del lume del vaso superiore al 50%;

- 20 plasmi sono stati prelevati da pazienti affetti da Alzheimer (AD) senza patologia cerebrovascolare, diagnosticata in accordo al criterio NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Secondo la classificazione Mini Mental State Examination (MMSE) variabile tra 0 (grave deficit cognitivo) e 30. Questo gruppo di AD (4 maschi e 8 femmine, età compresa tra 60 e 84 anni, età media di 75.9 ± 6.7 anni), ha un valore medio di MMSE \pm dev. standard pari a $(18 \pm 7.5)/30$. In accordo a questa classificazione sono stati studiati 7 pazienti affetti da Alzheimer classificati come lieve, 2 pazienti con AD moderato e 3 pazienti con AD grave.

I pazienti con cirrosi epatica esotossica sono stati forniti da Clinica Medica V, ospedale di Padova. Sulla base della classificazione Child (variabile tra 5 e 15 in base alla gravità della malattia), sono stati forniti 11 pazienti con cirrosi epatica classificati come "lievi" (Child 5-6), 11 pazienti con cirrosi epatica "moderata" (Child 7-9) e 6 pazienti classificati come "gravi" (Child 10-15).

2.1.2. STRUMENTAZIONE.

Per condurre gli esperimenti sono state utilizzate le seguenti strumentazioni:

- Centrifuga Beckman J2-21;
- Centrifuga ALC 4214;
- Centrifuga CWS (cool working system) 4235;
- Agitatore IKA KS 130 basic (Elettrofor, Italia);
- Spettrofotometro UV-Visibile VARIAN CARY 50 SCAN;
- Spettrofotometro a fluorescenza VARIAN CARY ECLIPSE;
- Fluoroscanner ASCENT FL labsystems;
- Multiscan Ex labsystems;
- Alimentatore Consort EV261 (Electrophoresis Power Supply);

- Apparecchio per SDS-PAGE Hoefer SE 260 (Amersham Biosciences, Germania) per i mini-gel; Hoefer SE 600 per i gel grandi in gradiente;
- Apparecchio per Western Blotting Hoefer TE 22 (Amersham Biosciences, Germania);
- Polarografo Amel 466 (Milano, Italia)

2.2. METODI.

2.2.1. ISOLAMENTO DI ADIPOCITI DA TESSUTO ADIPOSO ED INCUBAZIONE CON VARI FATTORI.

I campioni di tessuto adiposo, ottenuti freschi da operazione di addominoplastica, vengono sminuzzati e digeriti con collagenasi (1mg/ml) in soluzione Krebs-Ringer (contenente BSA (35mg/ml) e glucosio 6mM, pH=7.4) per circa 60-90 minuti a T=37° sotto leggera agitazione, secondo Morin. et al. (2001). Dopo la digestione, le cellule adipose vengono prelevate, e centrifugate per 5 minuti a 250 xg, per separare le cellule adipose dai residui. Lo strato di olio sovrastante le cellule, viene eliminato e le cellule adipose che “galleggiano” sopra la soluzione acquosa, vengono lavate per due volte in PBS e tenute a temperatura ambiente in assenza di collagenasi. Le cellule adipose recuperate, vengono quindi incubate per 2 ore in terreno di coltura DMEM F12 (Ham), in assenza ed in presenza di insulina (200 nM) ed in presenza di alcuni dei seguenti fattori: metilammina 10 mM, catalasi 0.55 µM, H₂O₂ 1 mM e malvidina 3-glucoside 18 µM. Le incubazioni sono state eseguite sotto agitazione a 90 riv/min ad una temperatura di 37 °C. Le cellule non sottoposte ad incubazione sono state congelate in azoto liquido. Terminata l’incubazione, sono stati eseguiti 2 lavaggi con PBS e le cellule recuperate sono state congelate in azoto liquido.

Per eseguire le misure di attività e l’analisi SDS-PAGE, le cellule sono state scongelate e lisate a 4°C in tampone Hepes (20 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0.5%) e inibitori di proteasi (1/400 v/v) a pH 7.2, volume cellule/volume buffer 1/1.

2.2.2. PREPARAZIONE DI MEMBRANE DA ADIPOCITI.

50 ml di adipociti recuperati dopo il trattamento con collagenasi, vengono lisati con 180 ml di tampone di lisi a temperatura ambiente per 30 minuti. Il tampone di lisi è costituito da: MgCl₂ 3 mM, NaHCO₃ 1 mM, KCl 1 mM, Hepes 3 mM, EGTA 3mM, 1/400 Cocktail di inibitori di proteasi 1/400 (da mettere prima dell'uso) a pH 7.4.

Dopo la lisi, gli adipociti vengono centrifugati a 37000 xg in una centrifuga Beckman J2-21 per 40 minuti. Si ottengono dei piccoli "pellet" di membrane, che vengono risospesi nel buffer di lisi, sempre in assenza di detergente. Le membrane così risospese vengono congelate in azoto liquido. Per la solubilizzazione delle membrane, si ricentrifuga la sospensione delle membrane a 28000 xg per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene risospeso in Mops 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM pH 7.2, β-OGP 50 mM o altro detergente. Si preleva un'aliquota per il dosaggio dell'attività e delle proteine. Si centrifuga nuovamente a 28000 xg per 10 minuti e si recupera il surnatante contenente l'enzima SSAO/VAP-1, che viene congelato in azoto liquido.

2.2.3. MISURE DI ATTIVITA' AMMINO OSSIDASICA CON IL METODO DELL'AMPLEX RED ACCOPPIATO ALLA PEROSSIDASI.

L'attività ammino ossidasica si può misurare mediante dei metodi enzimatici che consentono la determinazione della velocità di generazione dell'H₂O₂, uno dei prodotti della deaminazione ossidativa catalizzata dalle ammino ossidasi. Il perossido di idrogeno, prodotto dalla reazione, può essere determinato tramite diversi metodi, che in molti casi richiedono l'uso di perossidasi. In questo lavoro di tesi, ho utilizzato il metodo dell'ampless red accoppiato alla perossidasi da radice di rafano (Zhou M. et al., 1997). La perossidasi utilizza l'ampless red come donatore di elettroni durante la riduzione del perossido di idrogeno ad acqua. Il composto risultante dalla reazione, la resorufina, è un composto fluorescente che ha il massimo dello spettro di assorbimento a 563 nm ed il massimo dello spettro di emissione di fluorescenza a 588 nm. L'attività enzimatica è stata misurata con uno spettrofluorimetro (Varian CARY Eclipse), collegato ad un bagnetto termostato, che ha permesso di eseguire tutte le misure cinetiche ad una temperatura di 37 °C. Le membrane di adipociti solubilizzate in detergente, vengono incubate in bagnetto termostato a 37 °C per circa 20 minuti in

presenza di pargillina (inibitore delle MAO A e B) in concentrazione finale pari a 1 mM. Le misure di attività delle MAO sono state condotte, utilizzando tiramina 1 mM come substrato, dopo l'incubazione con semicarbazide (inibitore specifico e irreversibile delle SSAO) 0.5 mM. Il saggio di attività si esegue in cuvetta termostata (in volume finale pari a 800 μ l), contenente la perossidasi (in concentrazione finale di 0.5 μ M), l'Amplex red (in concentrazione finale di 0.125 mM) ed il substrato per SSAO/VAP-1 (Bza 3.3 mM, substrato standard per i saggi di attività ammino ossidasi). La cinetica inizia con l'aggiunta di SSAO/VAP-1 in cuvetta (le membrane di adipociti solubilizzate e i lisati cellulari). Dall'aumento di intensità di fluorescenza al minuto, corrispondente alla quantità di resorufina prodotta, viene calcolata la velocità di generazione dell' H_2O_2 , prodotta dalla deaminazione ossidativa dell'enzima, mediante retta di taratura. Nelle nostre condizioni sperimentali, si misura un ΔI_f (in unità arbitrarie) pari a 3.0 ± 0.2 ogni nM di H_2O_2 (n=6) a pH 7.2.

Un saggio standard di attività SSAO/VAP-1 viene eseguito alla temperatura di $T = 37^\circ\text{C}$, utilizzando una soluzione contenente Bza 3.3 mM, Mops 25 mM e NaCl 150 mM a pH 7.2.

2.2.4. MISURE DI ATTIVITA' IN FUNZIONE DEL PH.

Le misure cinetiche a diversi pH sono state eseguite utilizzando le seguenti soluzioni tampone, ottenute da diversi buffer scelti in base al loro pKa e all'intervallo di pH considerato. Sono stati usati il MES (pH 5.6–6.4), il MOPS (6.61–7.03), l'HEPES (7.20–7.70), l'EPDS (8.0–8.65), il borato di sodio (8.71–9.71) ed infine il carbonato di sodio (9.71–10.2). Tutti i tamponi avevano una concentrazione di 25 mM e contenevano NaCl 150 mM.

Ad ogni pH è stata eseguita anche la curva di calibrazione dell' H_2O_2 con il metodo dell'Amplex red accoppiato alla perossidasi, per tener conto dell'eventuale effetto del pH sulla resa di fluorescenza della resorufina.

2.2.5. MISURE DI ATTIVITA' IN FUNZIONE DELLA FORZA IONICA.

Durante il corso di questa tesi di dottorato sono stati calcolati i parametri cinetici, V_{\max} , V_{\max}/K_M e K_M per alcuni substrati in funzione della forza ionica e i dati sono stati analizzati e interpretati secondo la teoria di Debye e Hückel.

Secondo la teoria di Debye-Hückel l'equazione che descrive matematicamente la relazione tra forza ionica e velocità di reazione (Laidler and Bunting, 1973) è la seguente:

$$\log 10k = \log 10 k_0 + 2C_{Z_A Z_B} I^{1/2} \quad [2.1]$$

dove k indica il parametro cinetico considerato e C è una costante data da:

$$C = \frac{N^2 e^3 (2\pi)^{1/2}}{2.303(\epsilon_r RT)^{3/2} (1000)}$$

dove N è il numero di Avogadro, “ e ” la carica dell'elettrone; ϵ_r è la costante dielettrica, R la costante dei gas e T la temperatura.

A 25°C per una soluzione acquosa C è circa 0.51, e quindi l'equazione diventa:

$$\log 10k = \log 10k_0 + 1.02 Z_A Z_B I^{1/2} \quad [2.2]$$

2.2.6. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ SUPEROSSIDO DISMUTASI.

Le misure di attività della Cu, Zn superossido dismutasi nei campioni di plasma umano sono state condotte utilizzando il metodo polarografico delle correnti catalitiche (Rigo et al., 1975) in una micro cella fornita di un microelettrodo di platino come contro-elettrodo, un elettrodo a calomelano saturato (SCE) come elettrodo di riferimento ed un elettrodo a goccia di mercurio come elettrodo di lavoro.

Le misure di attività sono state eseguite iniettando direttamente pochi μ l di plasma in 700 μ l di soluzione di borato di sodio, pH 9.9, contenente 0.5mM di ossido di trifenilfosfina e 0.1 mM di EDTA, equilibrata con aria a 25 °C. Dalla media dell'intensità di corrente misurate a - 960mV (vs SCE) in presenza ed in assenza di plasma, è stata calcolata la concentrazione di superossido dismutasi circolante (EC-

SOD) nei campioni di plasma, utilizzando $k = 1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ come valore di costante cinetica per la dismutazione del superossido dalla SOD umana.

2.2.7. ELETTROFORESI DI PROTEINE (SDS-PAGE).

La composizione proteica dei campioni di adipociti incubati con diversi fattori e successivamente lisati è stata analizzata mediante elettroforesi denaturante, SDS-PAGE, secondo il metodo Laemmli (Laemmli U.K, 1970). Il gel separatore (running gel) è stato preparato in gradiente di acrilamide 7-12% e 8-16% (w/v) (acrilamide/bis-acrilammide= 30/0.8%), mentre il gel di pre-corsa (stacking gel) è al 4.5% di acrilammide (w/v).

Il tampone del gel separatore contiene Tris-HCl 0.375 M a pH 8.8, mentre il tampone del gel di pre-corsa contiene Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8. I campioni sono stati solubilizzati in Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% (w/v), β -mercaptoetanololo 5% e urea 8 M, a 100 C° per 50 secondi. Al termine sono stati appesantiti con glicerolo concentrato (80%) contenente blu di bromofenolo. Il tampone utilizzato per la corsa elettroforetica contiene: Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M e SDS 0.1% (w/v) a pH 8.3. I gel ottenuti dalla corsa elettroforetica sono stati fissati in una soluzione di metanolo: acqua: acido acetico = 5:5:1 (v/v/v), contenente il 10 % (w/v) di acido tricloroacetico e quindi sono stati colorati con 0.25 % di Comassie Brilliant Blue R-250 in metanolo: acqua: acido acetico. Le bande proteiche appaiono evidenti dopo decolorazione dei gel in 10% di acido acetico.

Le proteine utilizzate come standard di peso molecolare sono: lactoalbumina (14.2 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa), gliceraldeide fosfodeidrogenasi (36 kDa), albumina di uovo (45 kDa), albumina di siero bovino (66 kDa), fosforilasi b (97 kDa) e β -galattosidasi (116 kDa).

2.2.8. PROCEDURA DI WESTERN BLOT E IMMUNORIVELAZIONE.

Dopo la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su un supporto di nitrocellulosa con porosità di 0,45 μm , utilizzando la tecnica del Western Blotting Il tampone di trasferimento da Towbin et al. (1979) contiene: Tris 50 mM, Glicina 380 mM, SDS 0.1% (w/v) e Metanolo 20% (v/v) (Towbin et al., 1979). Terminato il

trasferimento, la membrana è stata colorata con una soluzione al 2% di Rosso Ponceau in 3% di acido tricloroacetico. Per verificare l'efficienza del trasferimento delle proteine, il gel di poliacrilammide residuo è stato colorato con Comassie Brilliant Blue R-250. La membrana di nitrocellulosa sulla quale sono state trasferite le proteine viene decolorata con acqua distillata, ed è posta a saturare in PBS e 3% di BSA per circa 2 ore. La membrana viene quindi incubata per circa 2 ore sotto agitazione con l'anticorpo primario (anti-BSAO) diluito 1/250 in PBS e 3% di BSA. Al termine dell'incubazione, si eseguono 2 lavaggi da circa 10 minuti ciascuno in PBS e 3% di BSA. La membrana viene quindi incubata con l'anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina (anti-rabbit) per circa 2 ore. Dopo i 2 lavaggi da circa 10 minuti ciascuno in TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 allo 0.1%, pH 7.5), si procede allo "sviluppo" della membrana con il 5-Bromo-4-Cloro-3-indolilfosfato/ Nitroblue di tetrazolio (BCIP/NBT, fornito dalla ditta Calbiochem). La reazione viene condotta al buio e dopo alcuni minuti, alla comparsa della banda colorata viene bloccata con acqua fredda.

2.2.9. PREPARAZIONE DELL'ANTICORPO PER L'AMMINO OSSIDASI UMANA VAP-1.

Poichè l'ammino ossidasi da siero bovino (BSAO) presenta l'82% di sequenza di omologia con l'enzima umano, si è pensato di preparare un anticorpo per l'enzima umano, servendosi dell'enzima da siero bovino purificato precedentemente nel laboratorio dove ho svolto il periodo di dottorato. Con la collaborazione del prof. Oriano Marin, si è immunizzato un coniglio femmina bianca fornita dalla ditta Charles River con la BSAO purificata. L'immunizzazione è stata fatta con 0.5 mg di BSAO in 2 ml di PBS a cui sono stati aggiunti 2ml di adiuvante di Freund completo. Sono stati effettuati 3 richiami dell'immunizzazione seguendo la stessa procedura, ad ogni richiamo è stato effettuato un prelievo di sangue dal coniglio per verificare l'efficacia dell'immunizzazione. Il sangue prelevato è stato tenuto a 37 °C per 15-20 minuti per facilitare la coagulazione, poi è stato conservato a 4-5 °C per 2 ore ed è stato quindi centrifugato a 1200 xg per separare il siero dai globuli rossi che si coagulano sul fondo della provetta. Il siero è stato poi congelato a -20 °C.

2.2.10. DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ DI PROTEINA SSAO/VAP-1 NEL PLASMA UMANO.

La determinazione quantitativa della forma solubile della proteina VAP-1 nel plasma umano, è stata effettuata utilizzando il kit Human sVAP-1 ELISA BMS259, fornito dalla ditta Bender MedSystems GmbH (Austria).

2.2.11. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA.

Un metodo rapido per valutare la concentrazione proteica è costituito dal saggio colorimetrico di Bradford (Bradford, M.M. 1976). Esso si basa sull'osservazione che una soluzione acida di Coomassie Brilliant Blue G-250 subisce uno spostamento del massimo di assorbanza da 465 nm a 595 nm quando il colorante lega materiale proteico.

Questo metodo prevede l'utilizzo di una retta di taratura, ottenuta utilizzando come standard una soluzione di albumina da siero bovino (B.S.A., bovine serum albumin 0.25mg/ml stock) a concentrazione nota (da spettro di assorbanza). La concentrazione di proteine del campione viene calcolata misurandone l'assorbanza a 595 nm, ed utilizzando la retta di taratura (es. figura 2.1).

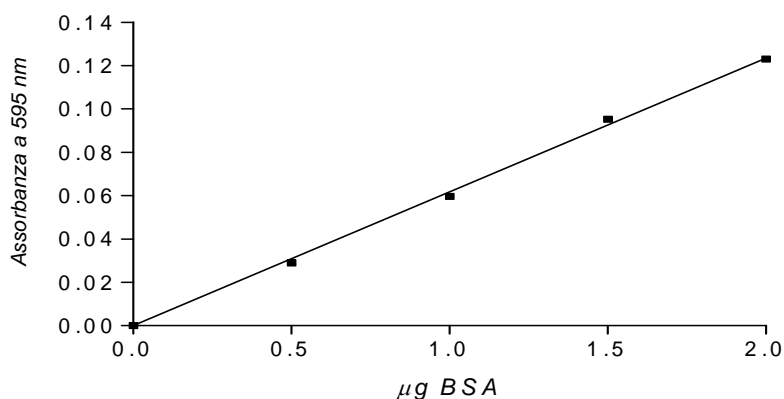


Figura 2.1. Retta di taratura per un saggio di Bradford. In ascissa i µg di BSA presenti in 1ml di soluzione.

2.2.12. ANALISI DEI DATI.

Le analisi statistiche e dei “best fitting” è stata eseguita utilizzando il programma Sigma Plot 9.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA. U.S.A).

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. AMMINO OSSIDASI UMANA SENSIBILE ALLA SEMICARBAZIDE (SSAO/VAP-1): CARATTERIZZAZIONE CINETICA.

3.1.1. POTENZIALI SUBSTRATI UTILIZZATI COME “SONDE” PER LO STUDIO DEL SITO ATTIVO DI SSAO/VAP-1.

Per poter individuare le caratteristiche chimico-fisiche di potenziali substrati fisiologici e per progettare nuovi inibitori specifici della SSAO/VAP-1 umana, è fondamentale conoscere quali sono le interazioni che controllano il riconoscimento fra substrato/inibitore ed il sito attivo dell'enzima. Per raggiungere questo obiettivo sono stati condotti degli studi cinetici utilizzando substrati con diversa struttura e distribuzione di carica come sonde del sito attivo dell'enzima. E' stato inoltre studiato l'effetto del pH e della forza ionica sui parametri cinetici di alcuni substrati con lo scopo di individuare se esistono residui titolabili e/o carichi che controllano la fase di riconoscimento fra sito attivo e substrato. Per condurre questo studio come enzima di origine umana, si è utilizzato quello contenuto nelle membrane plasmatiche di adipociti umani opportunamente solubilizzate. La scelta del detergente da utilizzare per la solubilizzazione delle membrane e la sua concentrazione si è basata sul valore di attività specifica ottenuta da prove di solubilizzazione condotte sul “pellet” delle membrane di adipocita, preparate come riportato nel capitolo MATERIALI E METODI, utilizzando diverse tipologie di detergenti non denaturanti. Le prove di solubilizzazione sono state condotte sia a 4 °C che a 25 °C. Le membrane sono state risospese per tempi variabili da 5 a 20 minuti. Al termine di questo tempo, i campioni sono stati centrifugati a circa 13000 x g per 7 minuti. Sono stati quindi eseguiti l'attività e il dosaggio delle proteine del campione, prima della centrifugazione e del surnatante ottenuto dopo la centrifugazione. I risultati sono riportati in tabella 3.1.

Dalla tabella 3.1 si può vedere che l'octil- β -D-glucopiranoside è risultato il migliore detergente tra i vari testati, in quanto ha permesso di ottenere delle

preparazioni grezze di enzima con un valore di attività specifica maggiore rispetto a quella ottenuta con altri tipi di detergenti.

Tabella n. 3.1. Detergenti utilizzati per le prove di solubilizzazione delle membrane di adipociti.

TIPO DI DETERGENTE	CONCENTRAZIONE DEL DETERGENTE NELLA SOLUBILIZZAZIONE	ATTIVITA' SPECIFICA (nmoli H₂O₂/min x mg proteine)
SALI BILIARI: ACIDO DE OSSICOLICO (CMC=4-5 mM)	10mM	55.5
TRITON X-100 (POLIOSSIETILENE) (CMC=0.3 mM)	1.28 mM 1.6 mM 16 mM	40 34 34
TWEEN 20 (CMC=0.06 mM)	0.8 mM	23
OCTIL- β -D-GLUCOPIRANOSIDE (CMC=25 mM)	50 mM	103
DODECIL-β-D-MALTOSIDE (CMC=19 mM)	19 mM	52

CMC= CONCENTRAZIONE MICELLARE CRITICA.

3.1.1.A. DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI CINETICI DELLA SSAO/VAP-1 IN CONDIZIONI DI STATO STAZIONARIO. EFFETTO DI INIBIZIONE DA SUBSTRATO.

Preliminare allo studio dell'effetto della struttura del substrato sul valore dei parametri cinetici (costante catalitica, k_{cat} , costante di affinità K_M ed efficienza catalitica k_{cat}/K_M) della SSAO/VAP-1 è stata la scelta del modello cinetico da utilizzare per determinare questi parametri. Tipicamente sono state eseguite delle misure di velocità iniziale in condizioni di stato stazionario a diverse concentrazioni dei vari substrati per costruire così i classici grafici di velocità in funzione della concentrazione di substrato. Come riportato da Holt A. et al 2007, i risultati ottenuti hanno evidenziato che la SSAO/VAP-1 umana non sempre segue la classica cinetica di Michaelis e Menten

(curva di tipo iperbolico $v = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{K_M + [S]}$ figura 3.1.) [3.1]

ma, a seconda del tipo di substrato si può osservare un effetto di inibizione da "S": ad alte concentrazioni di "S" si osserva una diminuzione della velocità come riportato in

figura 3.2. In questo caso l'equazione che consente di determinare V_{\max} ($V_{\max}=k_{\text{cat}} \cdot [E]$) e K_M è la seguente

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(\frac{1}{1 + \frac{\beta[S]}{K_i}} \right) + [S] \left(\frac{1 + \frac{[S]}{K_i}}{1 + \frac{\beta[S]}{K_i}} \right)} \quad [3.2]$$

Dove i parametri β e K_i sono rispettivamente il fattore correttivo della costante catalitica ad alte concentrazioni di substrato e la costante di dissociazione fra il substrato $[S]$ ed il complesso enzima-substrato (intermedio di reazione).

In questo lavoro, sono state utilizzate l'equazione di Michaelis e Menten [3.1] e quella che tiene conto dell'effetto di inibizione da substrato [3.2] a seconda dei grafici ottenuti dai dati sperimentali.

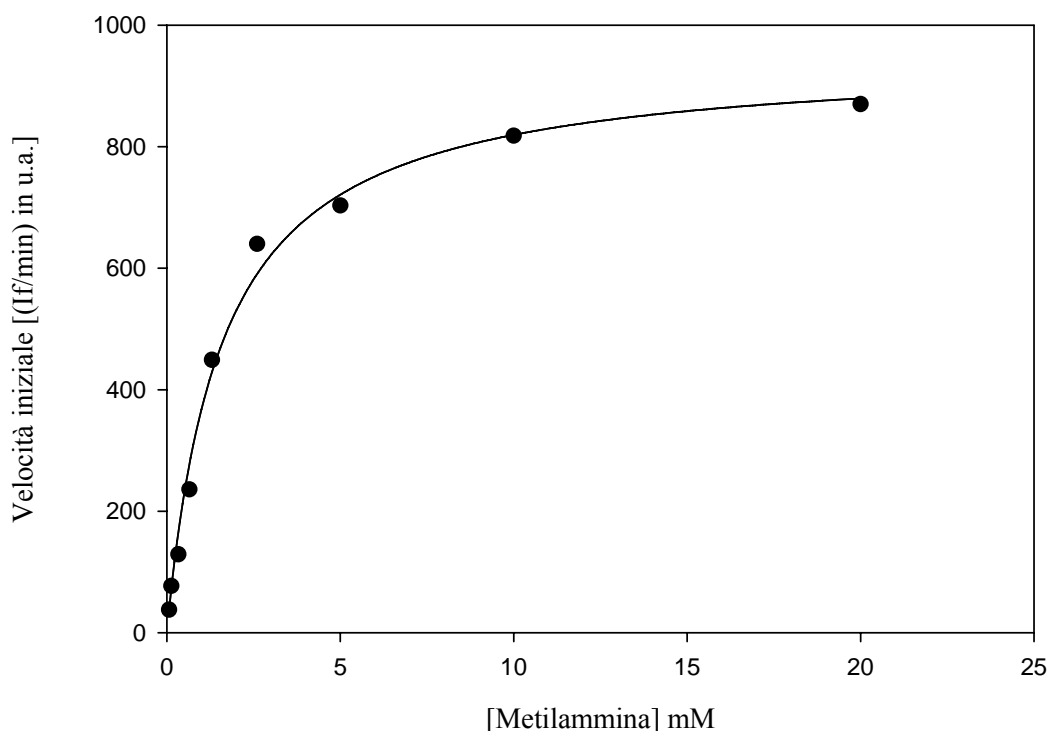


Figura 3.1. Velocità iniziale di ossidazione della metilammina da parte della SSAO/VAP-1. I dati sono stati analizzati mediante l'equazione [3.1] di Michaelis e Menten.

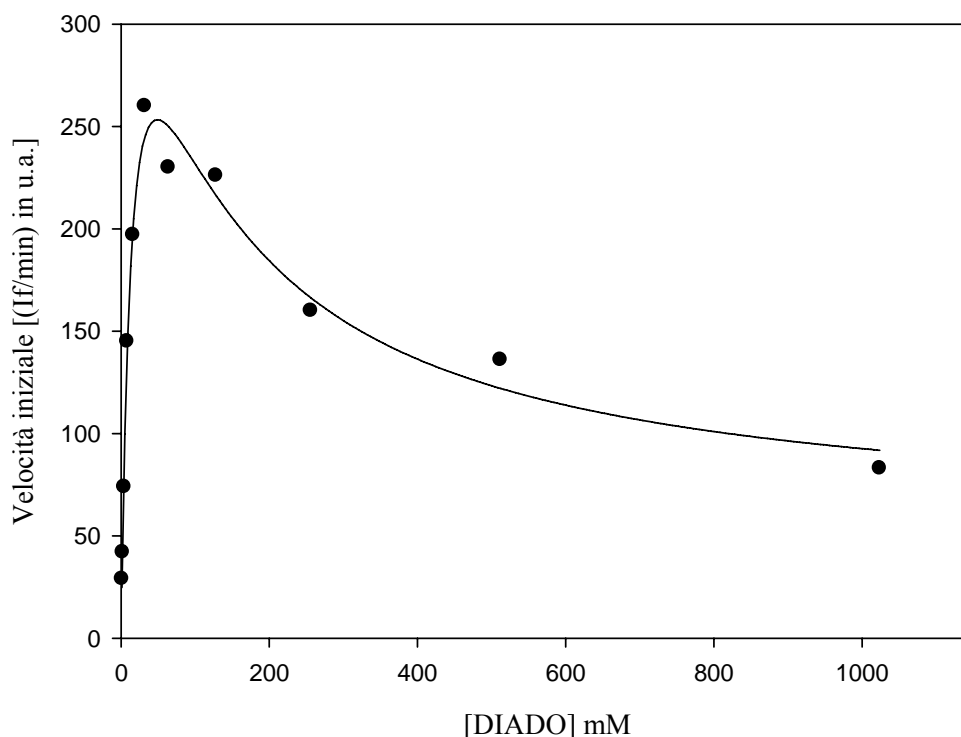


Figura 3.2. Velocità iniziale di ossidazione dell' 1-12 diamminododecane da parte della SSAO/VAP-1. La curva rappresenta l'effetto di inibizione da substrato secondo l'equazione [3.2].

3.1.1.B. N-ALCHILAMMINE COME SUBSTRATI PER SSAO/VAP-1: DIPENDENZA DI PARAMETRI CINETICI DALLA LUNGHEZZA DELLA CATENA (MONOAMMINE E DIAMMINE ALIFATICHE).

Inizialmente, come substrati “sonda”, sono stati utilizzati semplici monoammine e diammine primarie caratterizzate da una diversa lunghezza della catena alifatica. I grafici in figura 3.3.A e 3.3.B mostrano la dipendenza del $\ln V_{\max}/K_M$ (3.3.A) e di V_{\max} (3.3.B) dalla lunghezza della catena (da 4 a 12 atomi di carbonio) in condizioni fisiologiche ($T=37^\circ\text{C}$ e $\text{pH}= 7.2$). Dalla figura 3.3.A è evidente che V_{\max}/K_M aumenta aumentando la lunghezza della catena alifatica del substrato in particolare nel caso delle diammine (pendenza=1.56) rispetto alle monoammine (pendenza=0.67). E' inoltre evidente come la V_{\max} (figura 3.3.B) sia molto meno sensibile alla lunghezza della catena alifatica rispetto a V_{\max}/K_M e quindi anche dall'affinità dell'enzima per i diversi substrati: V_{\max} varia di un fattore 2-3 nel caso delle monoammine e di un fattore 5 nel caso delle diammine, mentre la K_M varia di ordini di grandezza, in particolare nel caso delle diammine (ad esempio: da 21.2 mM per l'1-8 diammino-ottano a 2.13 μM nel caso

dell'1-12 diamminododecano). E' inoltre evidente dalla figura 3.3.A, che la presenza di una seconda carica positiva in coda al substrato ad una distanza inferiore a 10-12 Å impedisce l'interazione del substrato con il sito attivo dell'enzima. Dalle pendenze dei grafici in figura 3.3.A è stato possibile calcolare il contributo di un gruppo metilenico (-CH₂) all'energia libera di legame del substrato (energia libera incrementale di Gibbs), applicando l'equazione:

$$\Delta\Delta G_b = -RT \ln \left[\frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{R-S}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{H-S}} \right] \quad [3.3]$$

dove $\left(\frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{R-S}$ è l'efficienza catalitica di un substrato in cui un atomo di idrogeno (H) del substrato (S-H) è stato sostituito da un gruppo R. Il substrato preso come riferimento

(S-H) è caratterizzato da un'efficienza catalitica rappresentata da $\left(\frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{H-S}$ (Fersht,

1985). Il contributo di energia di legame di un'unità metilenica calcolato mediante questo tipo di analisi è pari a $\Delta G_{CH_2} = -0.47$ kcal/mol. Questo valore risulta meno negativo di quello calcolato con lo stesso gruppo di substrati alifatici per l'ammino ossidasi da plasma bovino (Di Paolo M.L. et al., 2007). Nel caso dell'enzima bovino dal contributo di $\Delta G = -0.68$ kcal/mol è stato possibile stimare una costante dielettrica, ($\epsilon_R \approx 10$) per il sito attivo di questa SSAO, in quanto questo valore di -0.68 Kcal/mol è molto simile a quello dell'energia libera di ripartizione di un gruppo metilene da n-ottanolo ad acqua. (Fersth, 1985). Inoltre, la validità di questo tipo di approccio cinetico nella stima della costante dielettrica del sito attivo della SSAO bovina era stato confermato mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti immobilizzate al cofattore TPQ nel sito attivo dell'enzima bovino, sensibili alla costante dielettrica del mezzo. Il $\Delta G = -0.47$ kcal/mol calcolato per la SSAO/VAP-1 umana suggerisce che il sito attivo di questo enzima sia più "polare" di quello bovino ed abbia cioè una $\epsilon_R > 10$.

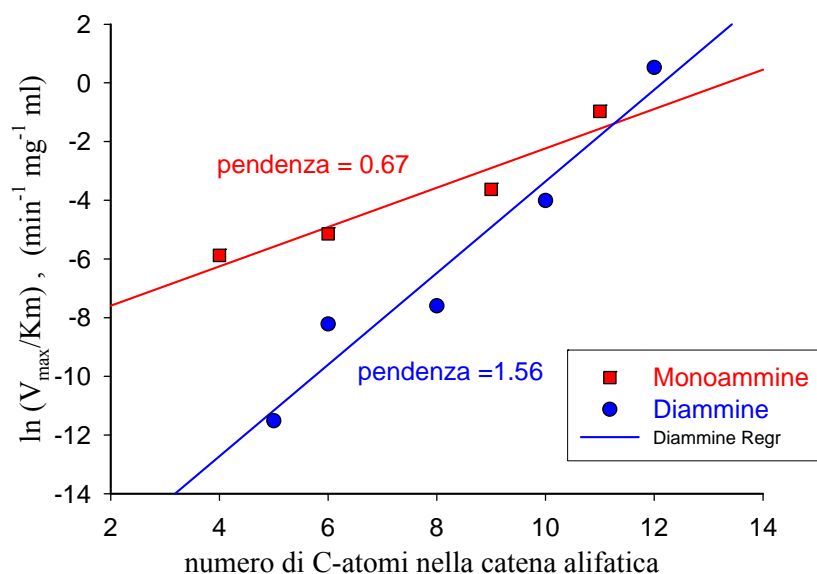


Figura 3.3.A. Valori del $\ln(V_{\max}/K_m)$ in funzione del numero di CH_2 nella catena alifatica.

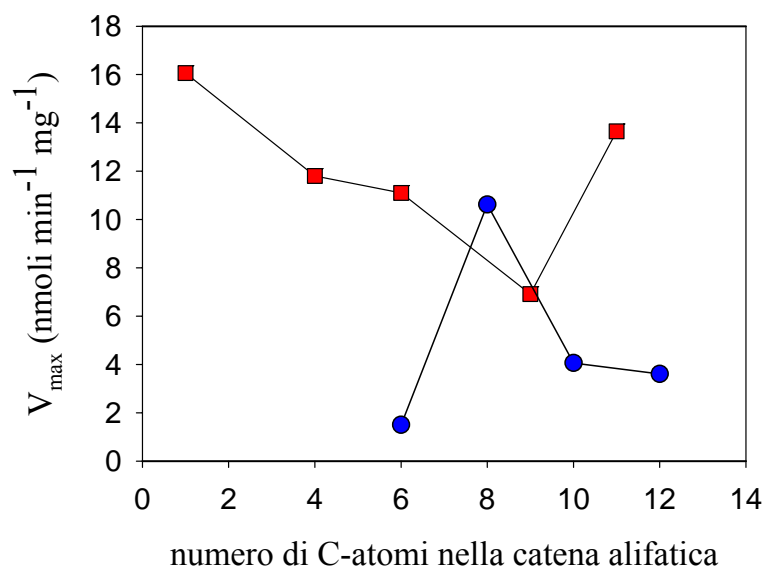


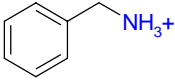
Figura 3.3.B. Valori di V_{\max} in funzione della lunghezza della catena alifatica del substrato: Monoammine (■) e Diammine (●).

3.1.1.C. EFFETTO DEI SOSTITUENTI SULL'ATTIVITÀ DELLA SSAO/VAP-1 NEL CASO DI SUBSTRATI CON UNA CATENA ALIFATICA "CORTA".

In tabella 3.2 si può osservare la dipendenza dei parametri cinetici della SSAO/VAP-1 dai sostituenti nel caso dell'1-amminobutano (una monoammina alifatica corta). Come confronto sono riportati i parametri cinetici anche della metilammina (substrato fisiologico). La presenza di un gruppo con caratteristiche polari (OH,

NHCOCH₃), come nel caso del 4-ammino-1-butanolo e dell’N-acetil-putrescina o la presenza di un gruppo carico (NH³⁺ o COO⁻), come nel caso della putrescina e dell’acido γ -amminobutirrico, sfavorisce l’affinità di tali substrati per il sito attivo dell’enzima. Un caso particolare è rappresentato dal composto cis-4-cloro-2 butenilammina, che in condizioni di pH fisiologico, ha un’affinità ed un’efficienza catalitica più elevata rispetto alla metilammina e simile a quella della benzilammina, il substrato che generalmente è utilizzato come standard e substrato di riferimento (non fisiologico) nei saggi di attività enzimatica per SSAO/VAP-1 e per tutte le SSAO in generale.

Tabella 3.2. Effetto del sostituyente sui parametri cinetici di SSAO/VAP-1 nel caso di substrati con catena alifatica “corta”.

<i>SUBSTRATI</i>	<i>Km (mM)</i>	<i>V_{max}</i> <i>[nmoli min⁻¹ mg⁻¹]</i>	<i>V_{max} /Km</i> <i>[min⁻¹ ml g⁻¹]</i>
CH ₃ -NH ₃ ⁺ <i>Metilammina</i>	1.74 ± 0.73	16.06	9.2
CH ₃ (CH ₂) ₃ NH ₃ ⁺ <i>1-amminobutano</i>	4.21 ± 0.08	11.8	2.8
Cl- CH ₂ CH=CHCH ₂ NH ₃ ⁺ <i>Cis-4-Cl-2 butenilammina</i>	0.21 ± 5*10 ⁻⁵	8.6	40.9
COOH-(CH ₂) ₃ NH ₃ ⁺ <i>Acido-γ amminobutirrico</i>	> 100	n.d.	< 10 ⁻²
NH ₃ ⁺ (CH ₂) ₄ NH ₃ ⁺ <i>Putrescina</i>	n.d. (molto alta)	n.d.	< 10 ⁻²
CH ₃ CONH(CH ₂) ₄ NH ₃ ⁺ <i>N-acetil-putrescina</i>	> 100	n.d.	7.18*10 ⁻²
OH-(CH ₂) ₄ NH ₃ ⁺ <i>4-ammino-1- butanolo</i>	19 ± 23*10 ⁻⁵	1.57	8.27*10 ⁻²
 <i>Benzilammina</i>	0.275 ± 5.8*10 ⁻⁵	10.4	37.8

(n.d.= non determinabile)

3.1.1.D. EFFETTO DEI SOSTITUENTI SULL'ATTIVITÀ DELLA SSAO/VAP-1 NEL CASO DI SUBSTRATI CON CATENA ALIFATICA "LUNGA".

In tabella 3.3, è riportata la dipendenza dei parametri cinetici di SSAO/VAP-1 dai sostituenti nel caso dell'1-amminononano (una monoammina alifatica lunga). La presenza di una seconda carica positiva ad una distanza più piccola di 10-12 Å dal gruppo amminico reattivo diminuisce l'affinità e l'efficienza catalitica di tali substrati per l'enzima, come già evidenziato in figura 3.3.A. Fra le diammine alifatiche testate, il substrato avente la più alta affinità per SSAO/VAP-1 e la più elevata efficienza catalitica è l'1,12 diamminododecano come riportato in tabella 3.3. Considerando l'effetto di sostituenti nell'1,12 diamminododecano, la presenza di ulteriori gruppi amminici all'interno della catena alifatica, come nel caso delle poliammine, spermina e spermidina, oppure la presenza di un gruppo polare(O⁻) come nel caso del 4,9 dioxo-1,12 diamminododecano sfavorisce le interazioni con il sito attivo dell'enzima come riportato in tabella 3.3.

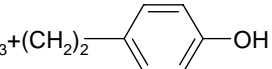
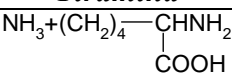
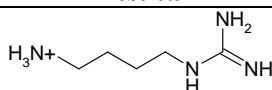
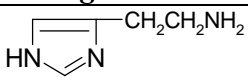
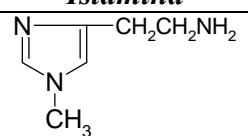
Tabella 3.3. Effetto del sostituente sui parametri cinetici di SSAO/VAP-1 nel caso di substrati con catena alifatica "lunga".

<i>SUBSTRATI</i>	<i>K_m (mM)</i>	<i>V_{max}</i> <i>[nmoli min⁻¹ mg⁻¹]</i>	<i>V_{max}/K_m</i> <i>[min⁻¹ ml g⁻¹]</i>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{NH}_3^+$ <i>1-amminononano</i>	$0.26 \pm 4 \cdot 10^{-4}$	6.91	26.6
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_8\text{NH}_3^+$ <i>1,8-diammino-ottano</i>	21.2 ± 3	10.62	0.5
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{12}\text{NH}_3^+$ <i>1,10-diamminododecano</i>	$0.22 \pm 4.3 \cdot 10^{-2}$	4.06	18.2
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_{12}\text{NH}_3^+$ <i>1,12-diamminododecano</i>	$2.13 \cdot 10^{-3}$ \pm $4.3 \cdot 10^{-4}$	3.61	1690
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$ <i>4,9-dioxa-1,12-diamminododecano</i>	6.1	21.81	3.57
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}^+(\text{CH}_2)_4\text{NH}^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$ <i>Spermina</i>	n.d (alta)	n.d.	Molto bassa
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}^+(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ <i>Spermidina</i>	n.d. (>50)	n.d.	Molto bassa

3.1.1.E. POTENZIALI SUBSTRATI FISIOLGICI PER SSAO/VAP-1.

Oltre alle monoammine e diammine alifatiche ed alla spermina e spermidina, sono state provate come potenziali substrati della SSAO/VAP-1 anche numerose ammine primarie fisiologiche, fra le quali tiramina, acido γ amminobutirrico, istamina, 1-metil-istamina, agmatina e la maggior parte degli amminoacidi tra cui la lisina (tabella 3.4). Per l'adrenalina, la noradrenalina e la dopamina, non sono disponibili dei dati, in quanto queste ammine interferiscono con il saggio enzimatico utilizzato per le misure cinetiche della SSAO/VAP-1. Le misure cinetiche con i vari substrati sono state eseguite in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0.1 – 10 mM, utilizzando come substrato di riferimento la benzilammina (alla concentrazione 3.3 mM, concentrazione alla quale si osserva la maggiore attività enzimatica). Come riportato in tabella 3.4, queste ammine, presentano un'attività molto più bassa di quella misurata con la benzilammina. Un'attività quasi nulla o trascurabile si è misurata utilizzando, oltre alla lisina, anche gli altri amminoacidi come potenziali substrati per SSAO/VAP-1. Inoltre si è osservato che Triptofano e Tirosina si comportano come “deboli” inibitori di tipo non competitivo per VAP-1 (K_i di 17mM per il Triptofano e K_i di 11mM per la Tirosina).

Tabella 3.4. Potenziali substrati fisiologici per SSAO/VAP-1.

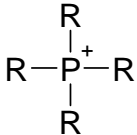
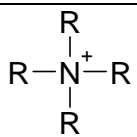
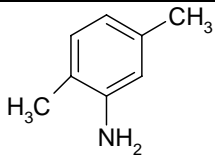
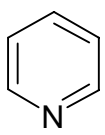
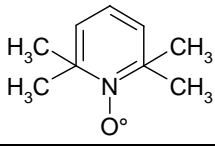
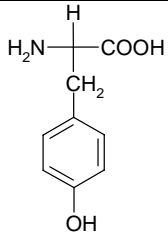
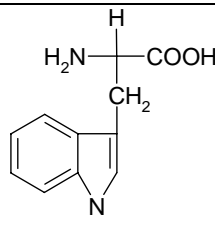
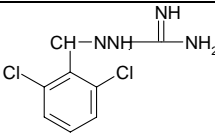
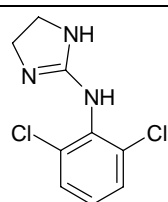
<i>SUBSTRATO (1-10 mM)</i>	<i>Attività % rispetto a BZA (3.3mM)</i>
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$ <i>Spermina</i>	11
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ <i>Spermidina</i>	7.8
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ <i>Etanolamina</i>	5.2
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ <i>Acido γ-aminobutirrico</i>	7.5
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_2$ —  <i>Tiramina</i>	9
$\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_4$ —  <i>Lisina</i>	4.2
 <i>Agmatina</i>	4
 <i>Istamina</i>	5
 <i>1-metil istamina</i>	6.5

3.1.2. POTENZIALI INIBITORI PER SSAO/VAP-1.

Lo studio di nuovi specifici inibitori per SSAO/VAP-1 rappresenta un importante target per lo sviluppo di nuovi farmaci antiinfiammatori, in quanto questo enzima è coinvolto nel meccanismo dell'infiammazione, associato a diverse patologie. A tal fine, si è cercato quindi di individuare molecole, non derivati idrazinici, in grado di agire come inibitori efficaci per SSAO/VAP-1, utilizzando la benzilamina e il diamminododecano come substrati; due substrati, il primo aromatico e l'altro avente una catena lineare a 12 atomi di carbonio che interagiscono coinvolgendo zone diverse del sito attivo. Sono state provate diverse tipologie di composti come potenziali inibitori, tra cui i sali di ammonio e di fosfonio, i derivati dell'anilina e della piridina, in quanto questi composti sono inibitori dell'enzima bovino. Fra i sali di fosfonio, il

propil-trifenilfosfonio è risultato l'inibitore più efficace ($K_i=3.5$ mM), in particolare utilizzando il diamminododecano come substrato. Fra i derivati della piperidina, gli N-ossidi, utilizzati normalmente come "spin labels", il "4-ammino-tempo"(4-ammino 2,2,6,6 tetrametilpiperidina 1-oxil) ed il "Tempo"(2,2,6,6 tetrametilpiperidina 1-oxil), si sono dimostrati essere degli inibitori reversibili di tipo competitivo, in particolare utilizzando la benzilammina come substrato (con $K_i=2.3$ mM). Il composto con migliore inibizione è il guanabenz ($K_i=11\mu$ M), come finora riportato in letteratura (Holt et al., 2008) in particolare con la benzilammina. I saggi condotti con le varie categorie di composti riportati in tabella 3.5, non hanno purtroppo permesso di trovare degli inibitori efficaci per SSAO/VAP-1, in quanto tutti i composti provati hanno dei valori di costante di inibizione alti (dell'ordine del mM). I risultati di queste prove hanno comunque fornito informazioni sulla tipologia di struttura che un potenziale inibitore di questo enzima potrebbe avere.

Tabella 3.5. Potenziali inibitori per SSAO/VAP-1.

CATEGORIE DI COMPOSTI	FORMULA	COMPOSTO CON > EFFETTO INIBITORIO	COSTANTE DI INIBIZIONE (mM)
R=CH ₃ →C ₆ H ₅ - Sali di Fosfonio		(C ₆ H ₅) ₃ P ⁺ (CH ₂) ₂ CH ₃ Propil-trifenilfosfonio	K _i (Diado) = 3.5 mM
R=CH ₃ →CH ₃ (CH ₂) ₁₁ - Sali di Ammonio		(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ CH ₂ OH Colina	K _i > 20 mM
Derivati dell'Anilina		2,5-Dimetil-anilina	K _i (Bza) = 10 mM K _i (Diado) = 2.2 mM
Piridina		Non inibisce	===
Derivati della Piperidina: N-Ossidi		“Tempo” (2,2,6,6 Tetrametilpiperidina 1-oxil)	K _i (Bza) = 2.3 mM K _i (Diado) = 4.8 mM
Tirosina		===	K _i (Bza) = 11 mM
Triptofano		===	K _i (Bza) = 17 mM K _i (Diado) > 10 mM
Guanabenz		===	K _i = 11 μM (Holt A. et al., 2008)
Clonidina		===	K _i = 2mM (Holt A. et al., 2008)

3.1.3. DIPENDENZA DAL pH DEI PARAMETRI CINETICI DI SSAO/VAP-1 PER LA METILAMMINA.

In figura 3.4.A e 3.4.B è riportata la dipendenza di V_{\max} e di V_{\max}/K_M dal pH per la metilammina. Come si può vedere dalla figura 3.4.A, i valori di V_{\max} in funzione del pH delineano un profilo a “campana” non simmetrica ed i valori massimi di V_{\max} si ottengono attorno a pH 7.2/7.4. Questo profilo della curva di V_{\max} in funzione del pH, suggerisce la presenza di due gruppi la protonazione dei quali avrebbe un ruolo chiave nel processo catalitico: un gruppo deprotonandosi favorisce il processo catalitico (parte ascendente del profilo a campana), mentre un altro gruppo lo sfavorisce deprotonandosi (parte discendente del profilo). I valori dei pKa di questi due gruppi (pK_{a1} e pK_{a2}) sono stati calcolati (mediante regressione non lineare dei dati sperimentali), applicando l’equazione di Tipton e Dixon (1979) modificata secondo Koudelka (1985):

$$k_c = k_{c^0} \left(\frac{1 + \alpha \cdot 10^{(pH-pK_{a1})} + \beta \cdot 10^{(pK_{a2}-pH)}}{1 + 10^{(pH-pK_{a1})} + 10^{(pK_{a2}-pH)}} \right) \quad [3.4]$$

dove k_{c^0} è la costante catalitica indipendente dal pH, ed i coefficienti α e β tengono conto dell’attività residua non nulla a bassi ed alti valori di pH rispettivamente. I valori di pKa ottenuti dal “best fitting” sono $pK_{a1} 7.0 \pm 0.2$ (prima parte della curva), ed un valore di pK_{a2} di 7.8 ± 0.2 (seconda parte della curva). Rappresentando in grafico il log di V_{\max}/K_M verso il pH si può osservare in figura 3.4.B che l’efficienza catalitica aumenta nell’intervallo di pH tra 6 e 10 di un ordine di grandezza per ogni unità di pH. Tale andamento lineare probabilmente è dovuto alla presenza di un residuo con un alto valore di pKa nel sito attivo dell’enzima, che nella sua forma protonata sfavorisce l’interazione del substrato con l’enzima.

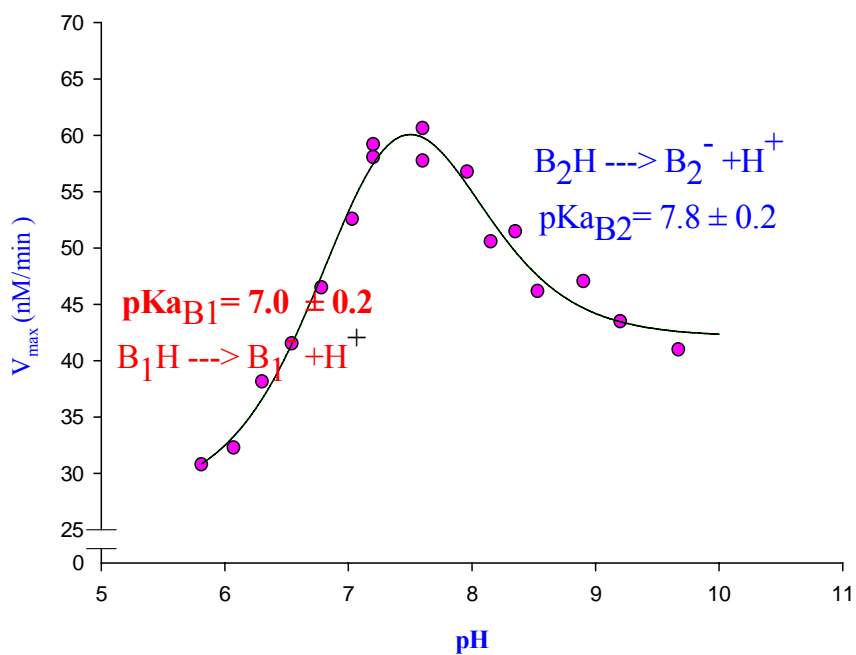


Figura 3.4.A. Dipendenza dei valori di V_{max} dal pH per la Metilamina.

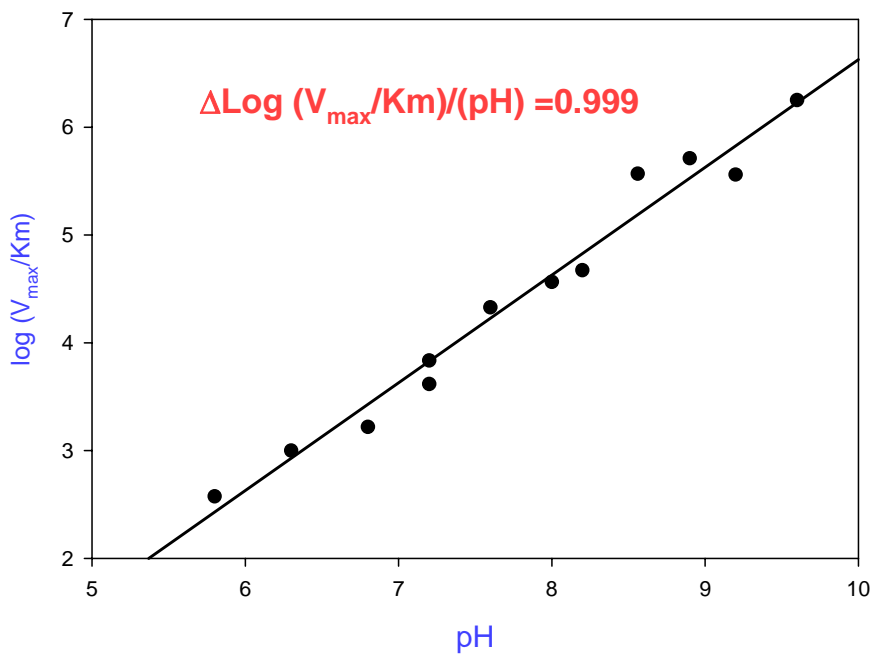


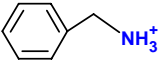
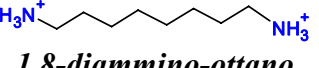
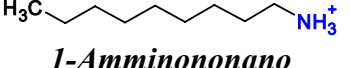
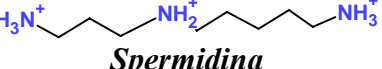
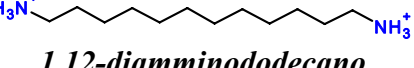
Figura 3.4.B. Dipendenza dei valori di $\log(V_{max}/K_m)$ della SSAO/VAP-1 dal pH usando come substrato la metilamina.

3.1.4. EFFETTO DEL PH SULL’AFFINITÀ DI SSAO/VAP-1 PER ALCUNI SUBSTRATI E CONFRONTO CON L’ENZIMA BOVINO (BSAO).

L’effetto del pH sull’affinità di SSAO/VAP-1 è stato valutato utilizzando anche altri substrati oltre alla metilammina (tabella 3.6) Per tutti i substrati provati è stato osservato un aumento di affinità dell’enzima di almeno un ordine di grandezza per ogni unità di pH passando da condizioni di pH fisiologico a pH 9.2.

Confrontando a pH fisiologico i valori di K_M dell’enzima umano con quelli ottenuti per l’enzima bovino, che presenta l’82% di identità di sequenza con l’enzima umano, si osserva che quest’ultimo presenta più alta affinità rispetto all’enzima bovino solo per substrati aventi una catena alifatica corta, mentre l’enzima bovino ha più alta affinità per i “substrati lunghi” e per le poliammine. Questo risultato suggerisce la presenza di residui diversi fra i due enzimi, posizionati lungo il canale e distanti dal TPQ, che abbiano un ruolo importante nel determinare la diversa specificità di substrato.

Tabella 3.6. Effetto del PH sull’affinità di SSAO/VAP-1 per alcuni substrati e confronto con l’enzima bovino (BSAO).

SUBSTRATI	<i>K_m</i> (mM)		
	<i>BSAO</i> (pH 7.2)	<i>VAP</i> (pH 7.2)	<i>VAP</i> (pH 9.2)
	 Benzilammina	1.5	$0.27 \pm 5.8 \cdot 10^{-2}$
$H_3C-NH_3^+$ Metilammina	7.5	1.74 ± 0.73	$24 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-3}$
 1,8-diammino-ottano	$8.7 \cdot 10^{-3}$	21.2 ± 3	$3.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$
 1-Amminononano	$0.4 \cdot 10^{-3}$	$0.26 \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$65 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-2}$
 Spermidina	0.225	> 50	0.9 ± 0.3
 1,12-diamminododecano	$< 0.2 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.4 \cdot 10^{-3}$	$< 0.2 \cdot 10^{-3}$

3.1.5. DIPENDENZA DELL'EFFICIENZA CATALITICA DALLA FORZA IONICA.

La dipendenza di V_{max}/K_M dalla forza ionica (I) è stata studiata nell'intervallo di $I=20-150\text{mM}$ a pH 7.2 e temperatura di 37°C , utilizzando come substrati metilammina, benzilammina e diamminododecano. I dati cinetici sono stati analizzati in accordo con l'equazione di Debye Huckel, come descritto nel capitolo MATERIALI E METODI:

$$\text{Log } k = \text{Log } k_0 + 2 C z_A z_B I^{1/2} \quad [3.5]$$

dove k è la k_{cat} oppure k_{cat}/K_M , z_A e z_B sono le cariche delle specie coinvolte nella formazione del complesso enzima-substrato, k_0 è il valore della costante di velocità cinetica a $I=0$. Il valore della costante C è pari a 0.523 in acqua a 37°C . Dall'analisi dei dati cinetici condotti con questi tre substrati con diversa struttura, è emerso che non c'è controllo elettrostatico nell'interazione fra enzima e questi substrati, in quanto l'efficienza catalitica non dipende dalla forza ionica, come si osserva in figura 3.5.

Nessun effetto è stato inoltre osservato sulla V_{max} .

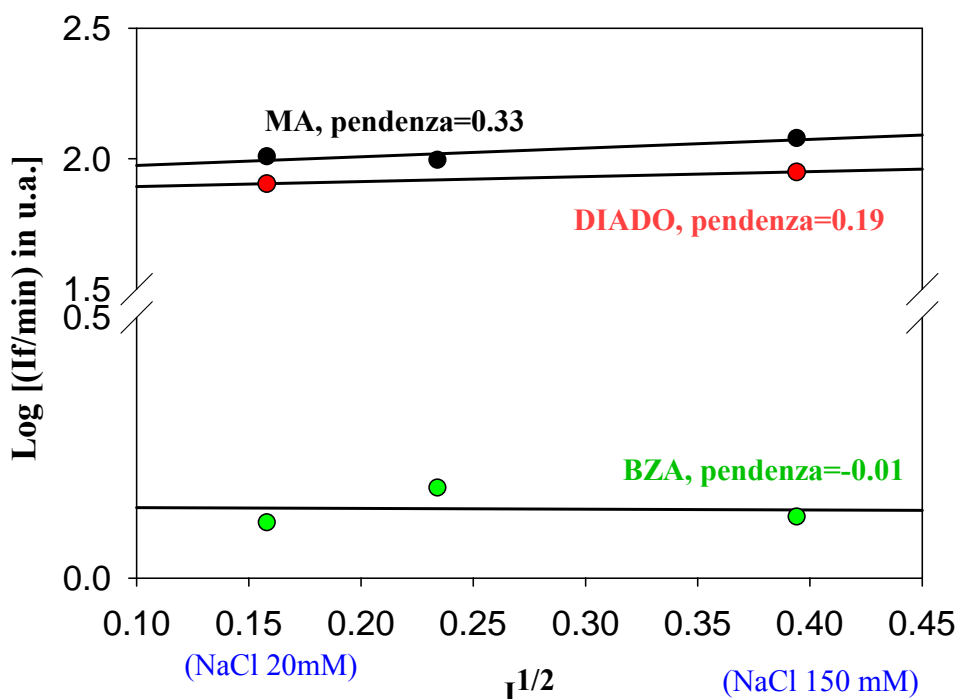


Figura 3.5. Valori di $\text{Log } [(I f/\text{min}) \text{ in u.a.}]$ in funzione di $(I)^{1/2}$ per metilammina (●), benzilammina (●) e 1-12 diamminododecano (●). Le concentrazioni dei substrati utilizzati ($S \ll K_M$) sono: metilammina $20\mu\text{M}$, benzilammina $2\mu\text{M}$, 1-12 diamminododecano $0.1\mu\text{M}$.

3.1.6. EFFETTO DELLA VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA SULL’AFFINITÀ DI ALCUNI SUBSTRATI.

Dopo aver osservato che le interazioni ioniche non controllano la fase di riconoscimento enzima-substrato, utilizzando gli stessi substrati per SSAO/VAP-1, si è studiato l’effetto della temperatura sull’affinità. I dati ottenuti sono riportati in tabella 3.7, e come si può vedere l’affinità diminuisce aumentando la temperatura (da T=25°C a T=37°C). Il corrispondente aumento di K_M risulta più evidente con la metilammina e l’1,12 diamminododecano, rispetto alla benzilammina. Poiché è noto che l’aumento della temperatura favorisce l’effetto idrofobico (Cantor C.R e Schimmel P.R 1980), l’incremento di affinità dei substrati per il sito attivo dell’enzima aumentando la temperatura, conferma che l’effetto idrofobico è importante nel riconoscimento di questi substrati con il sito attivo di SSAO/VAP-1.

Tabella 3.7. Effetto della temperatura sull’affinità di SSAO/VAP-1 per alcuni substrati.

<i>SUBSTRATO</i>	<i>K_m(mM) T=25 °C</i>	<i>K_m(mM) T=37 °C</i>
Benzilammina	$0.19 \pm 9.8 \cdot 10^{-2}$	$0.27 \pm 5.8 \cdot 10^{-2}$
Metilammina	4.55 ± 0.17	1.11 ± 0.22
1,12 Diamminododecano	$0.04 \pm 1.6 \cdot 10^{-2}$	$0.012 \pm 2.5 \cdot 10^{-3}$

3.1.7. DIFFERENZE NEL SITO ATTIVO DI BSAO RISPETTO A SSAO/VAP-1.

Dal momento che SSAO/VAP-1 e BSAO presentano un’elevata identità di sequenza (circa 82.5%, Salminen T. et al., 1998) e poiché per entrambi è stata risolta ed è disponibile la struttura 3D (BSAO, codice PDB 1TU5, Lunelli et al., 2005 e SSAO/VAP-1, codice PDB 1US1, Airenne et al., 2005), l’analisi dei differenti amminoacidi del sito attivo può fornire informazioni circa la diversa affinità dei substrati per questi due enzimi; inoltre è possibile eseguire studi di docking per confrontare dati strutturali con i dati ottenuti da studi cinetici. La simulazione di docking, effettuata dal dott. Michele Lunelli (Università di Trento) mostrata in figura 3.6, è stata eseguita utilizzando come substrato: la spermidina. Il sito attivo di SSAO/VAP-1 è principalmente localizzato nel dominio D4, come il sito attivo della BSAO, pertanto il processo di docking coinvolge principalmente i residui presenti nel dominio D4 e che formano le pareti dei canali dei siti attivi, indicati in giallo per

l'enzima umano e in rosso per l'enzima bovino. La differente affinità, espressa dal valore di K_M misurato per lo stesso substrato (K_M maggiore di 50 mM per SSAO/VAP-1 e $K_M = 225 \mu\text{M}$ per BSAO), potrebbe essere spiegata osservando i differenti residui presenti nel sito attivo dei due enzimi. Come per l'enzima bovino, nell'enzima umano ci sono dei residui apolari che determinano l'interazione con substrati aventi gruppi idrofobici. In particolare, come si osserva in figura 3.6, in prossimità del cofattore (TPQ) si trova una tasca idrofobica nell'enzima umano che risulta estremamente conservata in BSAO, costituita da Tyr384, Phe389, Leu469 e termina con una Tyr394. Questo residuo amminoacidico è preceduto da una Lys393, che non è presente nell'enzima bovino, dove è sostituito da una Tyr392. La diversa affinità della spermidina e di altri substrati per i due enzimi può essere spiegata dalla presenza o assenza di una carica positiva in quella posizione. La spermidina ha un ammino gruppo carico in posizione 10 lungo la catena alifatica e l'interazione tra questo gruppo e la Lys393 carica ostacola il processo di docking e spiega la minore affinità di questo substrato per VAP-1 rispetto a BSAO. La deprotonazione di questa Lys393 ad alti valori di pH può spiegare l'aumento di affinità dell'enzima umano per i vari substrati provati (tabella 3.6). Inoltre, la mutazione della Phe393 in Tyr394 come si può osservare in figura 3.6, diminuisce l'idrofobicità della tasca e quindi l'affinità per i substrati aventi gruppi alifatici. Questi studi di docking confermano i risultati ottenuti dagli studi cinetici ed in particolare il fatto che SSAO/VAP-1 abbia un valore di costante dielettrica superiore a quello stimato per l'enzima bovino, e quindi un sito attivo con caratteristiche meno idrofobiche di quello dell'enzima bovino.

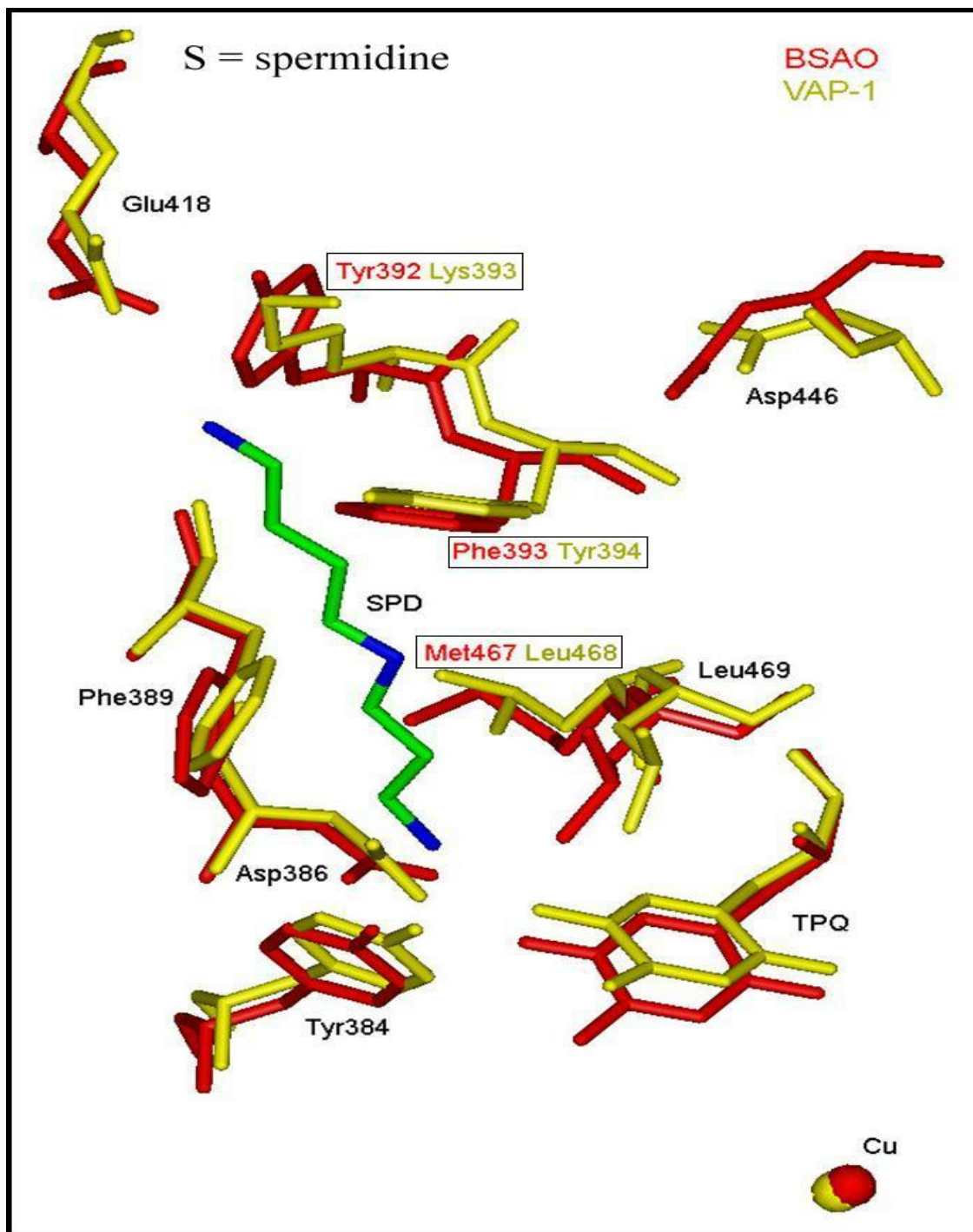


Figura 3.6. Simulazione di docking della spermidina nel sito attivo di BSAO e di SSAO/VAP-1. La struttura cristallografica dell'enzima bovino è mostrata in rosso, mentre la struttura cristallografica dell'enzima umano è mostrata in giallo. I riquadri in figura evidenziano i principali residui amminoacidici nel sito attivo di BSAO (in rosso) mutati in SSAO/VAP-1 (in giallo).

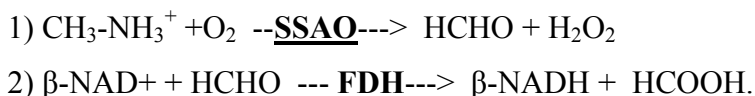
3.2. DETERMINAZIONE FLUORIMETRICA DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO UMANO.

Numerosi studi condotti negli ultimi anni correlano il livello di SSAO/VAP-1 solubile nel plasma a numerosi stati patologici, come ad esempio: diabete, l'aterosclerosi, alcuni tipi di cancro, la malattia di Alzheimer, cirrosi epatica ed altri disordini al fegato di natura infiammatoria (Boomsma F. et al., 2003 e Uçar G., 2004). In questi studi di solito l'attività della SSAO/VAP-1 plasmatica è misurata utilizzando benzilammina marcata (^{14}C) e quantificando la quantità del prodotto di reazione che deve preliminarmente essere estratto (Fowler C.J. et al., 1981). Alternativamente, il prodotto di reazione viene quantificato mediante HPLC in seguito a funzionalizzazione con molecole fluorescenti (Van Dijk J. et al., 1995 e Roessner V. et al., 2006). Recentemente sono stati proposti dei metodi immunologici (ELISA) (Lin Mao-Shin et al., 2008), la cui risposta non dà però informazioni sulla reale attività SSAO, dalla quale dipendono i livelli plasmatici dei prodotti di reazione (ad esempio la formaldeide).

Lo sviluppo di un metodo che non comporti l'utilizzo di radioattività e/o passaggi di funzionalizzazione ed estrazione è quindi importante per poter misurare la quantità di SSAO/VAP-1 solubile attiva nel plasma e capire quindi le correlazioni fra questo enzima e vari tipi di patologie. Per questo motivo è stato messo a punto e validato un metodo fluorimetrico per la determinazione dell'attività di SSAO/VAP-1 nel plasma umano.

3.2.1. MESSA A PUNTO DEL METODO.

Per la misura dell'attività di SSAO/VAP-1 in plasma umano è stato messo a punto un metodo fluorimetrico che utilizza la metilammina come substrato. Questo metodo è basato sulla misura della formaldeide, uno dei prodotti di reazione del processo di deamminazione ossidativa delle SSAO, utilizzando il sistema formaldeide deidrogenasi/NAD⁺ secondo il seguente schema:



Nello schema di reazione sopra riportato, viene generata una molecola di NADH per ogni molecola di metilammina ossidata durante il processo catalitico dell'enzima.

La quantità totale di NADH prodotto viene misurata tramite fluorimetria ($\lambda_{\text{ex}}=340$ nm e $\lambda_{\text{em}}=464$ nm) utilizzando una opportuna curva di calibrazione.

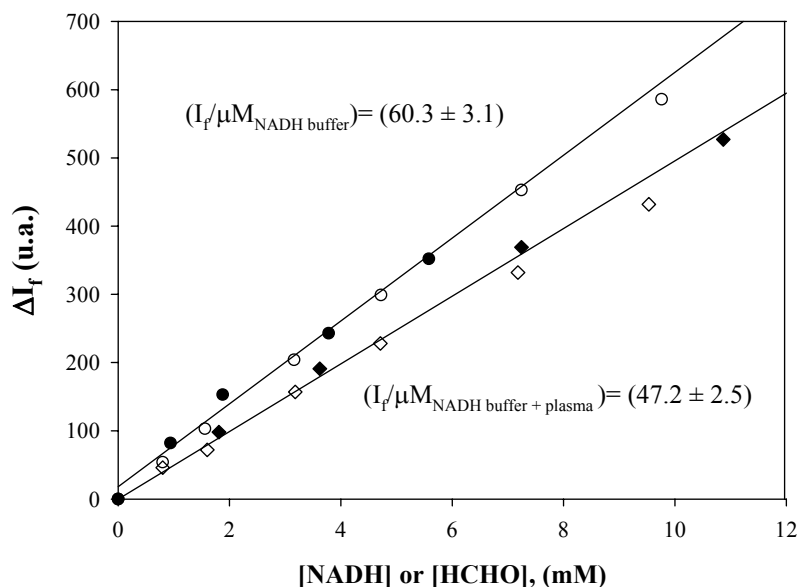


Figura 3.7. Curve di calibrazione del sistema formaldeide deidrogenasi/HCHO e NAD⁺. Le calibrazioni sono state eseguite in potassio fosfato 50 mM, pH 7.2 (●,○) e nello stesso buffer in presenza di plasma (30 μ l/890 μ l) (◆,◇). La figura riporta l'intensità di fluorescenza (in unità arbitrarie) in funzione della concentrazione di NADH: Il NADH è stato aggiunto direttamente al buffer (●), o al buffer contenente plasma (◆). Alternativamente, il NADH viene prodotto dall'aggiunta di HCHO preparata fresca alla soluzione di saggio contenente FDH e NAD⁺: solo in buffer (○), oppure in buffer contenente plasma (◇).

In figura 3.7. sono rappresentate due curve di calibrazione per il NADH: una ottenuta in buffer ed una ottenuta nello stesso buffer in presenza di un campione di plasma umano (30 μ l di plasma/890 μ l). Come si vede chiaramente in figura 3.7 si ottiene la stessa retta di calibrazione sia utilizzando NADH (concentrazione calcolata dallo spettro di assorbimento) che utilizzando aliquote di formaldeide, in presenza di NAD⁺ e di formaldeide deidrogenasi. E' però evidente come la retta di calibrazione ottenuta in presenza di plasma nella soluzione del saggio è caratterizzata da una pendenza più bassa rispetto alla curva di calibrazione ottenuta solo in buffer (47 ± 2.5 $I_f/\mu\text{M}_{\text{NADH}}$ in presenza di plasma rispetto a 60.3 ± 3.1 $I_f/\mu\text{M}_{\text{NADH}}$ in buffer). Questo effetto, che varia da plasma a plasma, probabilmente è dovuto ad un parziale effetto di "quenching" sulla fluorescenza del NADH da parte di alcuni componenti del plasma. Sono stati provati inoltre diversi campioni di plasma in un intervallo di diluizioni

compreso tra 10/890 a 60/890 (v/v) e per la diluizione di plasma 30/890 è stata misurata una pendenza di $36.4 \pm 6.2 I_f/\mu\text{M}_{\text{NADH}_0 \text{HCHO}}$ (calcolata su 34 campioni di plasma).

3.2.2. VALIDAZIONE DEL METODO.

Per validare questo metodo fluorimetrico sono state utilizzate membrane solubilizzate da adipociti umani come fonte di SSAO/VAP-1 e metilammina 10 mM come substrato. Questa concentrazione di substrato risulta ottimale per ottenere la massima attività enzimatica in tampone PBS (ad una temperatura di 37 °C). In queste condizioni l'attività enzimatica misurata risulta essere circa 1.7 volte maggiore rispetto alla massima attività misurabile con benzilammina (3.3 mM). Lo stock di membrane di adipociti solubilizzate, è stata diluita in PBS ed incubata in presenza ed in assenza di metilammina 10 mM ad una temperatura di 37 °C. Un'aliquota di membrane incubate in presenza di metilammina è stata prelevata e diluita direttamente nella cuvetta da fluorimetria contenente PBS e 0.5 mM di NAD^+ . L'intensità di fluorescenza misurata rappresenta la linea di base. Dopo circa 30 secondi, la linea di base è generalmente stabile, viene quindi aggiunta la formaldeide deidrogenasi (a concentrazione finale di 0.14 mg/ml) e si osserva l'incremento di intensità di fluorescenza dovuto alla concentrazione di HCHO nell'aliquota di membrane prelevate (a quel tempo). La quantità di HCHO prodotta nella soluzione contenente SSAO/VAP-1 e metilammina viene misurata a diversi intervalli di tempo e la concentrazione di HCHO viene calcolata utilizzando la corrispondente retta di taratura. E' quindi possibile calcolare dai punti sperimentali l'attività delle SSAO nel campione in esame. In figura 3.8 sono riportati degli esempi di attività misurata con questo metodo discontinuo, che come si può vedere ha una risposta lineare nel tempo.

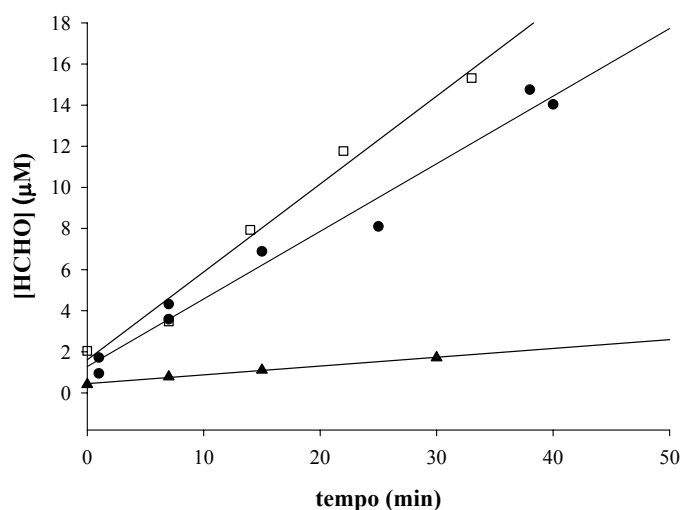


Figura 3.8. Formazione di HCHO (μM) in presenza di concentrazioni differenti di SSAO (da membrane di adipociti). Le membrane di adipociti sono state solubilizzate, diluite in PBS e corrispondono ad un'attività SSAO di 18.6 (\square), 13 (\bullet) e 1.8 (\blacktriangle) $\mu\text{M}_{\text{HCHO}}/\text{min}$ ($\text{nmoli}/\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}}$). La figura riporta la quantità di HCHO presente nella soluzione di incubazione in vari tempi e calcolata in accordo alla curva di calibrazione.

Una risposta lineare del metodo è stata ottenuta anche per la misura della produzione di HCHO rispetto alla quantità di enzima (espressa in $\mu\text{g}/\text{ml}$) come mostrato in figura 3.9.

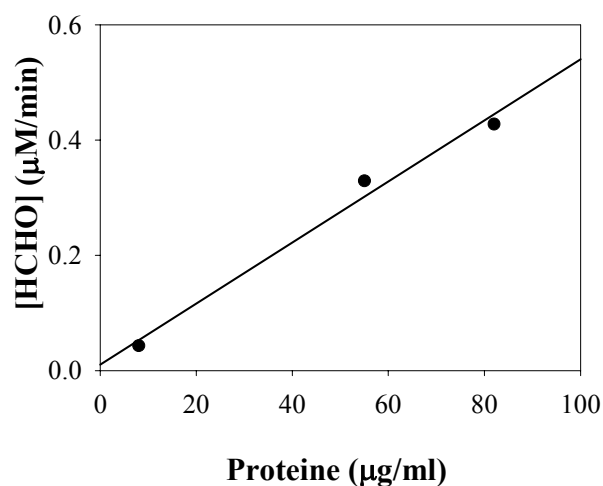


Figura 3.9. Velocità di formazione di HCHO a varie concentrazioni di membrane di adipociti, misurata con il metodo FDH-NAD⁺.

Per la validazione del metodo FAD-NAD⁺, oltre alla produzione di formaldeide tramite questo metodo è stata misurata la produzione di H₂O₂, l'altro prodotto di

reazione, tramite il metodo dell'Amplex Red accoppiato alla perossidasi. La buona regressione lineare ($r=0.999$) e il valore di pendenza (1.10) ottenuta dal confronto della quantità dei due prodotti di attività di SSAO/VAP-1 misurati con i due differenti metodi conferma la validità di questo metodo per la determinazione dell'attività di SSAO/VAP-1, come si può osservare in figura 3.10.

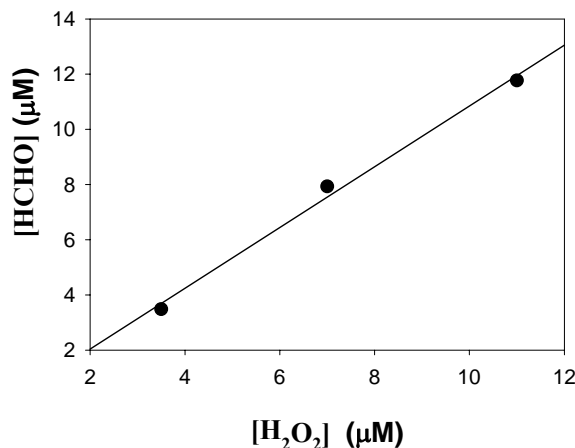


Figura 3.10. Confronto fra la quantità di HCHO e la quantità di H₂O₂ prodotta dall'attività di SSAO, agli stessi tempi, misurata mediante il sistema FDH-NAD⁺ e rispettivamente mediante il metodo Amplex-Red accoppiato alla perossidasi.

3.2.3. APPLICAZIONE DEL FAD-NAD⁺ METODO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA UMANO.

La procedura standard messa a punto per la determinazione dell'attività della SSAO/VAP-1 nel plasma umano prevede che un campione di plasma (aliquota generalmente di 300 µl) sia preincubato alla temperatura di 37 °C per 20-30 minuti circa con 0.5 mM di pargillina (inibitore delle MAO A e B). La reazione inizia con l'aggiunta di 10 mM metilammina (concentrazione finale). Ad intervalli di 10-15 minuti, 30 µl del sistema plasma-metilammina vengono prelevati per misurare la quantità di HCHO prodotta, come riportato nel paragrafo 3.2.2. Si sono prelevate almeno tre aliquote dal sistema a vari tempi. Il tempo totale richiesto per l'esecuzione di un saggio di questo tipo, considerando campioni con bassa attività per SSAO/VAP-1, è di circa 60 minuti. L'intensità di fluorescenza della soluzione del saggio contenente l'aliquota di campione prelevata ad un certo tempo e diluita in cuvetta (contenente 0.5 mM NAD⁺ in PBS), rappresenta la linea di base. L'aumento dell'intensità di fluorescenza, misurata dopo

l'aggiunta di formaldeide deidrogenasi è dovuta alla produzione di HCHO da parte dell'enzima nel plasma. La concentrazione di HCHO generata nel sistema plasma-metilammina è calcolata usando la curva di calibrazione ottenuta con lo stesso campione di plasma in assenza di metilammina. Dalla curva di calibrazione è anche possibile verificare, per ogni campione, la presenza di formaldeide endogena (generalmente troppo bassa per essere misurata) o la possibile intensità di fluorescenza, bassa ma talvolta osservata, con alcuni stock di formaldeide deidrogenasi commerciale e il cui contributo è stato incluso nel bianco. In figura 3.11 si possono osservare alcuni esempi di produzione di HCHO nel tempo nel plasma umano proveniente da diversi donatori (controlli e pazienti), caratterizzati da diversa attività di SSAO/VAP-1. Riassumendo, questo metodo fluorimetrico è caratterizzato da una risposta lineare (mostrata in figura 3.11), da un tempo di saggio di circa 60 minuti, da una sensibilità di circa $100 \text{ pmoli}_{\text{HCHO}}/(\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}})$. E' stato calcolato un limite di misura di circa $50 \text{ ng/ml}_{\text{plasma}}$ di SSAO/VAP-1 considerando un valore di attività specifica di circa $800 \text{ nmoli}_{\text{BZA}}/\text{min} \times \text{mg}$ per SSAO/VAP-1 purificata (Öhman J. et al., 2006) e considerando il fattore di correzione dell'attività dell'enzima umano con la metilammina rispetto alla benzilammina (fattore 1.7). La sensibilità del metodo può essere migliorata prolungando il tempo di incubazione del plasma in presenza di metilammina. Per un punto singolo dell'analisi, è stato calcolato un errore di circa $0.05 \text{ } \mu\text{M}$ di HCHO (corrispondente ad una intensità di fluorescenza di circa 3-4 in unità arbitrarie con il nostro "set up" strumentale). E' stata anche verificata la stabilità della formaldeide prodotta dall'attività dell'enzima durante il tempo di incubazione del plasma. $10\text{-}20 \text{ } \mu\text{M}$ di HCHO è stata aggiunta a due campioni di plasma e la concentrazione di HCHO è stata dosata nel tempo. Non è stata riscontrata alcuna variazione significativa della concentrazione di HCHO durante il tempo di un saggio. Diversamente, l'altro prodotto di reazione, l'acqua ossigenata scompare molto velocemente nel plasma per reazione con dei componenti del plasma stesso con attività "antiossidante" (Valenca S.S. et al., 2008). Da questi risultati, si può concludere che questo metodo basato sul sistema metilammina/ NAD^+ /formaldeide deidrogenasi, è adatto alla determinazione dell'attività di SSAO/VAP-1 nel plasma umano.

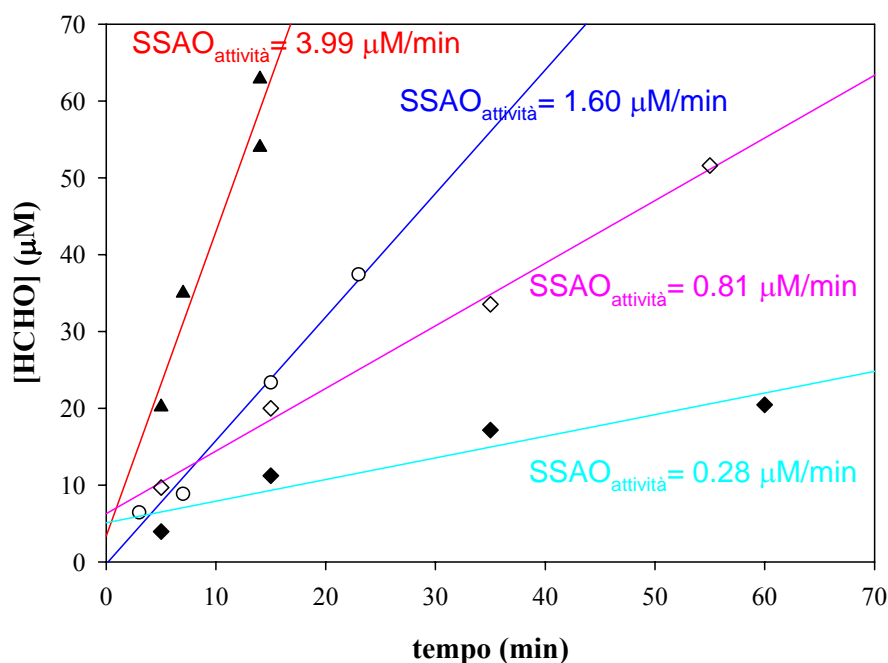


Figura 3.11. Applicazione del metodo alla determinazione dell'attività di SSAO/VAP-1 nel plasma. In figura è riportata la concentrazione di HCHO prodotta in tempi differenti nel plasma, e calcolata dalla corrispondente curva di calibrazione. Le pendenze della regressione lineare rappresentano i valori dell'attività SSAO nel plasma espresse in $\mu\text{M}_{\text{HCHO}}/\text{min}$ (equivalente a $\text{nmoli}/\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}}$).

3.2.4. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO DI PAZIENTI CON MALATTIA DI ALZHEIMER E CON IMPIANTO DI STENT.

Il metodo sviluppato come descritto nei paragrafi precedenti è stato applicato per la determinazione dell'attività di SSAO/VAP-1 in 31 plasmi provenienti da soggetti sani (controlli) con età compresa tra 25 e 85 anni, 24 maschi e 7 femmine. L'attività della SSAO/VAP-1 in questa popolazione varia da 0.24 a 1.26 $\text{nmoli}_{\text{HCHO}}/(\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}})$ ed il valore medio di attività SSAO/VAP-1 misurato è di $0.83 \pm 0.33 \text{ nmoli}_{\text{HCHO}}/(\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}})$. Questo valore di attività è in buon accordo con il valore pari a $0.300 \pm 0.157 \text{ nmoli}_{\text{BZA}}/\text{min} \times \text{ml}_{\text{plasma}}$ trovato utilizzando la benzilammina come substrato su una diversa popolazione di controlli e se si tiene conto della diversa reattività dei due substrati (metilammina e benzilammina) (Boomsma F. et al., 2005). Non è stata evidenziata alcuna significativa correlazione dell'attività di SSAO/VAP-1 con l'età ($r=0.30$) e il sesso ($p=0.4$) nel gruppo di controlli analizzato. L'attività SSAO/VAP-1 è stata misurata anche nel plasma dei seguenti gruppi di pazienti: pazienti affetti da Alzheimer (4 femmine e 8), pazienti affetti da cirrosi epatica esotossica (11 pazienti affetti da cirrosi epatica lieve, 11 con moderata cirrosi epatica e 6 pazienti con cirrosi

epatica “severa”), e pazienti, sottoposti ad impianto percutaneo di stent a seguito di occlusione coronaria dopo 6 mesi dall’intervento (8 maschi ed 1 femmina). Il livello medio di attività dei vari gruppi di pazienti è stato confrontato con il gruppo di controllo. Dal confronto di ogni gruppo di pazienti con il gruppo di controllo, è stato trovato un aumento significativo dell’attività di SSAO/VAP-1 per il gruppo di pazienti con impianto di stent (sia con che senza restenosi), e per il gruppo di pazienti affetti da Alzheimer “medio-grave” (figura 3.12).

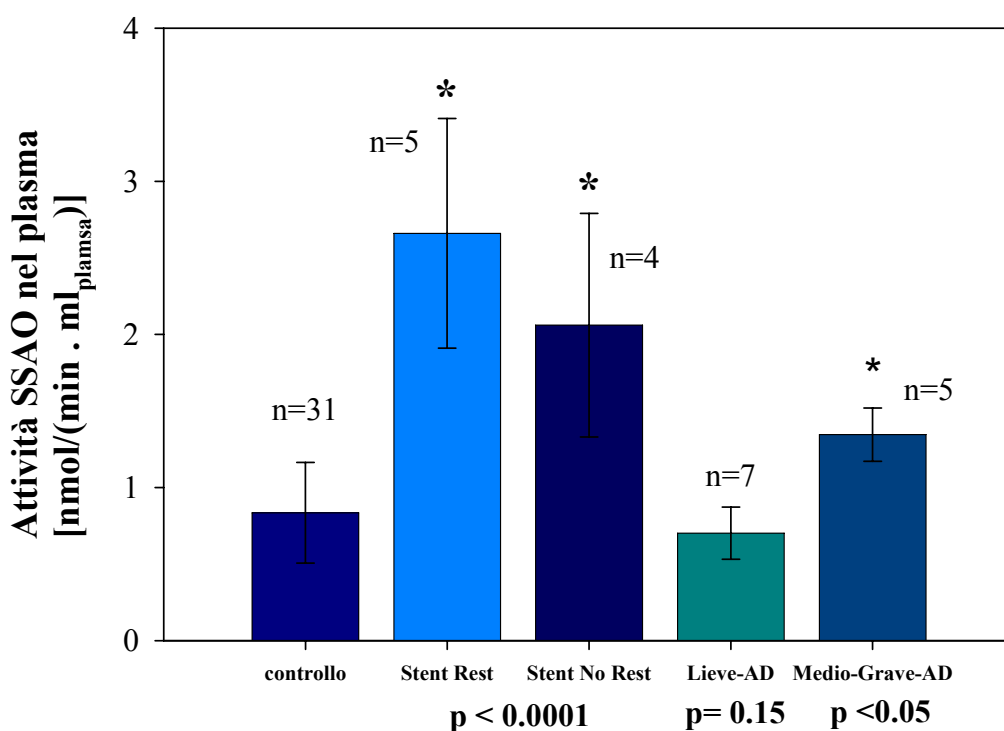


Figura 3.12. Attività SSAO (valore medio \pm dev. standard) in plasma di controlli, di pazienti affetti da Alzheimer e di pazienti con impianto di Stent. I valori “p” sono relativi al confronto fra il gruppo “controlli ” e gli altri gruppi (analisi tramite t-test). Le differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sono indicate con (*).

I risultati dell’attività di SSAO/VAP-1 nei pazienti affetti da Alzheimer sono in buon accordo con i dati precedentemente riportati in letteratura (del Mar Hernandez M. et al., 2005), mentre i dati sull’attività di SSAO/VAP-1 in pazienti con impianto di stent sono stati ottenuti per la prima volta in questo lavoro. Come si osserva in figura 3.12, anche se il valore medio dell’attività di SSAO/VAP-1 nel gruppo di pazienti con “restenosi” è più alto del valore di attività misurata per il gruppo di pazienti senza “restenosi”, non è stata trovata nessuna significatività statistica ($p=0.26$). Questo

risultato potrebbe essere dovuto ad un elevato valore di deviazione standard per questo gruppo di pazienti e ad un basso numero di campioni. Infatti, il più alto valore di attività SSAO/VAP-1 in pazienti con restenosi, se confermato da un maggiore numero di campioni, sarebbero in accordo con l'aumento di altre molecole di adesione circolanti, in particolare delle VCAM-1, riportato in pazienti con restenosi rispetto a pazienti senza restenosi (Heider P. et al., 2006). Poiché il bilancio tra fattori proossidanti e antiossidanti, definito come stress ossidativo, può giocare un importante ruolo nelle vie di segnale implicate nel danno tissutale e vascolare, lo "stress ossidativo" sembra essere coinvolto negli eventi fisiopatologici legati a vari disordini come ad esempio aterosclerosi, ipertensione e nella reazione di riparo al danno vascolare che è una delle cause determinanti dei restenosi dopo l'impianto di stent (Azevedo L.C.P., et al., 2000, Szasz T. et al., 2007). In base a queste premesse, è stata quindi misurata la concentrazione di superossido dismutasi extracellulare (EC-SOD) nel plasma di pazienti con impianto di stent ed Alzheimer. Questo enzima è infatti un noto componente delle difese antiossidanti del nostro organismo (Fattman C.L. et al., 2003). Un aumento significativo dei livelli di EC-SOD è stato trovato nel gruppo di pazienti con impianto di stent rispetto al gruppo di controllo, mentre nessuna differenza significativa ($p=0.3$) è stata trovata fra il gruppo di pazienti con restenosi e quello senza restenosi. Dal confronto dei livelli di EC-SOD nel gruppo di pazienti affetti da Alzheimer con la popolazione di controllo, non sono emerse differenze significative ($p=0.2$).

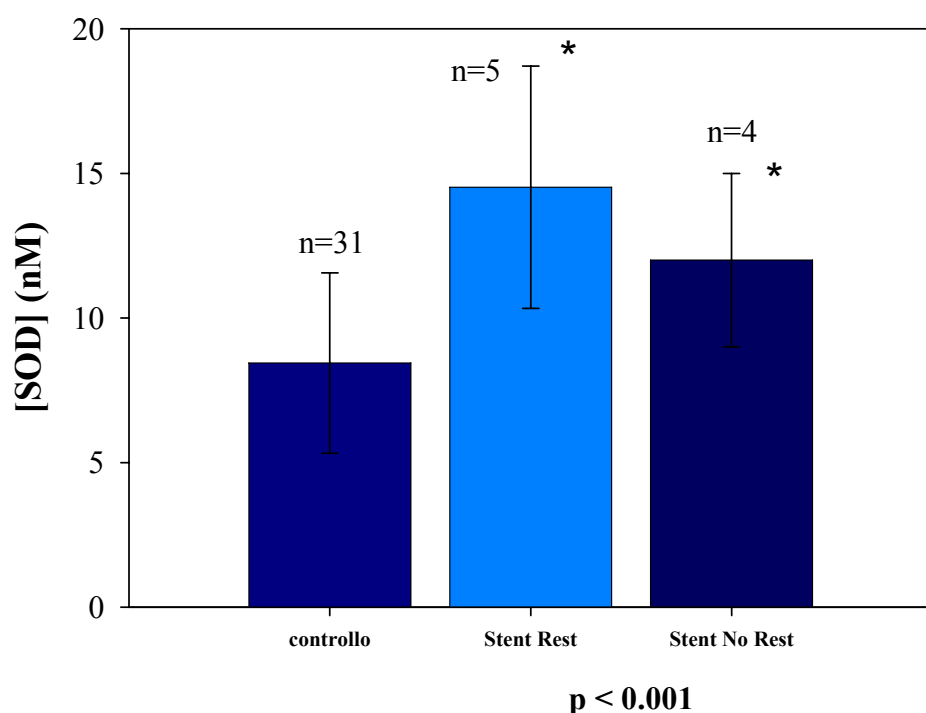


Figura 3.13. Concentrazione di EC-SOD (valore medio \pm dev. standard) in plasma e siero di controlli e pazienti con Alzheimer e impianto di Stent. I valori “p” sono relativi al confronto fra il “gruppo controlli” e gli altri gruppi (analisi tramite t-test). Le differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sono indicate con (*).

I risultati finora trovati (aumento del livello di attività SSAO/VAP-1 e EC-SOD) suggeriscono che nei pazienti sottoposti ad impianto di stent ci sia una condizione di “stress ossidativo” ed una condizione proinfiammatoria, che potrebbe essere causata da un effetto a lungo termine di danno vascolare indotto dall’impianto dello stent. La presenza dello stent potrebbe determinare proliferazione delle cellule muscolari lisce, danno endoteliale e rimodellamento della matrice extracellulare e indurre quindi un aumento della forma solubile della SSAO/VAP-1 ed un aumento della EC-SOD.

3.2.5. DETERMINAZIONE DELL’ATTIVITÀ DI SSAO/VAP-1 NEL PLASMA E NEL SIERO DI PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA.

Il sistema FAD-NAD⁺/formaldeide deidrogenasi, accoppiato al sistema plasma/metilamina è stato applicato anche alla misura della SSAO/VAP-1 nel plasma di pazienti con cirrosi epatica esotossica (indotta da abuso di alcool). Dal confronto di questo gruppo pazienti, raggruppati secondo la classificazione Child, con la popolazione di controllo, è stato trovato un significativo aumento dell’attività della SSAO/VAP-1 nel caso di pazienti classificati come “lievi-moderati” (figura 3.14). Nei pazienti che

presentano uno stato grave di questa patologia (ed in assenza di diabete), è stata riscontrata una diminuzione dell'attività SSAO/VAP-1 rispetto ai pazienti con cirrosi epatica "lieve-moderata" (figura 3.14).

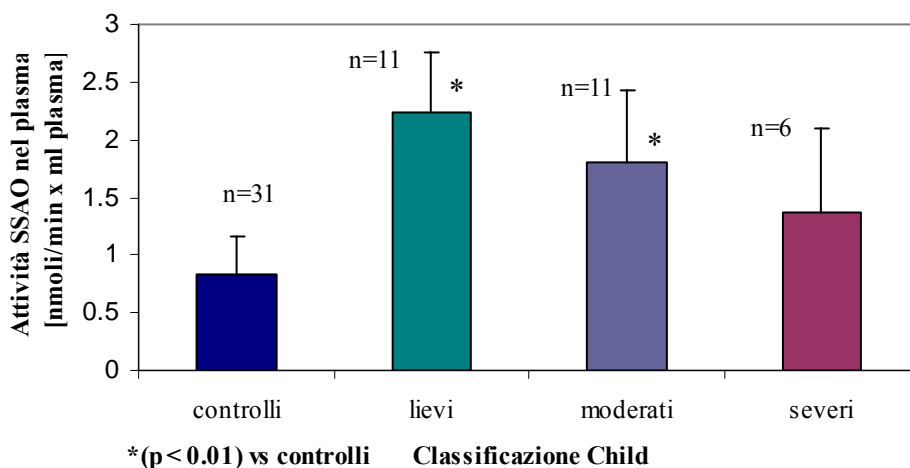


Figura 3.14. Attività SSAO (valore medio \pm dev. standard) in plasma di controlli e pazienti con cirrosi epatica esotossica. I valori "p" di ogni gruppo sono confrontati con i controlli (analisi tramite t-test) e le differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sono indicate con (*).

Questo risultato di attività per il gruppo di pazienti con cirrosi epatica è stato confermato anche utilizzando un saggio ELISA (descritto nel capitolo MATERIALI E METODI) per la determinazione della quantità di proteina VAP-1 presente nel plasma. Questo saggio è estremamente costoso e quindi non utilizzabile di routine. Come si può osservare in figura 3.15 il saggio immunoenzimatico ha confermato un significativo aumento della proteina SSAO/VAP-1 nei pazienti classificati come "lievi" rispetto al gruppo di controllo. Infatti dalla figura 3.16, si osserva anche una forte e significativa diminuzione dei livelli di proteina SSAO/VAP-1 nel caso di pazienti classificati come "gravi" rispetto ai pazienti "lievi", mentre non risulta una significativa differenza fra pazienti "gravi" rispetto al gruppo di controllo.

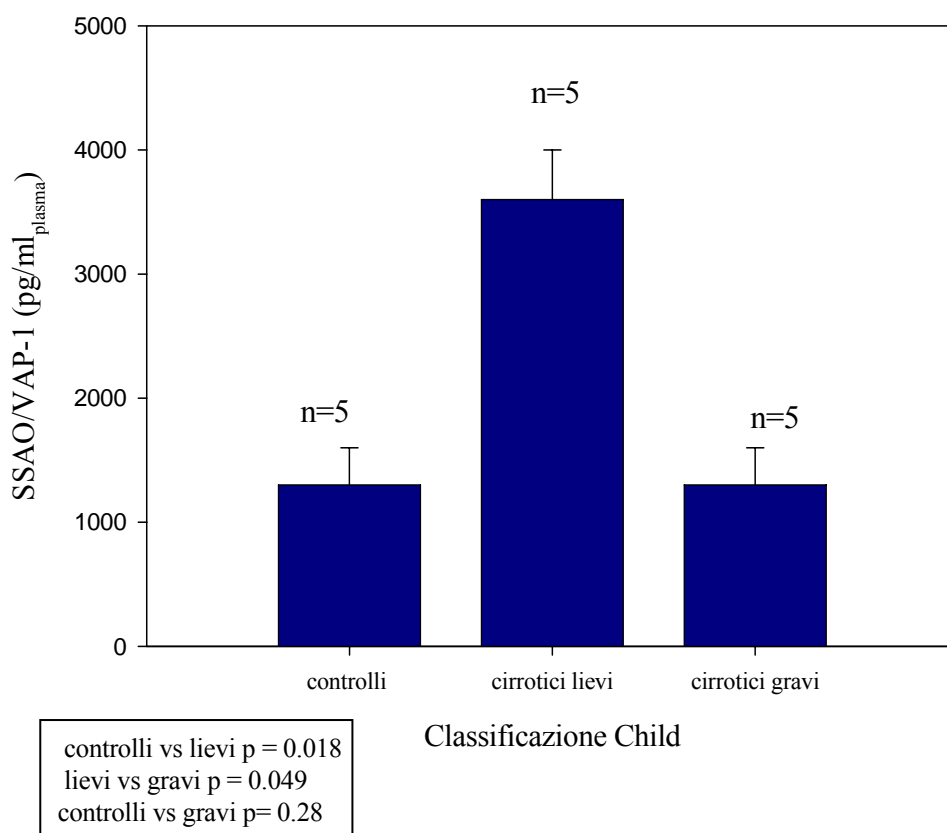


Figura 3.15. Determinazione della quantità di proteina SSAO/VAP-1 (valore medio \pm dev. standard) in plasma di controlli e di pazienti con cirrosi epatica esotossica, misurata tramite saggio immunoenzimatico ELISA. I valori “p” di ogni gruppo sono stati ottenuti confrontando il gruppo di “controlli” con gli altri gruppi (analisi tramite t-test).

I risultati ottenuti suggeriscono che alti livelli della forma solubile/plasmatica di SSAO/VAP-1 (rilasciata anche dall’endotelio vascolare epatico), probabilmente sono una conseguenza dell’inizio di una intensa risposta infiammatoria nei pazienti cirrotici (Kurkijärvi R. et al., 1998). La diminuzione dei livelli di SSAO/VAP-1 nel plasma di pazienti con lo stato grave della patologia, probabilmente potrebbe essere dovuta ad un abbassamento delle difese immunitarie in questi pazienti. Questo risultato dovrà essere confermato aumentando il numero di pazienti controllati.

3.3. ALCUNI ASPETTI FISIOLGICI DI SSAO/VAP-1 IN ADIPOCITI.

Il ruolo fisiologico di SSAO/VAP-1 non è ancora chiaro e sembra dipendere dal tessuto nel quale l'enzima è espresso; in particolare in adipociti l'attività di SSAO/VAP-1 mima l'effetto dell'insulina. E' noto che il tessuto o meglio "l'organo adiposo" non è solo un organo di deposito e di riserva, ma attraverso le adipochine influenza numerosi processi metabolici. Inoltre in condizioni di obesità, di insulino-resistenza e di diabete è riportato un incremento della SSAO/VAP-1 plasmatica, è importante cercare di studiare la funzione di VAP-1 negli adipociti ed i suoi eventuali collegamenti con la via dell'insulina. Pertanto, per ottenere informazioni sulle possibili correlazioni tra SSAO/VAP-1 e la via di segnale mediata dell'insulina ho focalizzato i miei studi sugli adipociti. Gli adipociti sono stati preparati da tessuto fresco, come descritto nel capitolo MATERIALI E METODI e sono stati incubati a 37 °C in terreno DMEM F12 sia in presenza che in assenza di insulina. In entrambe le condizioni (+/- insulina) le incubazioni sono state eseguite sia in presenza che in assenza dei seguenti fattori:

- metilammina (substrato fisiologico noto), con lo scopo di osservare l'effetto dell'attività di SSAO/VAP-1 in adipociti;
- metilammina più catalasi, per capire il contributo dell'H₂O₂ prodotta dall'attività ammino ossidasica in adipociti;
- un composto antiossidante: la malvidina 3-glucoside;
- il composto antiossidante (malvidina 3-glucoside) in presenza di substrato (metilammina).

Al termine delle incubazioni (circa due ore), le cellule sono state "lisate" con PBS come descritto nel capitolo MATERIALI E METODI e quindi il lisato è stato rapidamente congelato in azoto liquido. Sui lisati sono stati condotti i seguenti esperimenti:

- misure dell'attività SSAO/VAP-1 (utilizzando metilammina come substrato e dopo incubazione con pargillina) e dell'attività MAO (utilizzando tiramina come substrato e dopo incubazione con semicarbazide);
- analisi tramite Immunoblotting della proteina SSAO/VAP-1;
- analisi dell'espressione proteica tramite SDS-PAGE.

3.3.1. ATTIVITÀ SSAO/VAP-1 IN ADIPOCITI UMANI: EFFETTO DEL SUBSTRATO, DELLA CATALASI E DEL COMPOSTO ANTIOSSIDANTE.

Recentemente è riportato che alcune categorie di antiossidanti, in particolare la classe degli antociani hanno importanti funzioni anti-infiammatorie nei meccanismi di obesità e insulino-resistenza che si sviluppano a seguito di disfunzioni a carico del “tessuto” o “organo” adiposo (Tsuda T., 2008). In particolare è riportato che la cianidina 3-glucoside, appartenente alla classe degli antociani, esercita una funzione protettiva sul meccanismo di insulino-resistenza indotto dal trattamento con H₂O₂ e TNF- α degli adipociti 3T3-L1 (Guo H. et al., 2008). Inoltre è stato recentemente descritto che la geraniina si comporta da efficace inibitore competitivo dell’SSAO da plasma bovino, con un valore di K_i di 0.7 μ M (Lin S. et al., 2008). Pertanto, si è voluto provare l’effetto di un composto antiossidante appartenente alla classe degli antociani (malvidina 3-glucoside) sugli adipociti oltre a quello dell’insulina, della metilammina e della catalasi. L’incubazione per 2 ore degli adipociti nel mezzo di coltura in presenza o in assenza di insulina, metilammina, catalasi e malvidina 3-glucoside determina un differente livello dell’attività VAP-1.

In particolare in presenza di metilammina 10 mM, che porta ad una produzione da parte della VAP-1 di H₂O₂, si ha una diminuzione del 40% dell’attività SSAO/VAP-1, diminuzione annullata dalla presenza di catalasi che dismuta l’H₂O₂ (figura 3.16).

Anche la presenza di insulina 200 nM porta ad una diminuzione del 40% dell’attività VAP nell’incubato, diminuzione annullata dalla presenza di metilammina 10 mM. Anche in questo caso si osserva un aumento di attività quando è presente catalasi (+ 30% rispetto all’attività osservata in presenza della coppia metilammina-insulina) (figura 3.16).

La diminuzione di attività osservata in presenza di Insulina può essere dovuta all’attivazione di una cascata enzimatica (mediata da un recettore per l’insulina presente sulla membrana), che porta ad una degradazione della VAP, degradazione che non avviene se la VAP è in condizioni di turnover per la presenza della metilammina.

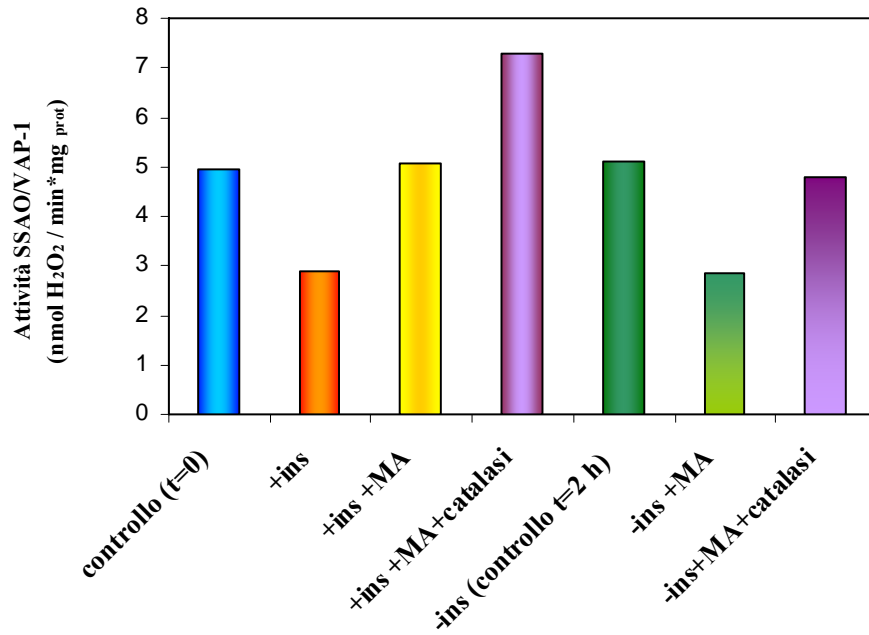


Figura 3.16. Effetto del substrato (metilammina, (MA) 10 mM) e della catalasi sull'attività di SSAO/VAP-1 in adipociti umani.

Per quanto riguarda la presenza della malvidina 3-glucoside nel mezzo di coltura, tenendo conto dei possibili errori sperimentali, si può ipotizzare che questa molecola intervenga sulla via attivata dall'insulina, annullandone in parte o totalmente l'effetto (figura 3.17).

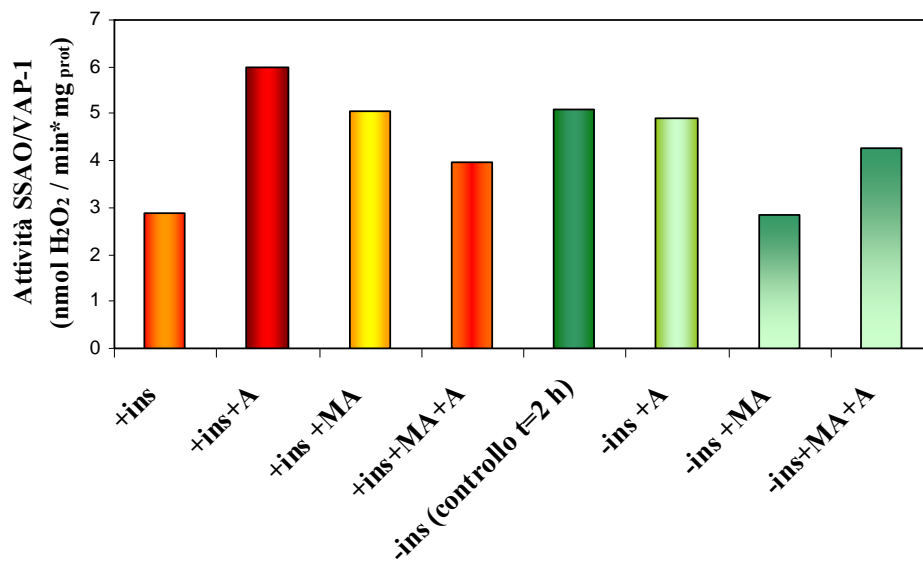


Figura 3.17. Effetto della malvidina 3-glucoside (18µM) (A) e del substrato (metilammina (MA) 10 mM) sull'attività di SSAO/VAP-1 in adipociti umani.

L'effetto dei composti metilammina, catalasi e malvidina 3-glucoside sull'attività/mg_{prot} di SSAO/VAP-1 nei lisati di adipociti, è stato confrontato con un'analisi eseguita tramite Immunoblotting utilizzando un anticorpo policlonale contro SSAO/VAP-1 (descritto nel capitolo MATERIALI E METODI). I risultati ottenuti e mostrati in figura 3.18, confermano come effettivamente le variazioni di attività/mg_{prot} misurata nei lisati ottenuti da adipociti incubati nelle varie condizioni sopra descritte, siano effettivamente dovute ad una diversa quantità e cioè espressione proteica di VAP-1 nelle diverse condizioni.

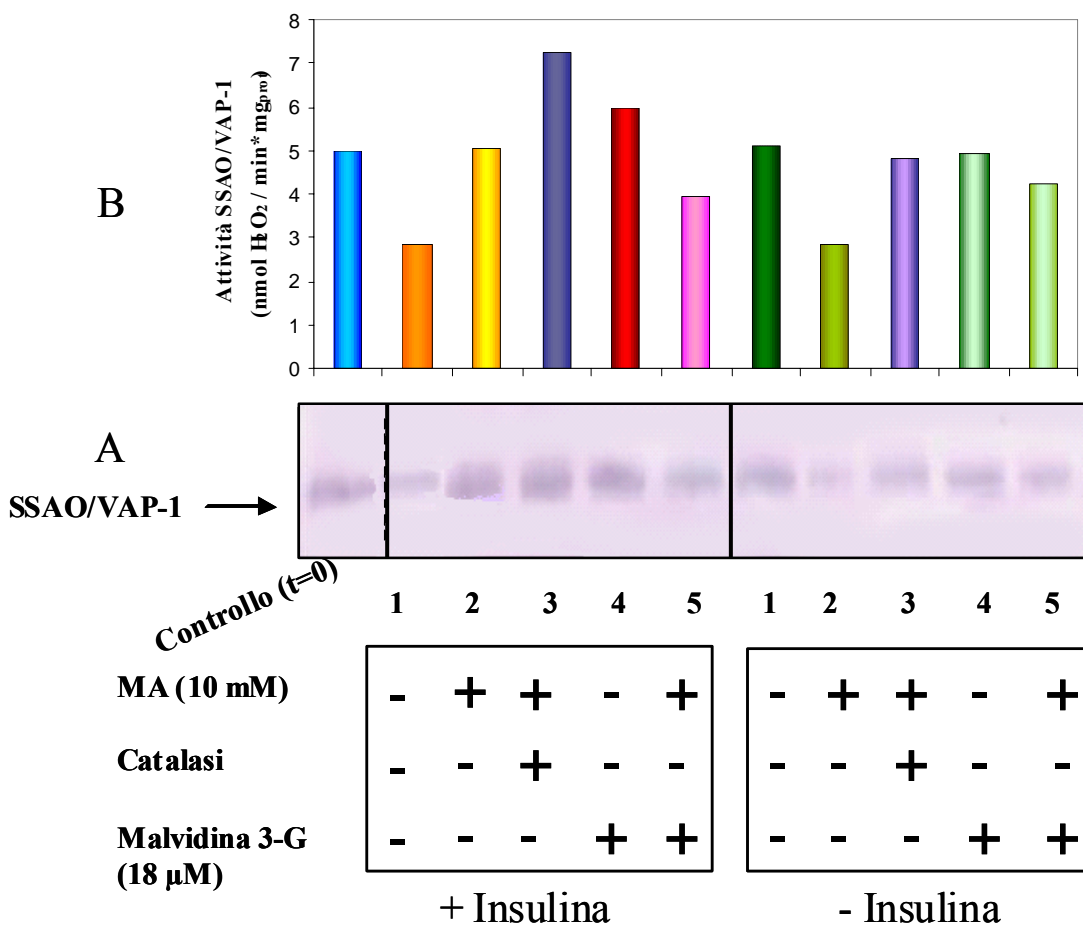


Figura 3.18. Immunoblotting di adipociti lisati ed incubati in presenza di vari fattori: metilammina 10 mM, catalasi e malvidina 3-glucoside (18 µM). (A) Immunoblotting ottenuto a partire da un minigel SDS-PAGE, al 10% di acrilammide (metodo Laemmli) sul quale sono stati caricati 15 µg di ogni campione. Il blotting è stato sviluppato con anti-SSAO/VAP-1. (B) Grafico dell'attività SSAO/VAP-1 dei campioni analizzati.

3.3.2. ATTIVITÀ DELLE MONOAMMINO OSSIDASI (MAO) IN ADIPOCITI UMANI: EFFETTO DEL SUBSTRATO, DELLA CATALASI E DEL COMPOSTO ANTIOSSIDANTE.

L'attività delle MAO (negli adipociti è principalmente espressa MAO A) dopo 2 ore di incubazione, sembra essere modulata in maniera negativa dalla presenza di insulina e dell' H_2O_2 generata via VAP per aggiunta di metilammina. Infatti in quest'ultimo caso, la presenza di catalasi annulla l'effetto dell' H_2O_2 .

Inoltre la presenza di VAP in condizioni di turnover (dovuto alla metilammina), annulla l'effetto negativo dell'insulina (figura 3.19).

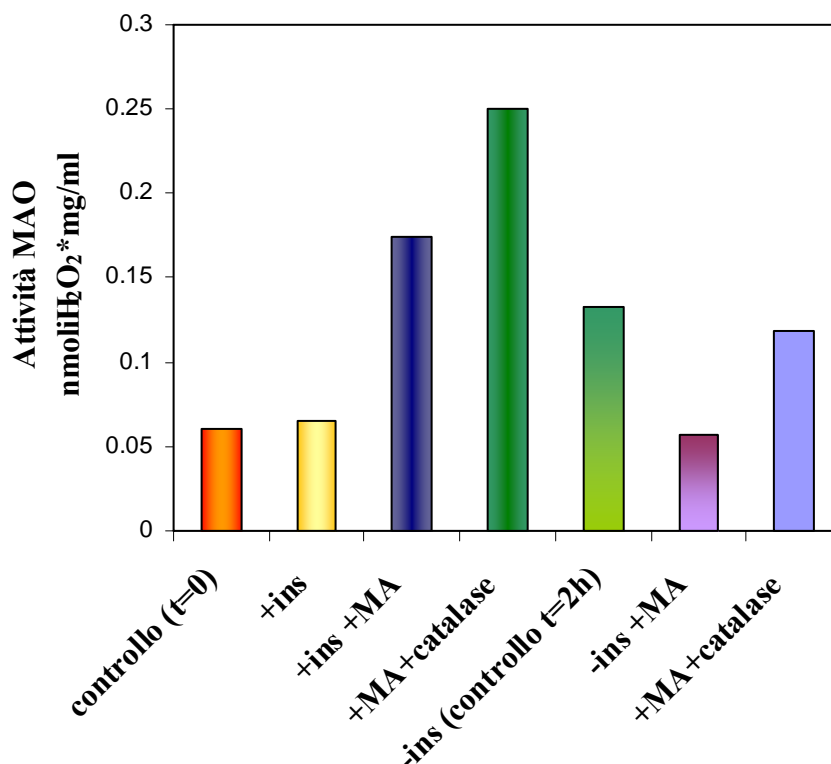


Figura 3.19. Effetto dell'attività SSAO/VAP-1 (in presenza di metilammina (MA) 10 mM) e della catalasi sull'attività delle MAO in adipociti umani incubati in presenza ed in assenza di insulina (200 nM).

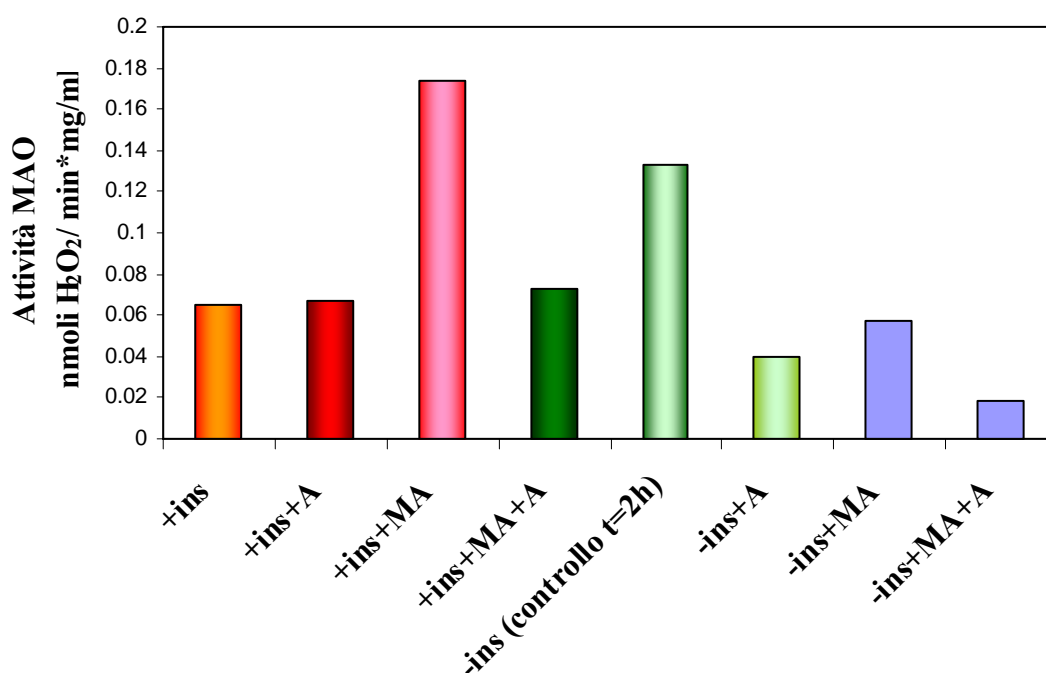


Figura 3.20. Effetto del composto antiossidante malvidina 3-glucoside (18 μ M) (A) e del substrato per SSAO/VAP-1 (metilammina (MA) 10 mM) sull'attività delle MAO in adipociti umani incubati in presenza ed in assenza di insulina (200 nM).

Per quanto riguarda la malvidina 3-glucoside, la presenza di questo antiossidante ha un forte effetto negativo sull'attività MAO, quando non è presente insulina (figura 3.20).

3.3.3. ANALISI SDS-PAGE IN GRADIENTE DI ACRILAMMIDE: UN DIFFERENTE PROFILO DI ESPRESSIONE PROTEICA IN ADIPOCITI UMANI INCUBATI IN PRESENZA ED IN ASSENZA DI INSULINA.

Gli adipociti incubati nelle varie condizioni descritte nei paragrafi precedenti ed utilizzati per misurare l'attività di SSAO/VAP-1 e delle MAO, sono stati analizzati mediante elettroforesi denaturante, SDS-PAGE e metodo di Laemmli in gradiente di acrilammide. Per ogni campione è stata caricata la stessa quantità di proteina (50 μ g). La colorazione con Blu di Comassie dei gel ottenuti, ha permesso di osservare la presenza di alcune proteine, soprattutto a basso peso molecolare (sotto i 66 KDa), che si esprimono in quantità differente in adipociti incubati in presenza ed in assenza di insulina, rispetto agli adipociti al tempo zero (non incubati). Le maggiori differenze nell'espressione proteica si osservano fra gli adipociti incubati in presenza di insulina in

confronto agli adipociti incubati in presenza di insulina ed in presenza di substrato, come indicato dalle frecce mostrate in figura 3.21 (**A** e **B**). Al momento, dall'analisi di spettrometria di massa di alcune di queste proteine sono state identificate come proteine diversamente espresse in presenza/assenza di metilamina (+ insulina) l'annexina-2 (39 KDa), e la Rab-8 (24 KDa). Queste due proteine sono coinvolte nella via di segnale che controlla la traslocazione del trasportatore del glucosio di tipo 4 (Glut 4). Le proteine della famiglia Rab sono proteine a basso peso molecolare e sono GTPasi dipendenti; in particolare la Rab 8 agisce attraverso la fosforilazione della protein chinasi AS160. L'annexina 2, è una proteina che lega il Ca^{2+} e la cui fosforilazione è PKC-dipendente, dopo l'attivazione del recettore per l'insulina.

L'identificazione di queste due proteine, se confermata mediante l'utilizzo di anticorpi specifici, consentirà di ipotizzare il ruolo della SSAO/VAP-1 nella via di segnali mediata dall'insulina in modo più approfondito rispetto a quanto finora riportato.

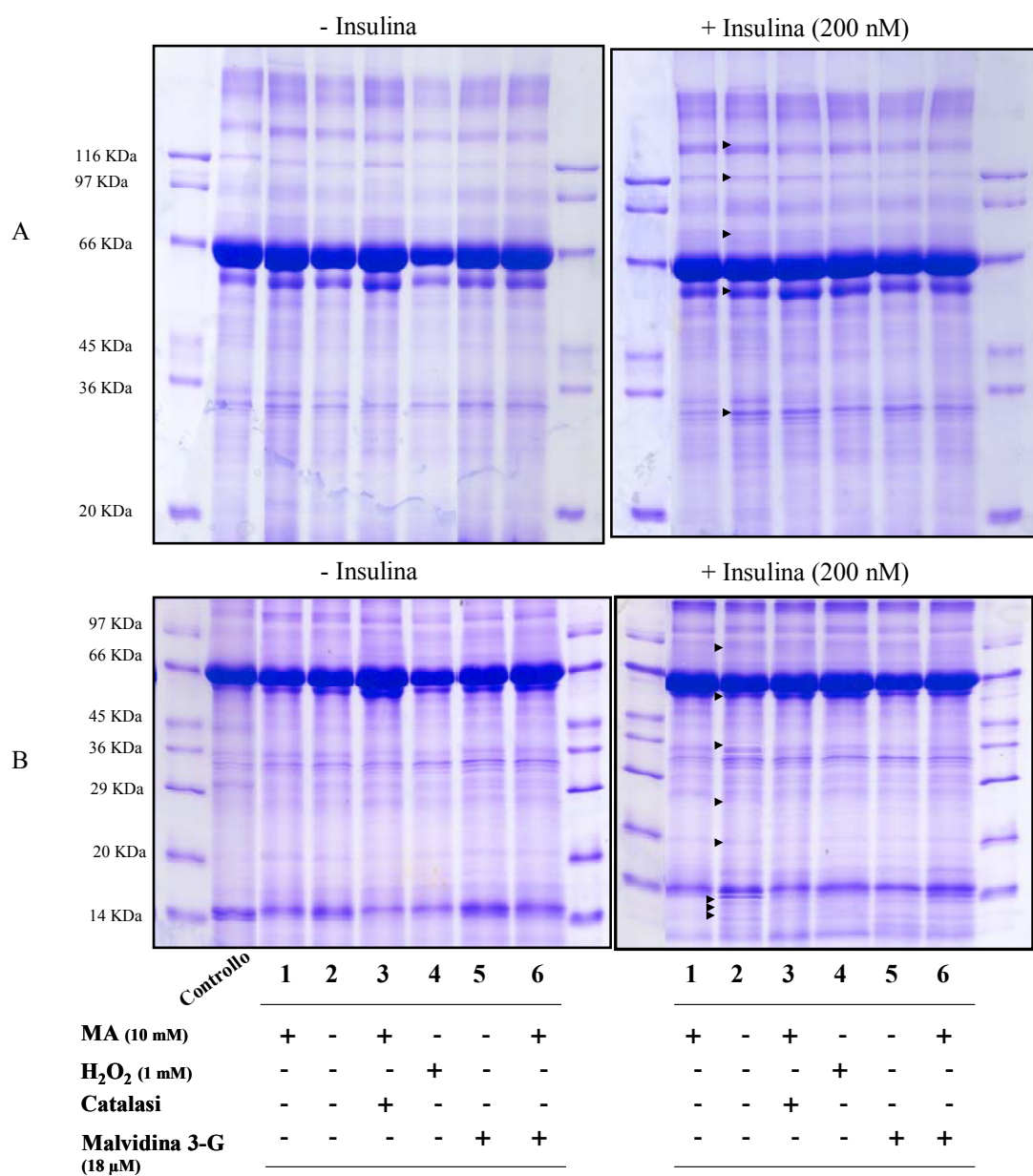


Figura 3.21. Analisi SDS-PAGE in gradiente (A: 7-12%, B: 12-16% di acrilammide) con il metodo di Laemmli. Profilo di espressione proteica di adipociti lisati ed incubati in presenza ed in assenza di insulina (200 nM) in varie condizioni di incubazione: con metilammina 10 mM, H₂O₂ 1 mM, con catalasi, con malvidina 3-glucoside 18 µM. Ogni linea è stata caricata con 50 µg di proteine. Lo spessore del gel è di 0.75 mm.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Il disegno di nuovi specifici inibitori per SSAO/VAP-1 è diventato una vera e propria sfida e rappresenta un importante target per lo sviluppo di nuovi farmaci antiinfiammatori, mentre lo studio di nuovi specifici substrati può aiutare a chiarire il ruolo fisiologico di questo enzima.

Dagli studi di caratterizzazione cinetica condotti su questo enzima (l'utilizzo di substrati "sonde" caratterizzati da una diversa struttura e distribuzione di carica, l'effetto del pH, della forza ionica e della temperatura), sono state messe in luce quali sono le interazioni che controllano il riconoscimento fra i substrati e il sito attivo di SSAO/VAP-1. Un buon substrato o inibitore di SSAO/VAP-1 dovrebbe essere una molecola caratterizzata da una grande porzione apolare e dalla presenza di una carica positiva ad una distanza maggiore di 10-12 Å dal gruppo amminico reattivo. Questi risultati saranno il punto di partenza per futuri studi di "docking" mirati allo sviluppo di nuovi potenziali inibitori di SSAO/VAP-1.

Gli studi dei livelli di attività SSAO/VAP-1 nel plasma, resi possibili grazie alla messa a punto di un nuovo metodo caratterizzato e validato, hanno messo in luce come i livelli plasmatici di questo enzima aumentino in seguito ad una condizione infiammatoria e di "stress ossidativo". Infatti i livelli di SSAO/VAP-1 plasmatici aumentano in pazienti affetti da cirrosi epatica "lieve", in pazienti affetti da Alzheimer "moderato-grave" ed in pazienti con impianto di stent coronarico. In questi ultimi pazienti è stato trovato inoltre un aumento dei livelli di superossido dismutasi extracellulare. Per la prima volta è stata messa in luce una riduzione dei livelli di SSAO/VAP-1 in pazienti cirrotici gravi rispetto ai pazienti lievi. Questo risultato suggerisce un abbassamento delle risposte immunitarie da parte dell'organismo nello stadio finale della malattia. SSAO/VAP-1 plasmatica potrebbe quindi essere considerata come uno dei "marker" ed un indice di evoluzione della cirrosi epatica esotossica.

Dagli studi condotti sugli adipociti umani è emerso come i livelli cellulari di SSAO/VAP-1 e delle MAO siano modulati dalla presenza dell'insulina, dalla presenza di metilammina e dalla presenza di malvidina 3-glucoside.

I risultati ottenuti dalle misure di attività di SSAO/VAP-1 e delle MAO negli adipociti, suggeriscono che entrambi gli enzimi sono coinvolti in una comune via di segnale, mediata dall'insulina. Ulteriori studi sono necessari per cercare di capire che ruolo abbiano entrambi gli enzimi in questa via e quali siano le proteine coinvolte.

Inoltre l'analisi preliminare SDS-PAGE degli adipociti trattati con insulina, metilammina, catalasi e malvidina 3-glucoside, ha permesso di osservare che l'espressione di alcune proteine è influenzata da questi fattori, che modulano l'attività enzimatica di SSAO/VAP-1. In futuro l'identificazione di queste proteine tramite Spettrometria di Massa, potrà contribuire a chiarire il collegamento tra questo enzima e la via di segnale mediata dall'insulina.

BIBLIOGRAFIA

- Airas L., Mikkola J., Vainio J.M., Elovaara I., Smith D.J., *J. Neuroimmunol.*, **2006**, *177*, 132-135.
- Airenne T.T., Nymalm Y., Kidron H., Smith D.J., Pihlavisto M., Salmi M., Jalkanen S., Johnson M.S., Salminen T.A., *Protein Science*, **2005**, *14*, 1964-1974.
- Albericio F., Zorzano A., Marti L., Royo M., Yraola F., *PCT Int. Appl.*, **2006**, WO 2006061140.
- Azevedo L.C.P., M. de A. Pedro., Souza L.C., de Souza H.P., Janiszewski M., da Luz P.L., Laurindo F.R.M., *Cardiovascular Research*, **2000**, *47*, 436-445.
- Bairras C., Ferrand C., Atgié C., *J. Physiol. Biochem.*, **2003**, *59*, 161-168.
- Boomsma F., Bhaggoe U.M., van der Houwen A.M.B., van den Meiracker A.H., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1647*, 48-54.
- Boomsma F., Hut H., Bhaggoe U., van der Houwen A., van der Meiracker A., *Med Sci. Monit*, **2005**, *11(4)*:RA 122-126.
- Bour S., Daviaud D., Gres S., Lefort C., Prévot D., Zorzano A., Wabitsch M., Saulnier-Blache J.S., Valet P., Carpéné C., *Biochimie*, **2007**, *89*, 916-925.
- Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254.
- Brazeau B.J., Johnson B.J., Wilmot C.M., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, *428*, 22-31.
- Cantor C.R, Schimmel P.R, *Biophysical Chemistry*, *W.H. Freeman and Company*, *New York*, **1980**, *Part I: The conformation of biological macromolecules*, 279-288.
- Conklin D.J., Cowley H.R., Wiechman R.J., Johnson G.H., Trent M.B., Boor P.J., *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*, *2004*, *286*, 667-676.
- del Mar Hernandez M. , Esteba M., Szabo P., Boada M., Unzeta M., *Neuroscience Lett.*, **2005**, *384*, 183-187.
- Di Paolo M.L., Pesce C., Lunelli M., Scarpa M., Rigo A., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2007**, *465*, 50-60.
- Dooley D.M., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, *4*, 1-11.
- Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D., *Free Radical Biology & Medicine*, **2003**, *35*, 236-256.
- Fersth A., *Enzyme Structure and Mechanism*, *2nd ed.*, *W.H. Freeman and Company*, *New York*, **1985**, 306-324.

- Fowler C.J., Tipton K.F., *Biochem Pharmacol*, **1981**, 30, 3329-3332.
- García-Vicente S., Abella A., Viguerie N., Ros-Baró A., Camps M., Testar X., Palacín M., Zorzano A., Martí L., *J. Physiol. Biochem.*, **2005**, 61, 395-402.
- Gorkin V.Z., *Amine Oxidases in Clinical Research Pergamon Press, Oxford*, **1983**.
- Guo Honghui, Ling Wenhua, Wang Qing, Liu Chi, Hu Yan, Xia Min, *Biochemical Pharmacology*, **2008**, 75, 1393-1401.
- Heider P., Wildgruber M.G., Weiss W., Berger H.J., Henning E.H., Wolf O., *J. Vasc. Surg.*, **2006**, 43, 969-977.
- Holt A., Degenhardt O.S., Berry P.D., Kaptj J.S., Mithani S., Smith D.J., Di Paolo M.L., *J. Neural Transm.*, **2007**, DOI 10.1007/s00702-007-0680-1.
- Holt A., Smith D.J., Cendron L., Zanotti G., Rigo A., Di Paolo M. L., *Molecular Pharmacology*, **2008**, 73, 525-538.
- Jaakkola K., Nikula T., Holopainen R., Vähäsilta T., Matikainen M.T., Laukkanen M.L., Huupponen R., Halkola L., Nieminen L., Hiltunen J., Parviainen S., Clark M.R., Knuuti J., Savunen T., Käpä P., Voipio-Pulkki L.M., Jalkanen S., *Am. J. Pathol.*, **2000**, 157, 463-471.
- Jakobsson E., Nilsson J., Ogg D., Kleywegt G.J., *Acta Crystallogr*, **2005**, D61, 1550-1562.
- Jalkanen S., Salmi M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2008**, 28, 18-26.
- Jalkanen S., Salmi M., *EMBO J.*, **2001**, 20, 3893-3901.
- Jalkanen S., Salmi M., Jalkanen M., *PCT Int. Appl.*, **2005**, WO2005063261.
- Janes S.M., Palcic M.M., Scaman C.H., Smith A.J., Brown D.E., Dooley D.M., Mure M., Klinman J.P., *Biochemistry*, **1992**, 31, 12147-12154.
- Kagan H.M., Trackman P.C., *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.*, **1991**, 5, 206-210.
- Koudelka G.B., Hansen F.B., Ettinger M.J., *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 15561-15565.
- Kurkijarvi R., Adams D.H., Leino R., Mottonen T., Jalkanen S., Salmi M., *J. Immunol.*, **1998**, 161, 1549-1557.
- Leidler K. and Bunting P., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 2nd edn, **1973** p.p 52-53, Clarendon Press, Oxford.
- Lin Mao-Shin, Li Hung-yuan, Wei Jung-Nan, Lin Cheng-Hsin, Smith D.J., Vainio J., Shih Shyang-Rong, Chen Ying-Hui, Lin Lung-Chung, Kao Hsien-Li, Chuang Lee-Ming, Chen Ming-Fong, *Clinical Biochemistry*, **2008**, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.06.019.

- Lin Shyr-Yi, Wang Ching-Chiung, Lu Yeh-Lin, Wu Wen-Chun, Hou Wen-Chi, *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, *46*, 2485-2492.
- Lunelli M., Di Paolo M.L., Biadene M., Calderone V., Battistutta R., Scarpa M., Rigo A., Zanotti G., *J. Mol. Biol.*, **2005**, *346*, 991-1004.
- Lyles G.A., *Int. J. Biochem. Cell. Bioll.*, **1996**, *28*, 259-274.
- Madej A., Reich A., Orda A., Szepietowski J.C., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2007**, *21*, 72-78.
- Maula S.M., Salminen T., Kaitaniemi S., Nymalm Y., Smith D.J., Jalkanen S., *Eur. J. Immunol.*, **2005**, *35*, 2718-2727.
- Morgan D.M., *Biochem Soc Trans*, **1985**, *13*, 322-326.
- Morin N., Lizcano J., Fontana E., Marti L., Smih F., Rouet P., Prevot D., Zorzano A., Unzeta M., Carpenè C., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2001**, *297*, 563-572.
- Morin N., Visentin V., Calise D., Marti L., Zorzano A., Testar X., Valet P., Fischer Y., Carpené C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, *303*, 1238-1247.
- Mure M., Mills S.A., Klinman J.P., *Biochemistry*, **2002**, *41*, 9269-9278.
- Obata T., Yamanaka Y., *Neurosci. Lett.*, **2000**, *286*, 131-133.
- Öhman J., Jakobsson E., Källström U., Elmblad A., Ansari A., Kalderén C., Elinor R., Danielsson E., Gustavsson A.L., Varadi A., Ekblom J., Holmgren E., Doverskog M., Abrahmsén L., Nilsson J., *Prot Expr Pur*, **2006**, *46*, 321-331.
- Padiglia A., Medda R., Belevi A., Agostinelli E., Morpurgo L., Mondovì B., Agrò A.F., Floris G., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, *35*-42.
- Rigo A., Viglino P., Rotilio G., *Anal. Biochem.*, **1975**, *68*, 1-8.
- Roessner V., Weber A., Becker A., Beck G., Frieling H., Bleich S., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2007**, *63*, 425-429.
- Roessner V., Weber A., Becker A., Beck G., Kornhuber J., Frieling H., Bleich S., *Progress in. Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **2006**, *30*, 906-909.
- Salmi M., Jalkanen S., *Nat Rev Immunol*, **2005**, *5*, 760-771.
- Salmi M., Jalkanen S., *Science*, **1992**, *257*, 1407-1409.
- Salmi M., Tohka S., Jalkanen S., *Circ. Res.*, **2000**, *86*, 1245-1251.
- Schwelberger H.G., *J. Neural Transm*, **2007**, *114*, 757-762.

- Smith D.J., Salmi M., Bono P., Hellman J., Leu T., Jalkanen S., *J. Exp. Med.*, **1998**, *188*, 17-27.
- Stolen C.M., Marttila-Ichihara F., Koskinen K., Yegutkin G.G., Turja R., Bono P., Skurnik M., Hanninen A., Jalkanen S., Salmi M., *Immunity*, **2005**, *22*, 105-115.
- Szasz T., Thakali K., Fink G.D., Watts S.W., *Exp. Biol. Med.*, **2007**, *232*, 27-37.
- Tipton K.F, Dixon H.B, *Methods Enzymol*, **1979**, *63*, 183-234.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J., *Biochemistry (proc. Natl. Acad. Sci., USA)*, **1979**, *76*, 4350-4354.
- Tsuda T., *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 642-646.
- Uçar G., *J. Biochem*, **2004**, *29*, 247-254.
- Vainio P.J., Kortekangas-Savolainen O., Mikkola J.H., Jaakkola K., Kalimo K., Jalkanen S., Veromaa T., *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, *96*, 429-435.
- Valenca S.S., Bezerra F.S., Lopes A.A., Souza B.R, Cavalcante M.C.M., Lima A.L, Koats V.L.G., Porto L.C. *Environ. Res.*, **2008**, doi:10.1016/j.envres.2008.07.001.
- Van Dijk J., Boomsma F., Alberts G., Man in 't Veld A.J., Schalekamp M.A.D.H., *Journal of Chromatography B*, **1995**, *663*, 43-50.
- Visentin V., Prévot D., Marti L., Carpené C., *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *466*, 235-243.
- Yraola F., Garcia-Vicente S., Fernandez-Recio J., Albericio F., Zorzano A., Marti L., Royo M., *J. Med Chem.*, **2006**, *49*, 6197-6208.
- Yu P.H., Wright S., Fan E.H., Lun Z.R, Gubsdne-Harberle D., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1647*, 193-199.
- Zhou M. and Voloshina P.N., *Anal. Biochem.*, **1997**, *253*, 169-174.
- Zorzano A., Abella A., Marti L., Carpenè C., Palacin M., Testar X., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1647*, 3-9.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine e hanno incoraggiato il mio lavoro di ricerca e che hanno permesso la stesura di questa tesi.

I miei più sinceri ringraziamenti vanno a chi mi ha seguito in questi tre anni di dottorato:

la Dott.ssa Maria Luisa DI PAOLO, per la fiducia fin da subito dimostratami nell'avermi accolta come sua dottoranda, per avermi seguita durante lo svolgimento del lavoro di dottorato con consigli e confronti che mi hanno aiutato ad intraprendere, ogni volta, le scelte più appropriate, per la continua disponibilità e prontezza nei chiarimenti e suggerimenti, per avermi guidato con i suoi insegnamenti durante il periodo di questo percorso formativo;

il Prof. Adelio RIGO, per avermi dato la possibilità di continuare il mio ciclo di studi con lo svolgimento di un dottorato di ricerca all'interno del suo laboratorio, per l'occasione che mi ha dato di imparare nuove tecniche di laboratorio, per la professionalità che mi ha trasmesso nell'affrontare il lavoro di ricerca, per la creazione di un rapporto familiare nel quale ogni giorno in questi tre anni mi sono sentita sempre accolta.