

Farmacologia cellulare e molecolare

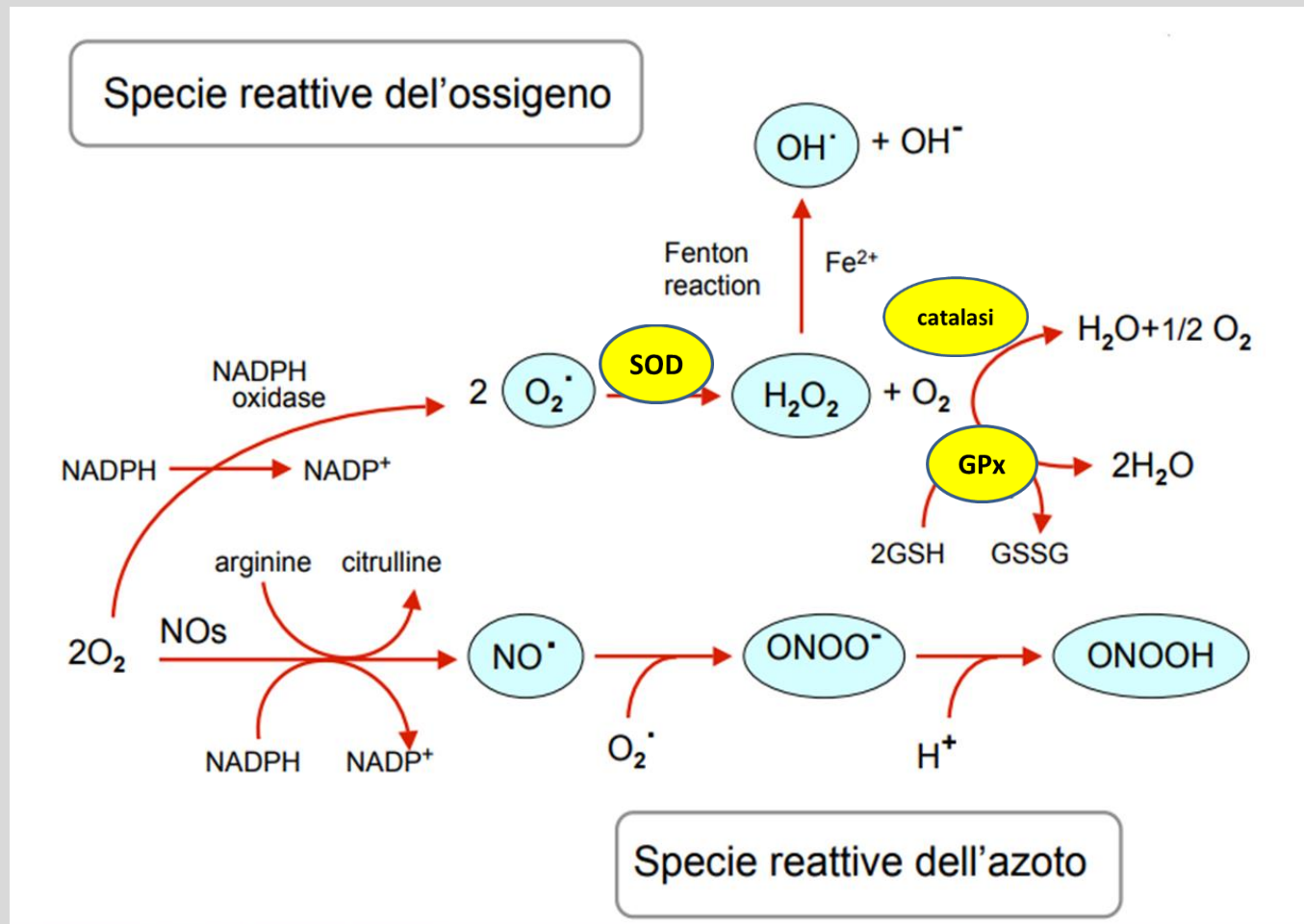
PR

Stress ossidativo e proteasoma

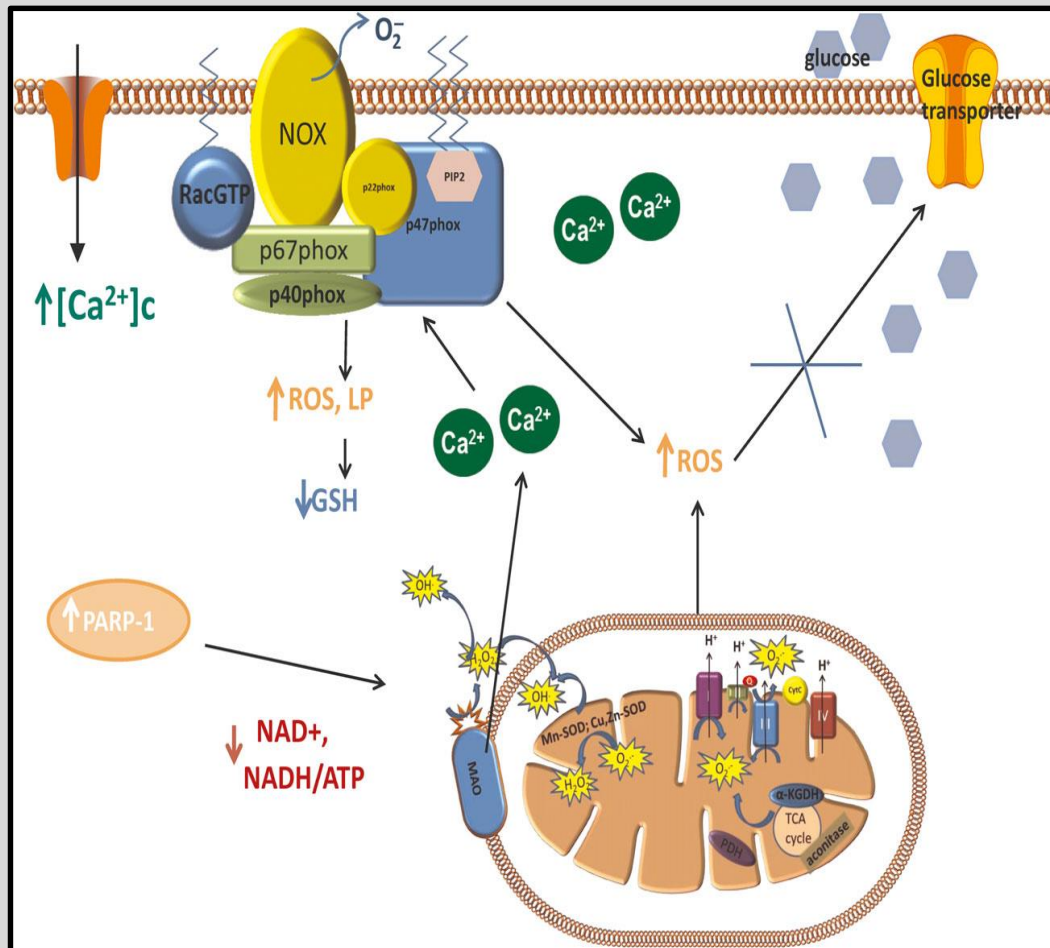
Dott.ssa Laura Rullo

PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

I radicali dell'ossigeno come il superossido e il radicale ossidrilico sono specie dotate di elevata reattività chimica in quanto contenendo elettroni spaiati tendono a reagire rapidamente con diverse molecole (lipidi, acidi nucleici e proteine).



“ROS-INDUCED ROS”

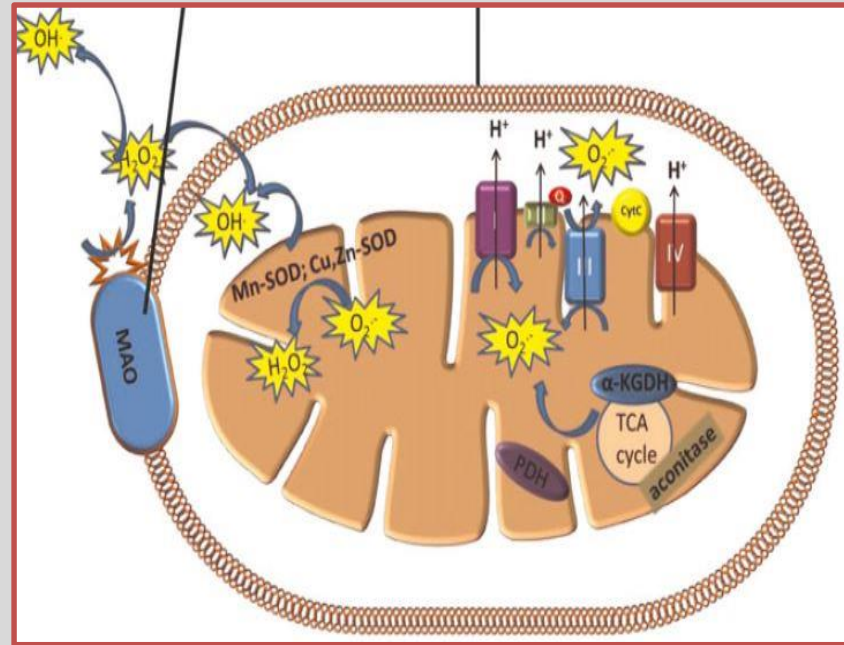


La maggior parte dei ROS vengono prodotti a livello mitocondriale.

In determinate condizioni la produzione dei ROS può avvenire anche ad opera di altri enzimi come **NADPH ossidasi**, **XANTINA ossidasi**

(P.R. Angelova and A.Y. Abramov 2018)

MITOCONDRIO



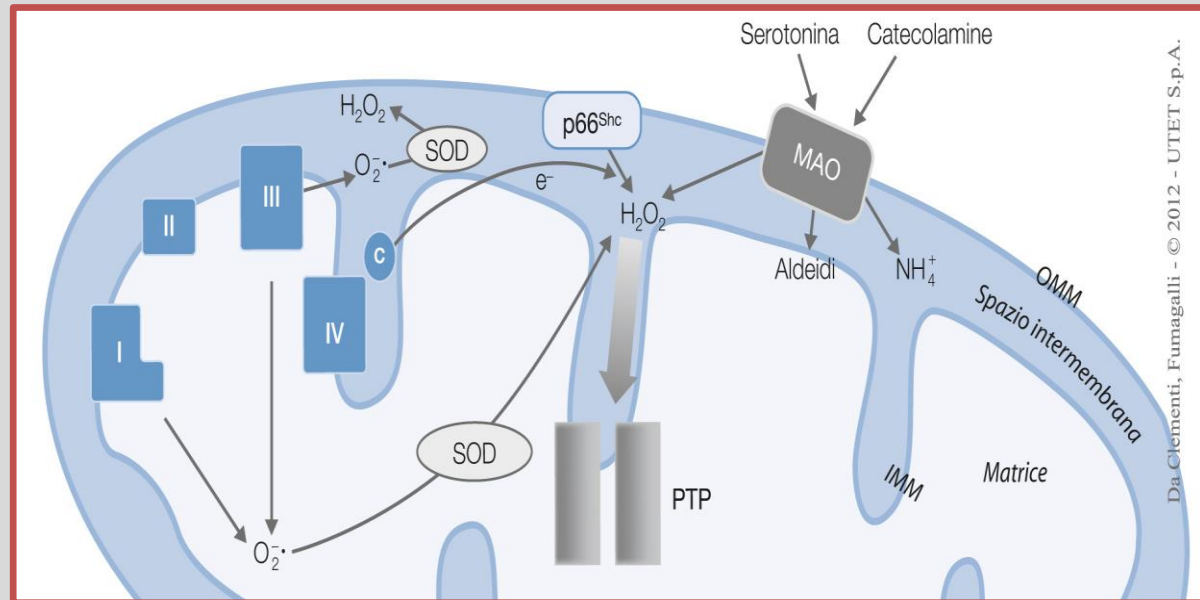
- Metabolismo energetico
- **bilancio redox**
- sopravvivenza cellulare
- metabolismo del calcio



- dismetabolismo energetico
- **stress ossidativo**
- Apoptosi
- alterazioni metabolismo del calcio

I mitocondri presentano una struttura a quattro strati costituita da:

- Membrana mitocondriale esterna
- Spazio intermembrana
- Membrana mitocondriale interna
- Matrice



I sistemi più caratterizzanti per la formazione mitocondriale dei ROS sono:

- **Catena di trasporto degli elettroni (catena respiratoria)**
- **Monoammino ossidasi (MAO)**
- **Proteina p66^{Shc}**

LA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI

La generazione dei ROS a livello mitocondriale avviene principalmente a livello della catena di trasporto degli elettroni (ETC) sulla membrana mitocondriale interna durante il processo di fosforilazione ossidativa → è un meccanismo essenziale per la produzione di ATP che rappresenta la maggiore fonte di energia per la cellula.

In questo processo sono coinvolti 5 grandi complessi proteici:

• COMPLESSO I

Il complesso I produce $O_2 \cdot$ che viene inviato verso la matrice mitocondriale

•COMPLESSO II

•COMPLESSO III

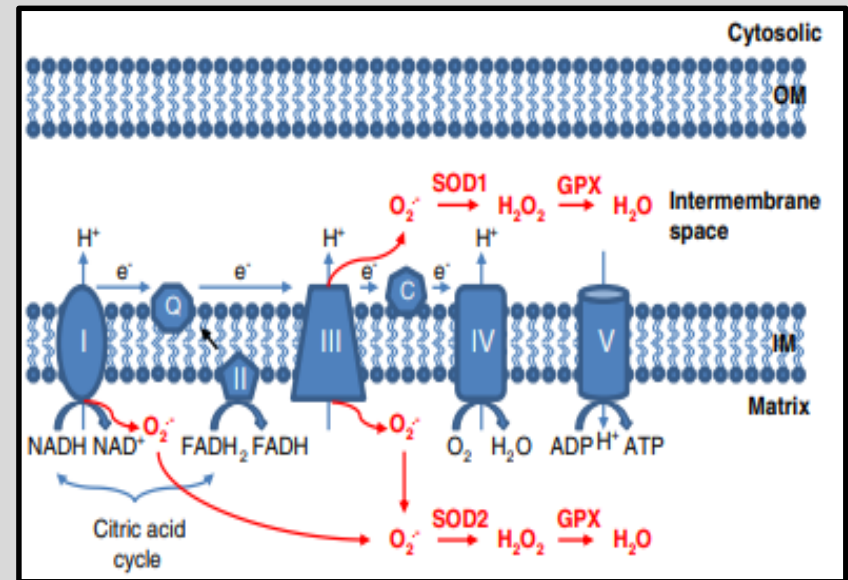
Il complesso III invia $O_2 \cdot$ sia verso la matrice mitocondriale che verso lo spazio intermembrana

Successivamente $O_2 \cdot$ viene rapidamente

trasformato in H_2O_2 dall'enzima **Superossido dismutasi (SOD)**

•COMPLESSO IV

È stato stimato che circa 0.2%-2% di O_2 consumato dai mitocondri genera $O_2 \cdot$ in direzione della matrice



PROTEINA p66^{Shc}

p66^{Shc} è localizzato all'interno dello spazio intermembrana mitocondriale.

Nella forma inattiva presenta un residuo di serina non fosforilato. In seguito alla sua fosforilazione viene trasferita dal citoplasma allo spazio intermembrana.

Quando è attiva può trasferire direttamente elettroni e favorire la formazione dei ROS.

A livello mitocondriale l'attivazione di tale proteina è impedita dall'azione della glutatione perossidasi (GSH)

MONOAMMINO OSSIDASI (MAO)

Le **MAO** sono enzimi localizzati a livello della membrana mitocondriale esterna responsabili della deaminazione ossidativa di neurotrasmettitori e ammine assunte con la dieta.

Se ne possono individuare due diverse isoforme **MAO-A** e **MAO-B**

Oltre a formare l'aldeide corrispondente al substrato amminico generano ammoniaca e H₂O₂

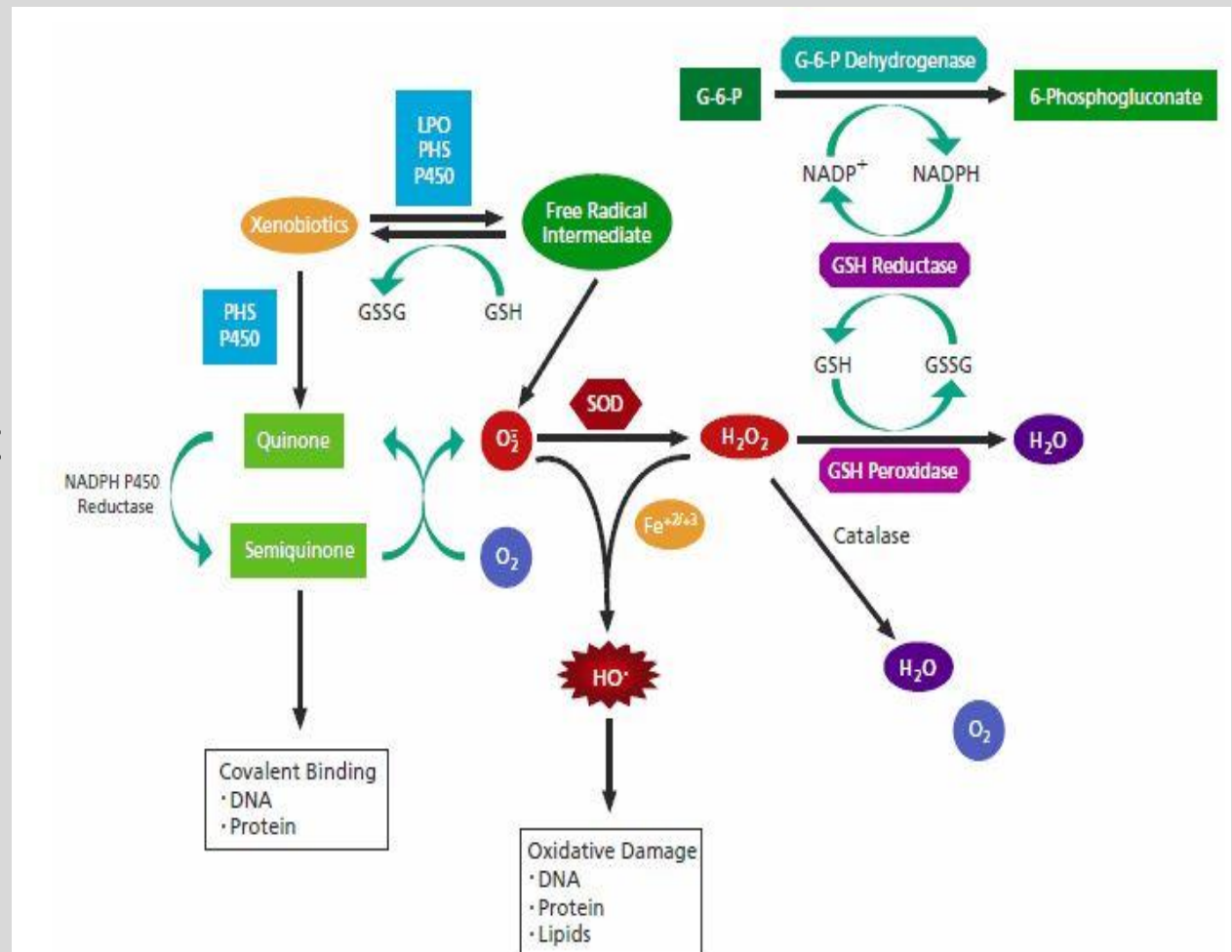
→ La quantità di H₂O₂ prodotta dalle MAO a livello mitocondriale **è 48 volte maggiore rispetto a quella prodotta dalla catene respiratoria.**

SISTEMA ANTIOSSIDANTE

Per evitare i danni ossidativi, la cellula ha sviluppato un sofisticato sistema di difesa nei confronti dei ROS (di natura enzimatica e non)

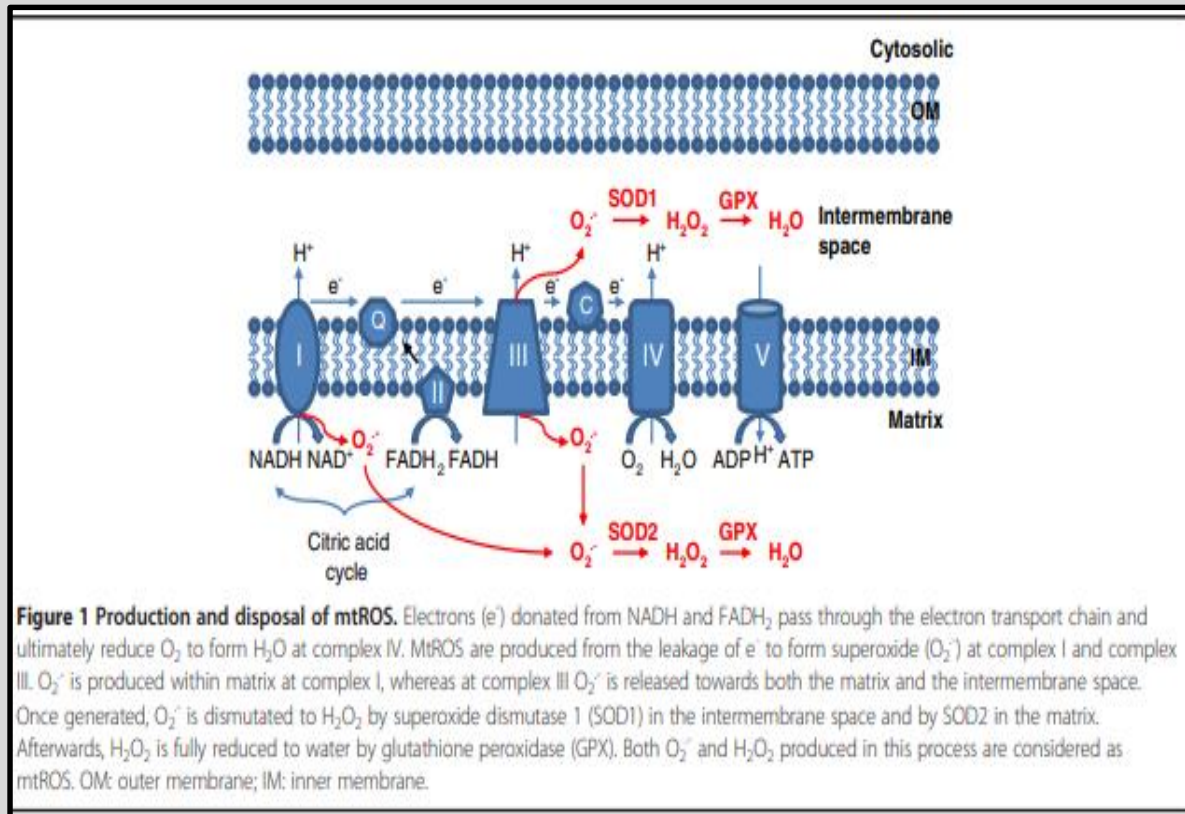
I principali enzimi responsabili per il bilancio redox intracellulare sono: *superossido dismutasi (SOD)*, *catalasi*, *glutatione perossidasi (GPx)*, *tioredossina* e *perossiredossina*

TUTTI QUESTI SISTEMI
COOPERANO
NELLA RIMOZIONE DELLE
SPECIE RADICALICHE



•La famiglia **SOD** catalizza il dismutazione di $O_2 \cdot^- \rightarrow H_2O_2$

•Successivamente, H_2O_2 è ridotto rapidamente ad H_2O da altri due enzimi, **CATALASI** e **GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx)**



SOD (Superossido dismutasi)

Sono state identificate tre isoforme di **SOD**:

- **SOD1 (CuZn-SOD)** è ampiamente distribuito nel citoplasma cellulare, nucleo e spazio intermembrana dei mitocondri
- **SOD2 (Mn-SOD)** è espressa solo nella matrice mitocondriale
- **SOD3** extracellulare

CATALASI

È un tetramero di quattro polipeptidi contenete quattro gruppi EME.

Le catalasi sono responsabili della riduzione del perossido di Idrogeno in acqua.

GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx)

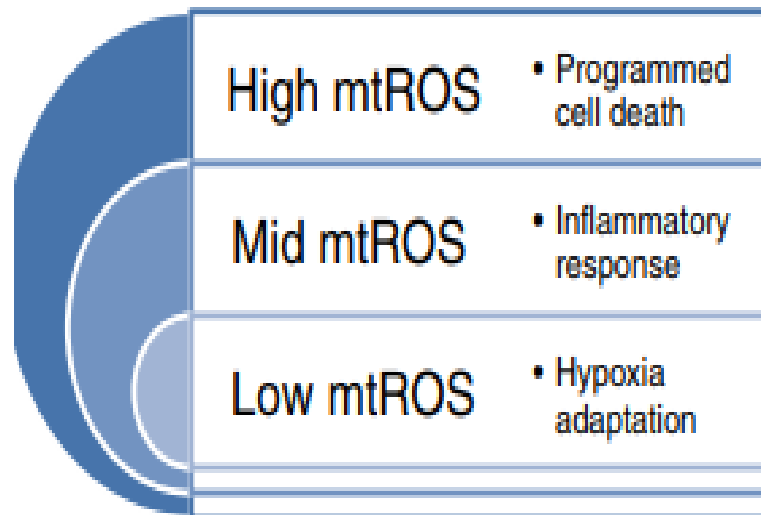
Catalizza l'inattivazione riduttiva del H_2O_2 utilizzando come cofattore il GLUTATIONE RIDOTTO (GSH)

I ROS vengono considerati come importanti molecole di segnalazione

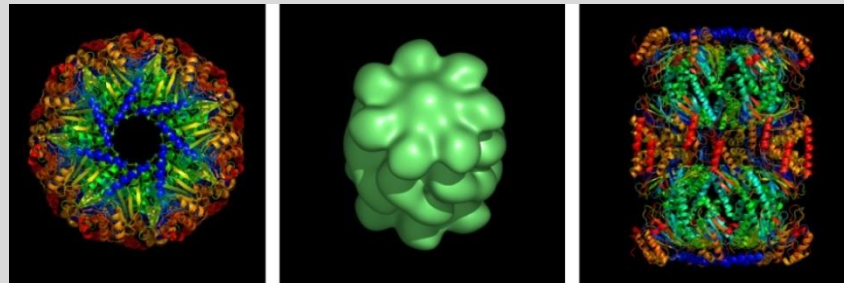
✓ **Bassi livelli di ROS** sono importanti per l'adattamento metabolico (es. in condizioni di ipossia)

✓ **Livelli di ROS moderati** sono coinvolti nella regolazione della risposta infiammatoria

✓ **Elevati livelli di ROS** attivano le vie apoptosi/autofagia e determinano la morte cellulare



**Il complesso del Proteasoma 26S e
il sistema
Ubiquitina Proteasoma (UPS)**



La sintesi accurata delle proteine e la loro degradazione sono due processi fondamentali che assicurano il mantenimento dell'omeostasi cellulare

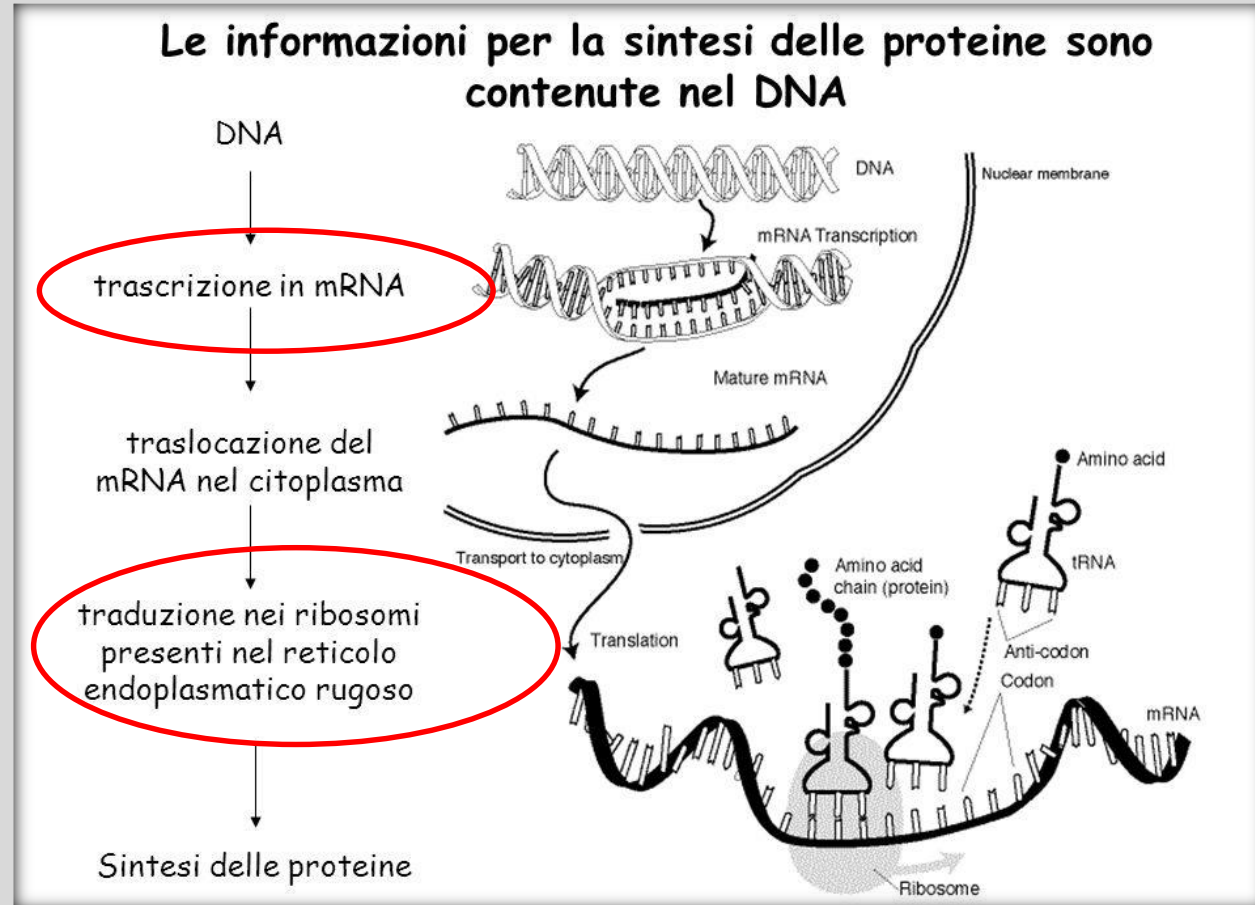
Sintesi delle proteine

L'informazione è contenuta nel DNA ed è trasferita all'RNA; quindi espressa nella struttura delle proteine

Processo a due stadi:

- **Trascrizione** – L'informazione è trascritta dal DNA in mRNA

- **Traduzione** – L'informazione contenuta nell' mRNA è tradotta nella struttura primaria delle proteine



Modificazioni post-traduzionali

- Le proteine subiscono delle trasformazioni che le rendono funzionanti

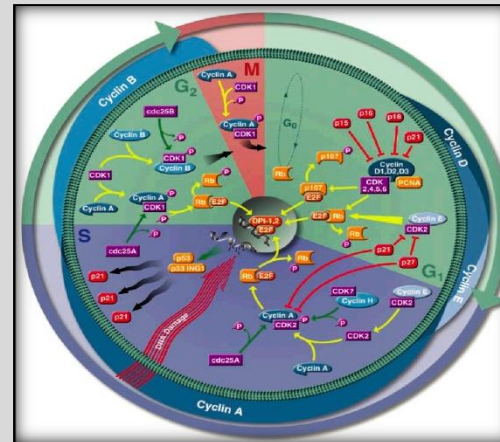
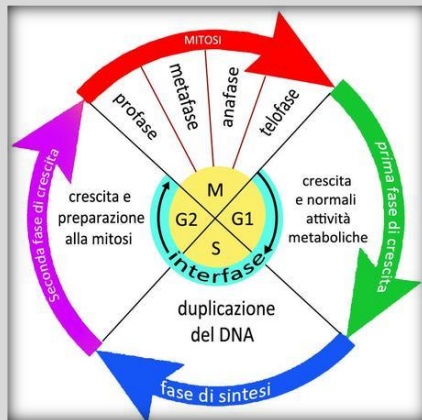
Turn-over delle proteine

Le proteine cellulari vengono regolarmente degradate e risintetizzate.

Degradazione delle proteine

La degradazione di specifiche proteine può essere regolata

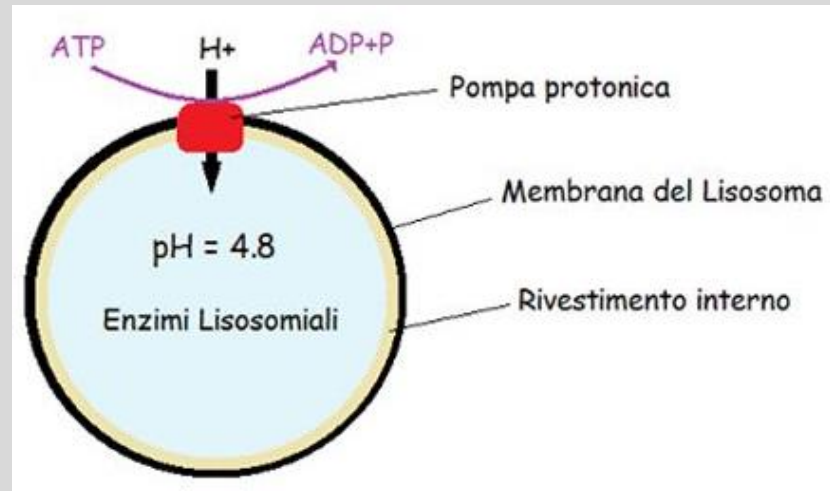
- Negli eucarioti il ciclo cellulare è altamente controllato, **alcuni enzimi regolatori del ciclo sono degradati in fasi particolari del ciclo cellulare** in risposta a segnali intra o extra-cellulari



Ci sono due principali sistemi di degradazione delle proteine :

1- Lisosomi = sono organelli di forma tondeggiante e lavorano come centri di demolizione di rifiuti e di sostanze estranee alla cellula.

Le proteine danneggiate possono entrare nei lisosomi via endocitosi; all'interno gli enzimi lisosomiali degradano i legami peptidici.



MECCANISMO:

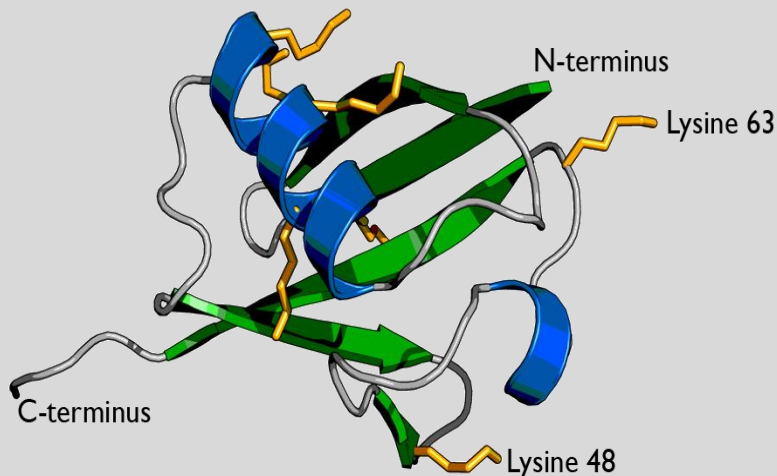
- La degradazione avviene per mezzo di **ENZIMI IDROLITICI** (**idrolasi acide**) contenuti nell'organello in grado di degradare PROTEINE, LIPIDI E CARBOIDRATI nei loro costituenti elementari per poi, quando possibile, venire riutilizzati in altro modo o essere espulsi.
- Questi enzimi **si attivano a PH bassi** (4,8 rispetto al citoplasma che ha un PH = 7) grazie al funzionamento di pompe protoniche che pompano all'interno ioni H⁺
- Il lisosoma **è protetto dall'azione enzimatica del suo contenuto** grazie alla particolare struttura tridimensionale delle proteine della sua membrana interna che riescono a proteggere i siti vulnerabili agli attacchi enzimatici.

2- Ubiquitina-Proteosoma = Le proteine sono marcate per la degradazione da catene di poli-ubiquitina (Ubq)

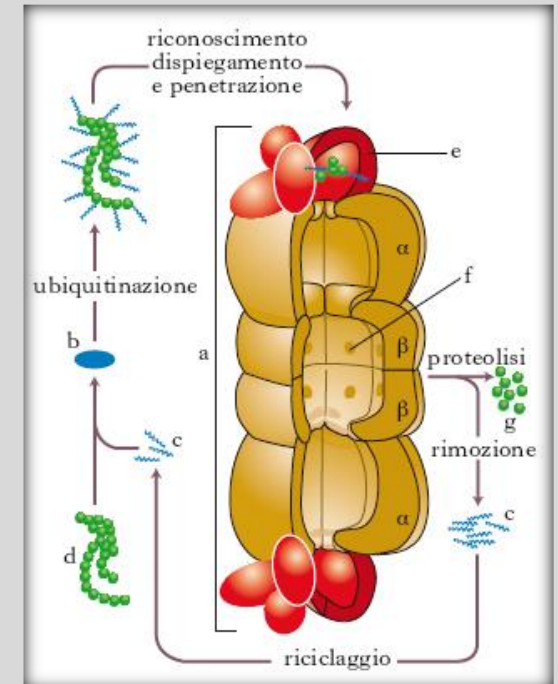
Il proteosoma 26S rompe la proteina in peptidi che a loro volta sono scissi in aminoacidi liberi da altri processi nella cellula

Il sistema di degradazione Ubiquitina-Proteosoma 26S è il principale sistema di degradazione delle proteine non lisosomiale chiamato Ubiquitin-Proteasome System (UPS)

UBIQUITINA



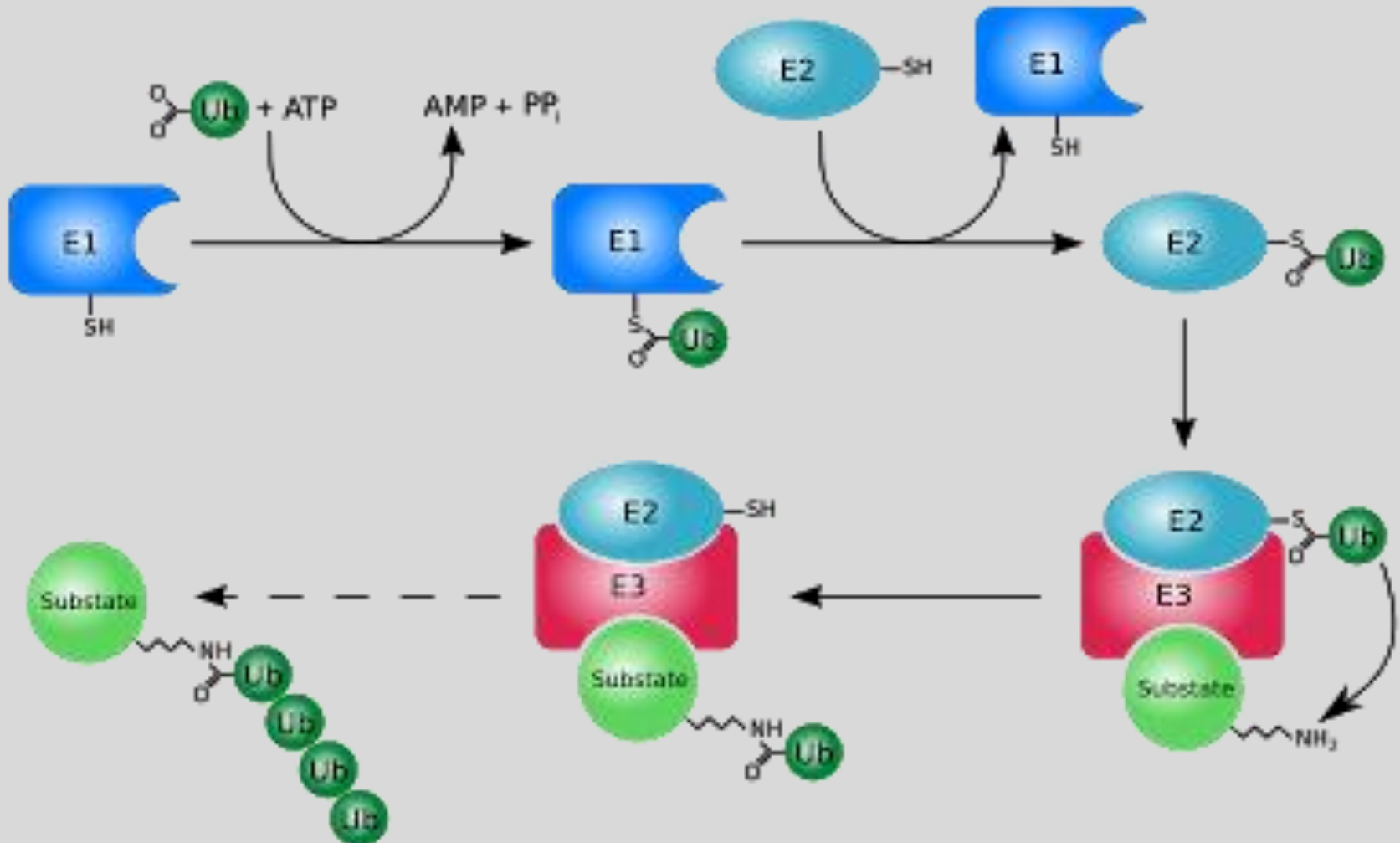
PROTEASOMA 26S

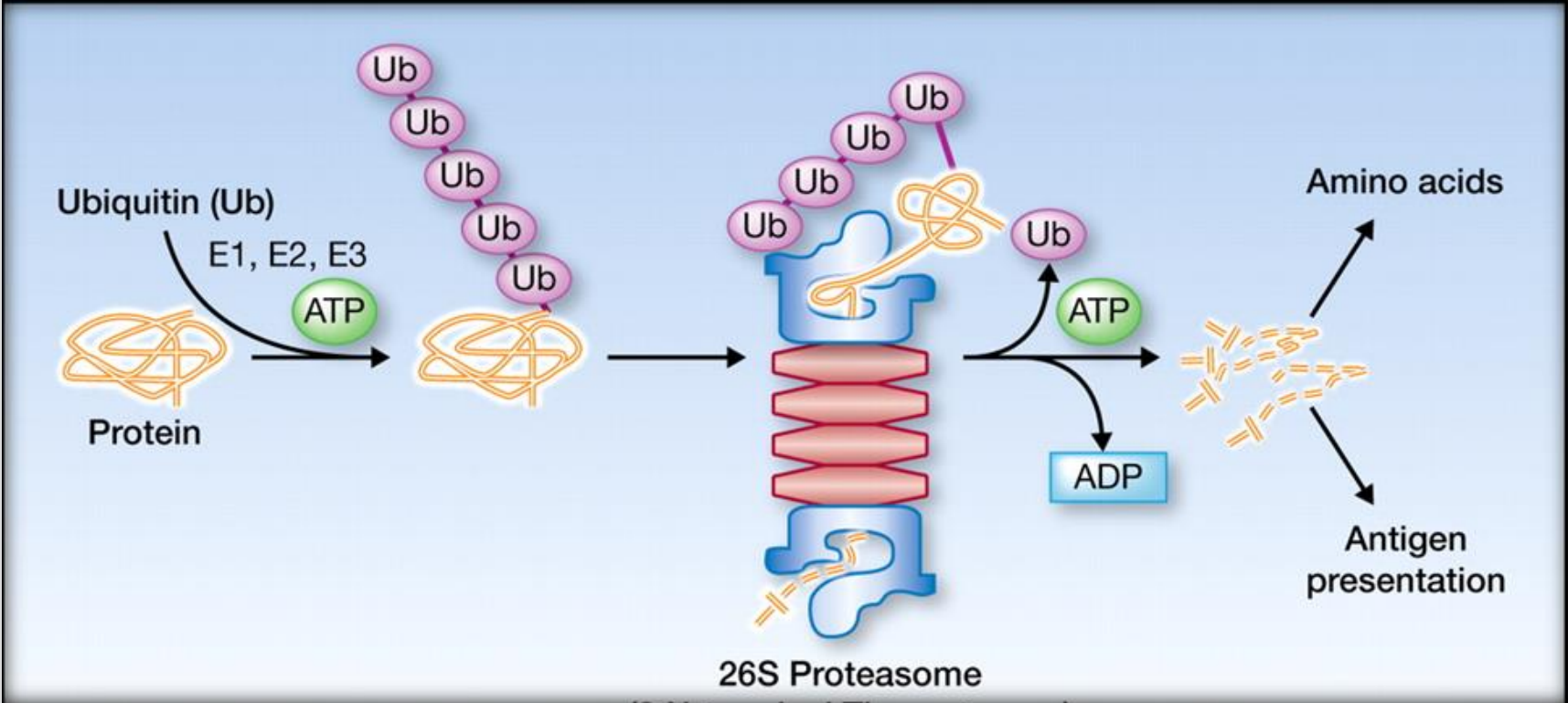


Si forma un legame isopeptidico tra il carbossi terminale dell' Ubq e un gruppo NH₂ di una lisina della proteina da degradare. Il processo è ATP dipendente

- Sono coinvolti tre enzimi

E1 = ubiquitin activating enzyme ; E2 = ubiquitin conjugating enzyme
E3 = ubiquitin ligase enzyme



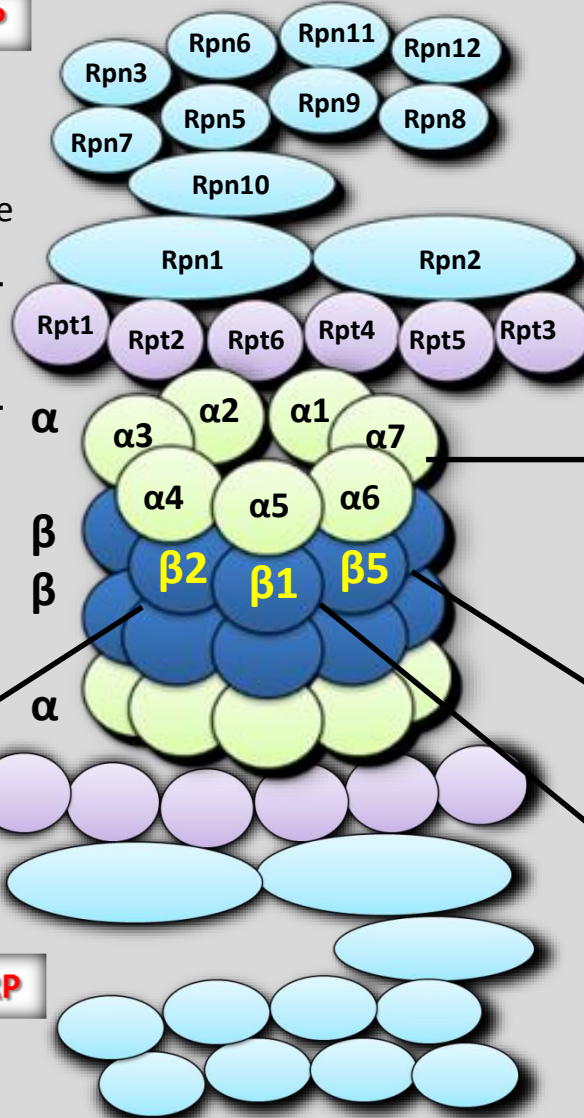


Il cuore di questo processo di degradazione è il Proteasoma 26S

Regulatory Particle: 19 S - RP

Rpt-family subunits

Assistono il processo di traslocazione delle proteine nel CORE
Formano l'interfaccia tra la porzione 19S e la porzione 20S



Rpn-family subunits

Sono coinvolte nella fase di riconoscimento del substrato ubiquitinato e successivamente operano il distacco della catena di poli-ubq.

7 α subunit types

Formano un poro assiale che consente il passaggio del substrato nella camera proteolitica

β 5 = chymotrypsin-like activity

β 1 = caspase-like activity

β 2 = trypsin-like activity

Core Particle: 20 S - CP
($\alpha_7, \beta_7, \beta_7, \alpha_7$)

Regulatory Particle: 19 S - RP

La fase di assemblaggio del complesso del Proteasoma 26S è uno step fondamentale e deve avvenire in maniera corretta per assicurare il corretto posizionamento delle singole subunità e quindi la loro funzione.

La degradazione delle proteine è un processo importante almeno quanto la loro sintesi, infatti, molti processi cellulari, quali:

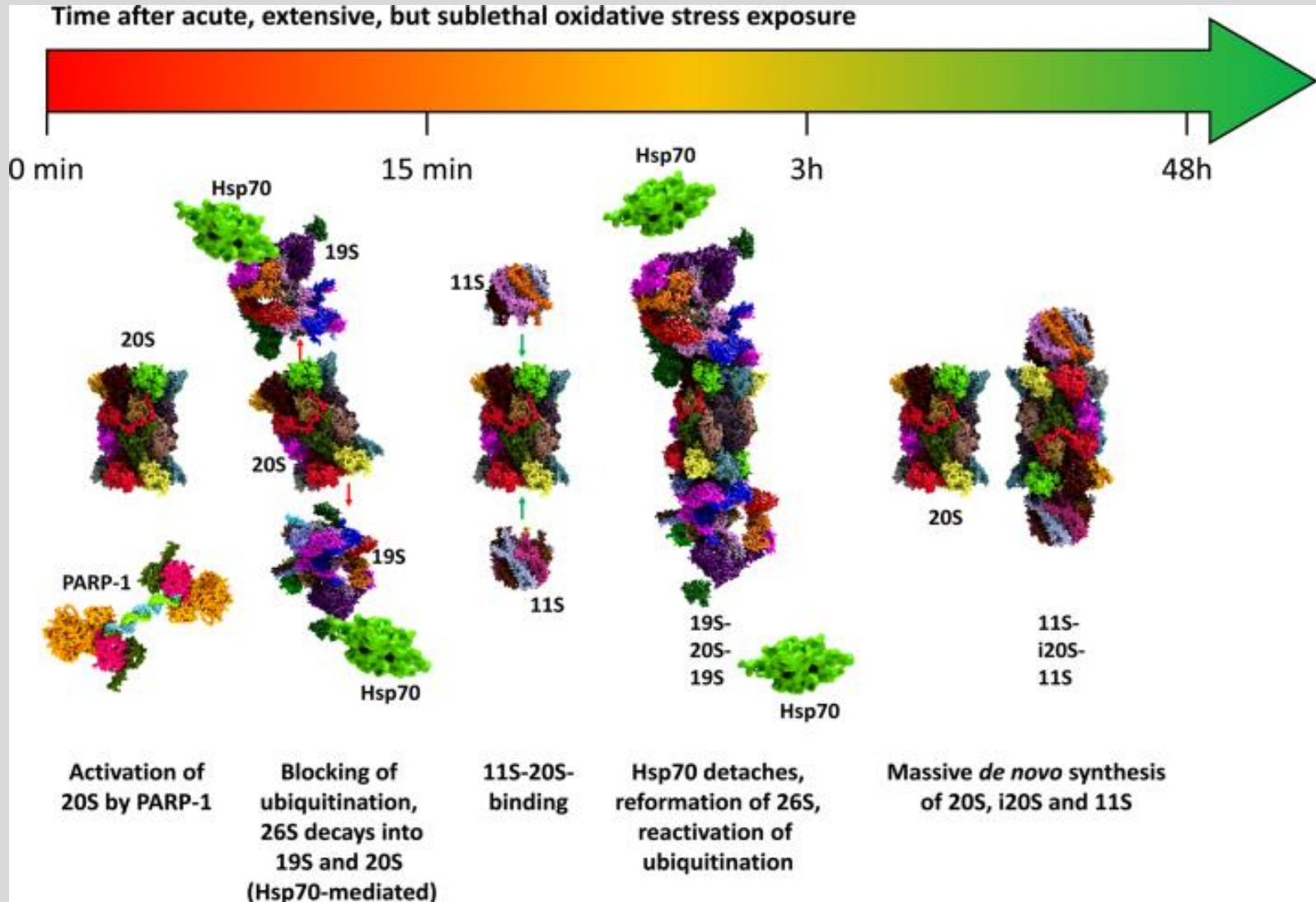
- La regolazione del ciclo e della divisione cellulare;
- lo sviluppo e il differenziamento cellulare;
- la risposta cellulare allo stress e agli stimoli extracellulari;
- la morfogenesi delle reti neuronali;
- la modulazione dei recettori e dei canali ionici di membrana;
- la regolazione della secrezione, la riparazione del DNA, la regolazione trascrizionale;
- la memoria a lungo termine;
- i ritmi circadiani, la regolazione delle risposte infiammatorie ed immunitarie;
- la biogenesi degli organelli.

Tutti questi processi **sono controllati da una rapida degradazione di proteine regolatorie specifiche**

La proteina da eliminare viene marcata tramite il legame covalente con l' Ubq e indirizzata verso la proteolisi ad opera di una grossa proteasi, presente in tutte le cellule eucariotiche a livello citoplasmatico e nucleare, nota come Proteasoma 26S.

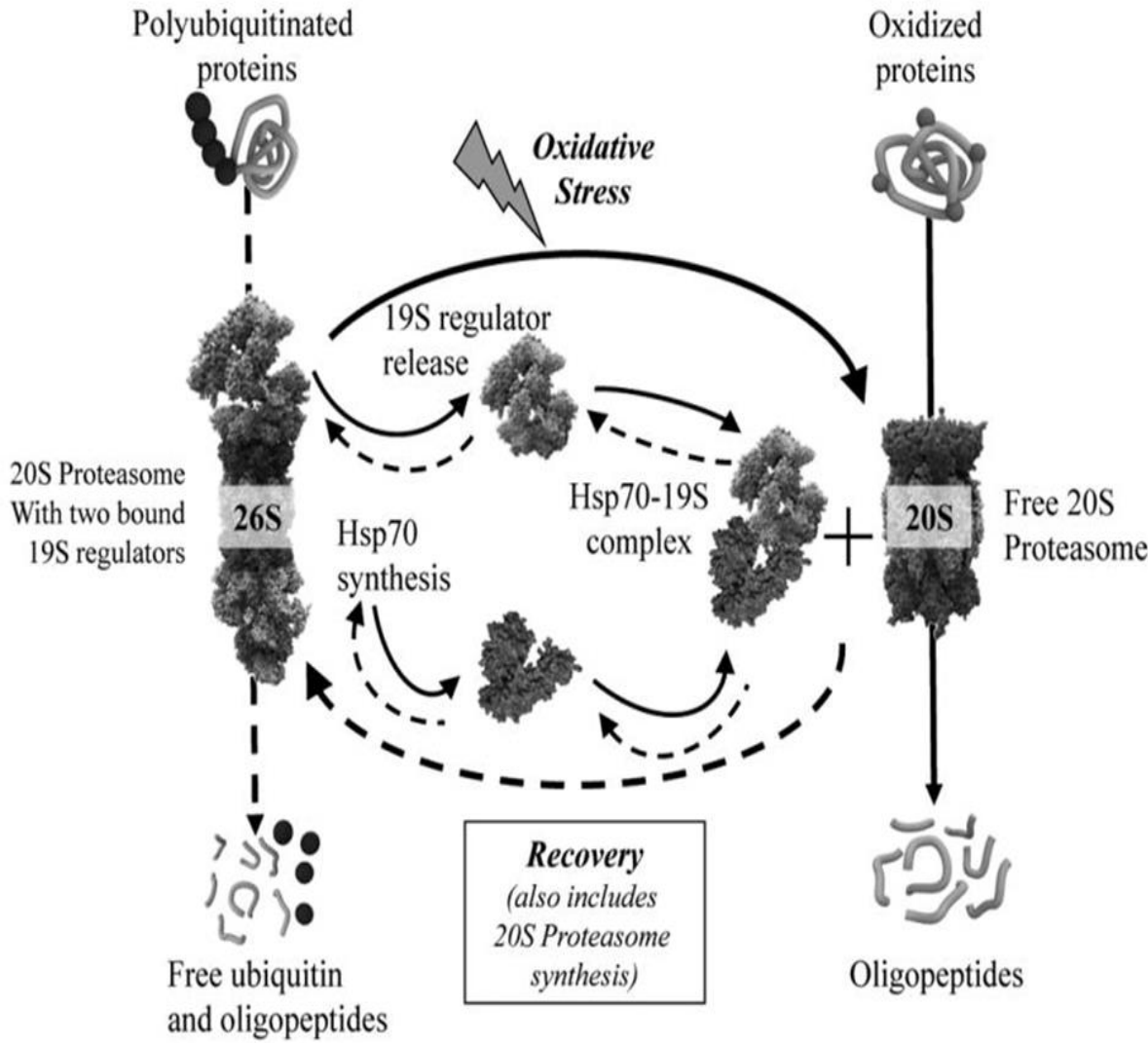
La conoscenza approfondita di questa via degradativa sta diventando sempre più importante perchè disfunzioni e malfunzionamenti in questa via degradativa risultano implicati nella trasformazione e nella **progressione tumorale**, in alcune **malattie genetiche** e in molte **malattie neurodegenerative** .

PROTEASOMA E STRESS OSSIDATIVO



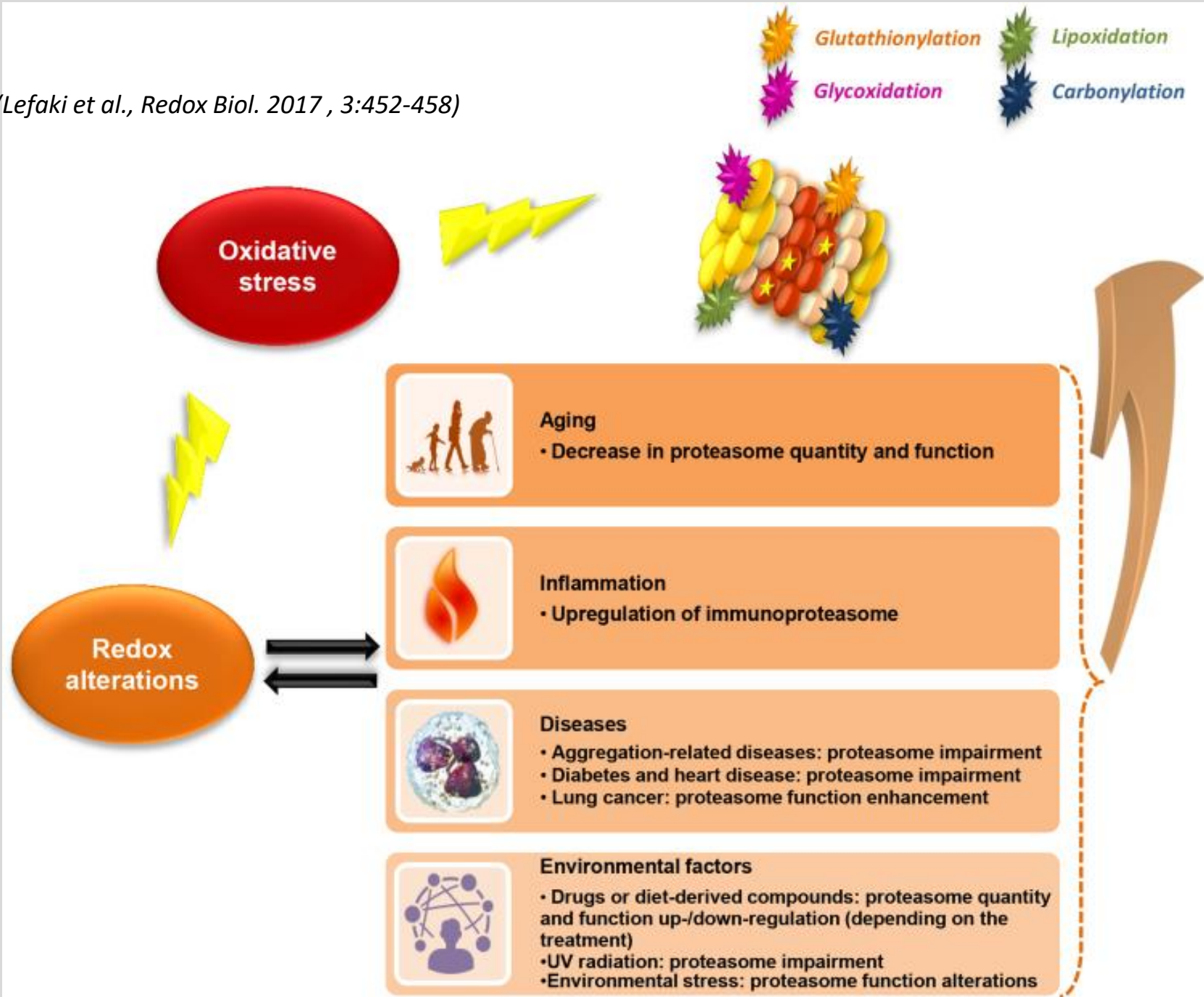
(Korovila, et al. Redox Biol. 2017, 13:550-567)

HSP70-mediated Dissociation of the 26S Proteasome During Oxidative Stress



Lo stress ossidativo induce l'attivazione del **proteasoma 20 s** e le proteine ossidate vengono degradate mediante un meccanismo **ATP-Ub indipendente**

(Lefaki et al., Redox Biol. 2017, 3:452-458)



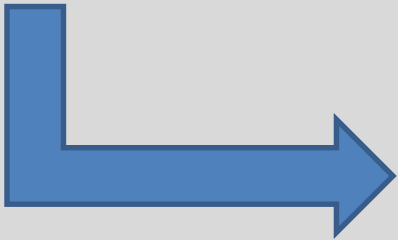
Stress ossidativo e proteasoma

– applicazioni in farmacologia

Coinvolgimento del sistema antiossidante nelle patologie

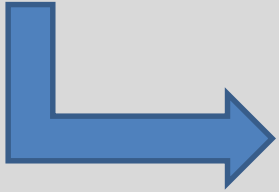
SOD e cancro

Prove crescenti dimostrano come le diverse isoforme (ricoprono ruoli molto diversi in virtù della loro distinta localizzazione cellulare) siano bersagli farmacologici potenzialmente **utili nel contrastare diverse forme tumorali.**



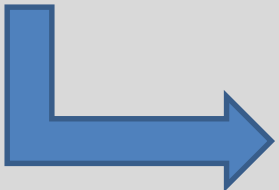
Le cellule tumorali hanno un alto contenuto di ROS responsabili dei danni a carico del DNA, di conseguenza → le cellule sane dipendono dagli antiossidanti attivati, come la SOD1, per prevenire un eccessivo danno cellulare e conseguente progressione del tumore

SOD e malattie neurodegenerative



L'isoforma **SOD2** sia fondamentale a livello neuronale per **garantire la sopravvivenza degli stessi neuroni** in seguito ad un insulto indotto da danno ossidativo.

Infatti → **topi *knockout* per il gene della SOD2 muoiono subito dopo la nascita affetti da severe patologie**, inclusa la neurodegenerazione

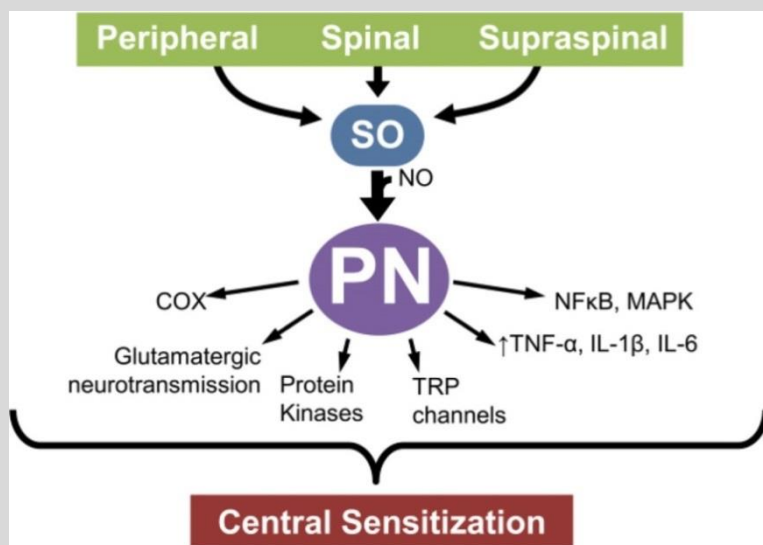


Studi più recenti hanno messo in evidenza che la **sclerosi laterale amiotrofica (SLA)** possa essere causata da **mutazioni genetiche anche a carico della SOD1**

Oggi le **terapie antiossidanti utilizzate con l'obiettivo di rimuovere la presenza delle ROS, sono di grande interesse**: a questo scopo si è pensato all'impiego di antiossidanti catalitici che **mimano le attività della SOD, delle CAT o di entrambe.**

Stress ossidativo nelle diverse condizioni di dolore

il coinvolgimento delle ROS sembra essere coinvolto nella patogenesi del dolore neuropatico → in particolare **le specie radicaliche contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento della sensibilizzazione sia centrale che periferica**



SO (anioni superossido) e NO (ossido nitrico) oltre che specie reattive, sono anche delle **potenti molecole pro-nocicettive**.

Infatti nei modelli di dolore neuropatico le specie radicaliche aumentano, e i sistemi antiossidanti lavorano con difficoltà

→ ha suggerito la possibilità di utilizzare delle molecole definite **SOD-mimetiche** (es. SC-72325) come **strumenti per studiare le vie di segnalazione in cui queste specie sono coinvolte**.

Stress ossidativo e dolore

Free Radic Biol Med. 2011 Sep 1;51(5):951-66. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026. Epub 2011 Jan 28.

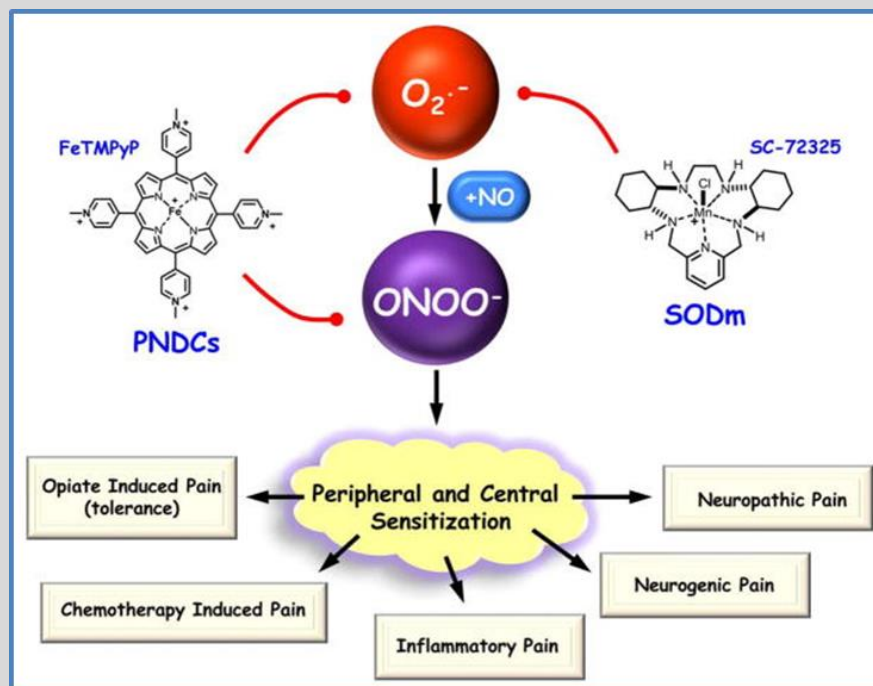
Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain.

Salvemini D¹, Little JW, Doyle T, Neumann WL.

Mini Rev Org Chem. 2013 Nov;10(4):367-372.

Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent.

Skrabalova J¹, Drastichova Z¹, Novotny J¹.



Neurosci Lett. 2010 Oct 11;483(2):85-9. doi: 10.1016/j.neulet.2010.07.013. Epub 2010 Jul 14.

Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance.

Doyle T¹, Bryant L, Muscoli C, Cuzzocrea S, Esposito E, Chen Z, Salvemini D.

Coinvolgimento del sistema UPS nelle patologie

1 - Cancro

2 - Dolore Neuropatico

3 - Malattie Neurodegenerative

4 - Dipendenza da sostanze d'abuso

5 - Malattie cardiovascolari

6 - Patologie del sistema immunitario

1- Cancro

I proteasomi controllano il tempo di emi-vita della maggior parte delle proteine regolatrici con vita breve, come per esempio quelle coinvolte nel ciclo cellulare (le cicline)

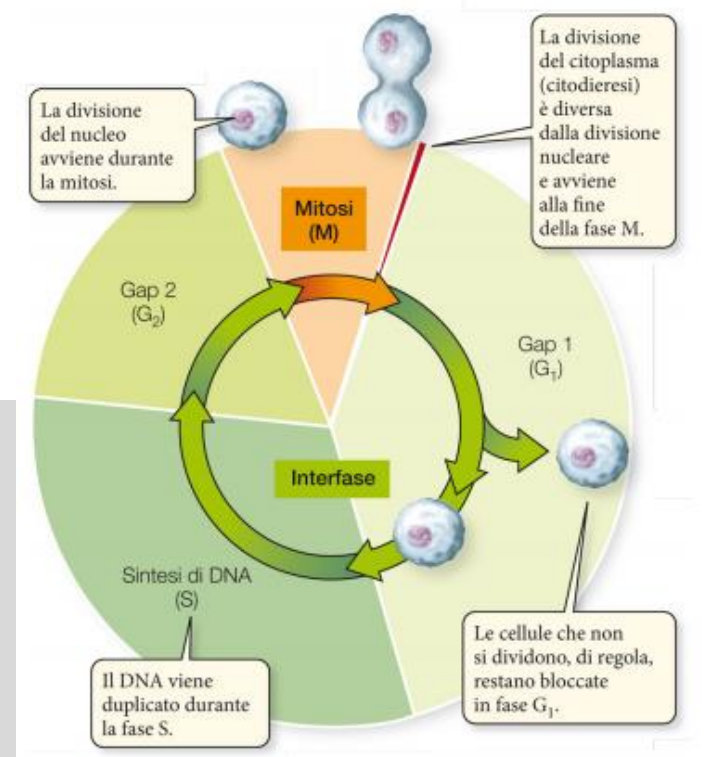
Le Cicline sono una famiglia di proteine che interessano la progressione del ciclo cellulare.

Una ciclina forma **complessi con l'enzima CDK** (Chinasi ciclina-dipendente)

→ **funzionano da «posti di blocco»:**

qui avviene il controllo dell'avanzamento del ciclo cellulare per stabilire se si può passare alla tappa successiva

→ Quindi, un proteasoma che funziona male può portare ad una regolazione anormale del ciclo cellulare e una proliferazione cellulare incontrollata.



Inibitori del proteasoma in uso come antitumorali:

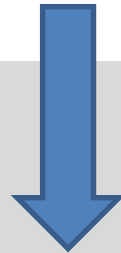
Bortezomib = il primo della famiglia degli inibitori del proteasoma ad essere stato sperimentato e approvato per l'uso nell'uomo (2003) → mieloma multiplo

Carfizomib = mieloma multiplo

Ixazomib = mieloma multiplo

Marizomib = entrato in fase I per il trattamento del mieloma multiplo

Attraversa la BEE, si dissocia più velocemente → per questo provoca minore neuropatia periferica e < effetti di tossicitàche spesso sono gli effetti collaterali più evidenti del Bortezomib ma anche in genere delle terapie antineoplastiche.



I **mieloma multiplo** è un tumore che colpisce le **plasmacellule**, cellule molto importanti del sistema immunitario, originate nel midollo osseo

Perché si usa un inibitore???

L'inibizione della funzione del proteasoma induce un arresto del ciclo cellulare e la morte della cellula. Le cellule tumorali sono più sensibili a questi effetti rispetto alle cellule sane, sia perché si dividono più rapidamente, e sia perché la maggior parte dei normali processi di regolazione sono interrotti. **APPARATO MOLECOLARE È CRUCIALE PER LA SOPRAVVIVENZA DELLE CELLULE. NEPPURE LA CELLULA TUMORALE PUÒ FARNE A MENO PER CONTINUARE A MOLTIPLICARSI**

Il meccanismo che porta ad una risposta finale diversa fra cellule sane e cellule cancerogene per quanto riguarda l'inibizione dei proteasomi **non è ancora del tutto chiaro. Tuttavia, è ben noto che le cellule canceroge sono più sensibili agli inibitori del proteasoma**

- Bortezomib (Velcade®)** è stato il primo inibitore del proteasoma utilizzato in terapia negli USA (13 Maggio 2003).
- MLN9708 è un nuovo inibitore del proteasoma** in corso di sperimentazione per il trattamento del mieloma multiplo

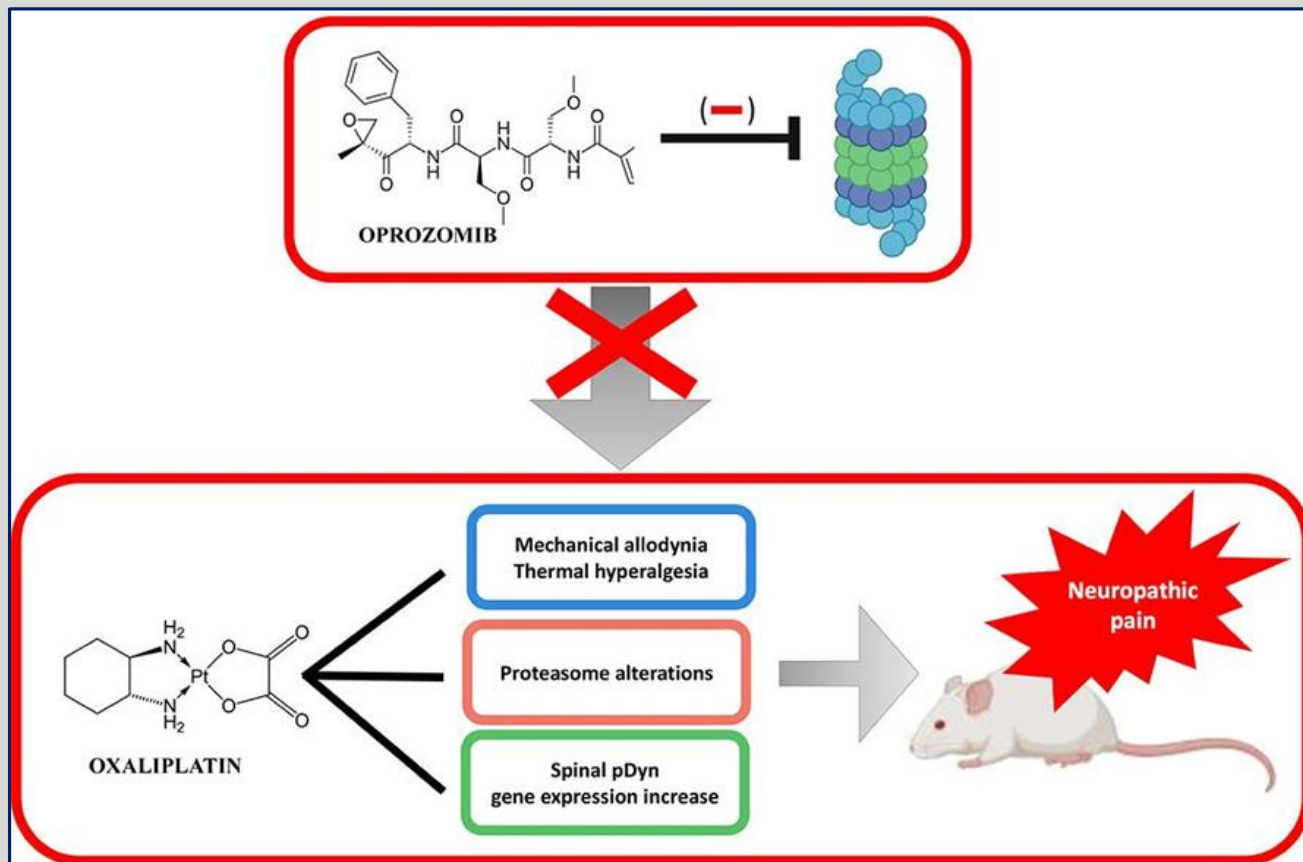
2 - Dolore Neuropatico

Coinvolgimento di macchinario UPS
nel *signaling* dei recettori oppioidi → associazione con analgesia e dolore neuropatico

Es. alcune evidenze sperimentali dimostrano che:

- **la down-regulation dei recettori oppioidi μ e δ** indotta dalla stimolazione prolungata con un agonista **può essere attenuata dagli inibitori del proteasoma**
- in assenza di agonista, **gli inibitori del proteasoma sono in grado di aumentare i livelli di espressione di questi recettori** → suggerendo così un ruolo importante dell'UPS sia nel turnover basale che in quello indotto dagli agonisti dei recettori oppioidi
- In una condizione di **dolore neuropatico (spinal nerve ligation , SNL)** si ha un **aumento dei livelli di dinorfina A** nel midollo spinale → gli inibitori del proteasoma sono in grado di ridurre la sintomatologia dolorosa insieme alla normalizzazione dei livelli di dinorfina

The active second-generation proteasome inhibitor oprozomib reverts the oxaliplatin-induced neuropathy symptoms



L'attività del proteasoma è sotto controllo ormonale

INSULINA *inibisce il proteasoma*

GLUCOCORTICOIDI *attivano il proteasoma*
azione coordinata per la mobilizzazione di amminoacidi
muscolari e per la gluconeogenesi epatica

ORMONI TIROIDEI *attivano il proteasoma*

CITOCINE *attivano il proteasoma*

sepsi, febbre, ustioni, cancro,...

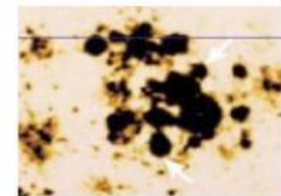
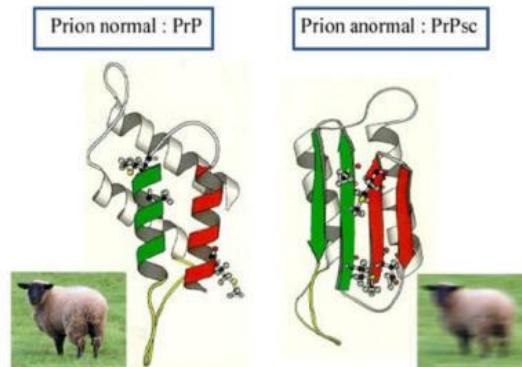
Aumento delle proteine della fase acuta ed aumento del
catabolismo proteico delle miofibrille mediato da un
aumento delle citochine TNF- α , IL-1, IL-6

3- Malattie Neurodegenerative

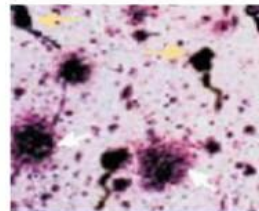
Il sistema UPS è **coinvolto nella detossificazione** e nella rimozione delle proteine danneggiate.

In condizioni di stress ed insulti a livello neuronale **l'UPS può essere direttamente o indirettamente danneggiato portando all'accumulo di proteina tossiche** che possono essere responsabili di disfunzioni e morte neuronale.

- **Malattia di Alzheimer**
- **Demenza**
- **Malattia di Parkinson**



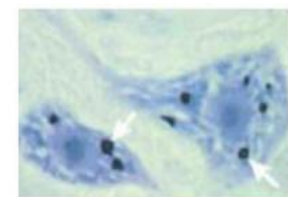
Accumulo di amiloide



Placche e grovigli in Alzheimer



Corpi di Levi nel Parkinson



Aggregati nella SLA

Malattie neurodegenerative

Parkinson's Disease

Caratterizzata da una progressiva e selettiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra pars compacta*

Una caratteristica patologica è la presenza di inclusioni citoplasmatiche dette corpi di Lewy → che contengono aggregati di diverse proteine e lipidi, che si ritrovano nei neuroni dopaminergici.

- **GENE PARKINA** = che è una proteina che appartiene alla classe di Enzimi ligasi E3 (partecipa al processo di ubq delle proteine)
- **α-SINUCLEINA** = si accumula nei pazienti malati di Parkinson formando degli aggregati tipici della malattia → aggregati difficili da eliminare per il complesso UPS.

CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013 Oct 28. [Epub ahead of print]

α-Synuclein Ubiquitination and Novel Therapeutic Targets for Parkinson's Disease.

Rott R, Szargel R, Shani V, Bisharat S, Engelender S.

Department of Pharmacology, The Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute, Technion-Israel Institute of Technology, Bat-Galim, Haifa 31096, Israel.
simone@tx.technion.ac.il.

4 - Dipendenza da sostanze d'abuso

Il coinvolgimento dell'UPS è stato anche proposto negli effetti neurochimici delle droghe d'abuso.

Recenti lavori scientifici hanno dimostrato che **il trattamento con morfina provoca la poli-ubiquitinazione delle proteine a livello del nucleo accumbens (NAc) e che i topi sottoposti all'infusione intra-NAc di lactacistina o MG-132 non hanno mostrato alcuna preferenza per il compartimento associato alla morfina**

Inoltre, l'iniezione di lactacystin prima di ogni sessione di autosomministrazione induce gli animali ad auto-somministrare meno eroina rispetto ai controlli



Neuropsychopharmacology (2013) 38, 778–790

© 2013 American College of Neuropsychopharmacology. All rights reserved 0893-133X/13

www.neuropsychopharmacology.org

A Critical Role for Protein Degradation in the Nucleus
Accumbens Core in Cocaine Reward Memory

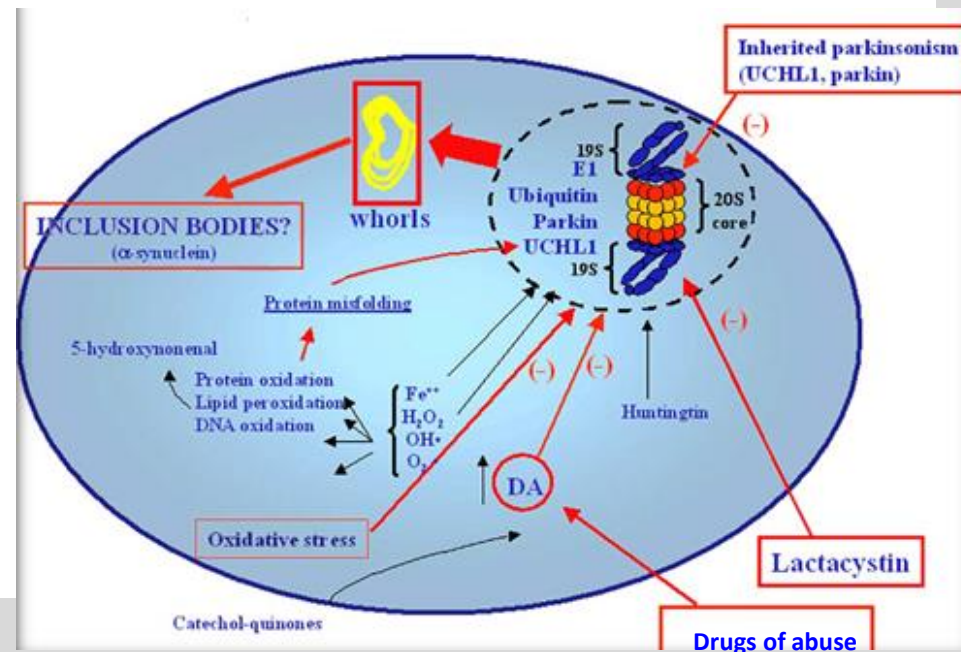
Coinvolgimento del proteasoma in risposta alle sostanze d'abuso

Il principale effetto dell'assunzione delle sostanze d'abuso è **l'aumento dei livelli di Dopamina a livello dell'area cerebrale del Nucleus Accumbens** = che provoca la cosiddetta sensazione di gratificazione (piacere)

Sembra che **l'aumento di dopamina** in seguito ad assunzione di queste sostanze **possa avere un effetto inibitorio sull'attività del Proteasoma**



che quindi non lavora più in maniera corretta e questo può provocare accumulo di proteine..
..come quelle tipiche delle malattie Neurodegenerative.



Questo suggerisce che il sistema UPS può essere un pathway comune alle malattie neurodegenerative e alle tossicodipendenze.

Activation of Antioxidant and Proteolytic Pathways in the Nigrostriatal Dopaminergic System After 3,4-Methylenedioxymethamphetamine Administration: Sex-Related Differences

