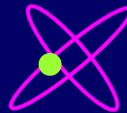




L'EPR svelato: una trappola per radicali liberi e stress ossidativo

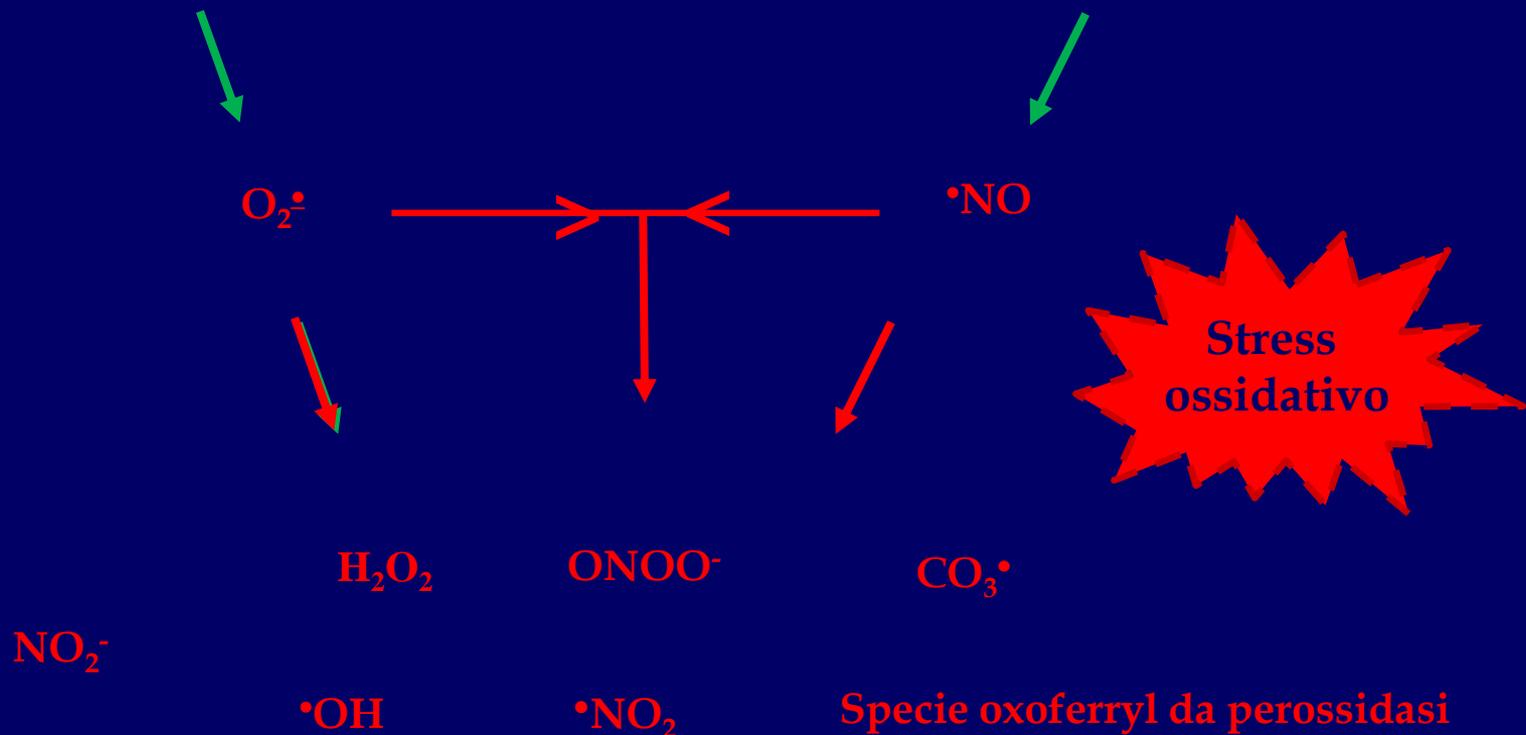
Catturare gli elettroni spaiati...
quali informazioni possiamo ottenere
in un sistema biologico?



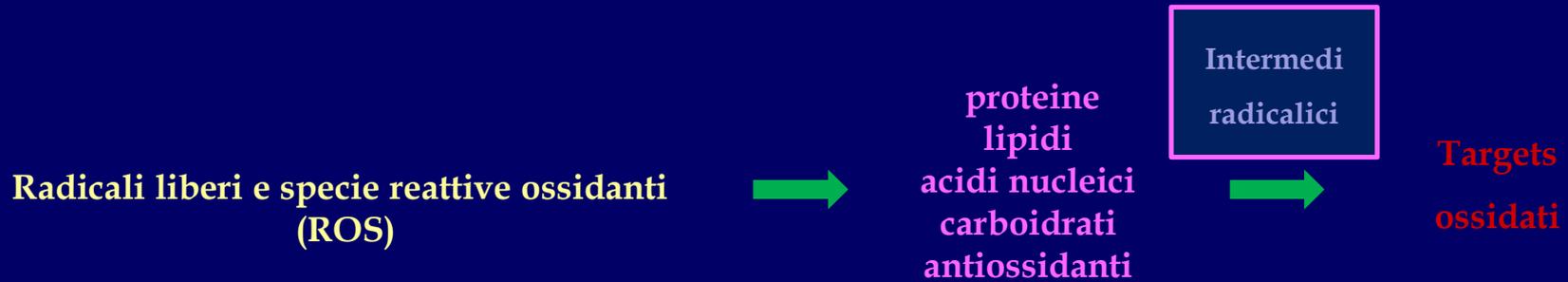
I radicali liberi e alcune specie ossidanti sono formati dai tessuti in condizioni fisiologiche e regolano il signaling e la funzionalità cellulare, ma aumentano significativamente in patologia

NADPH ossidasi (NOX, DUOX), ciclossigenasi,
xantina ossidasi, alcune chinasi, citocromi, ossido
nitrico sintetasi disaccoppiata, enzimi catena
respiratoria mitocondriale

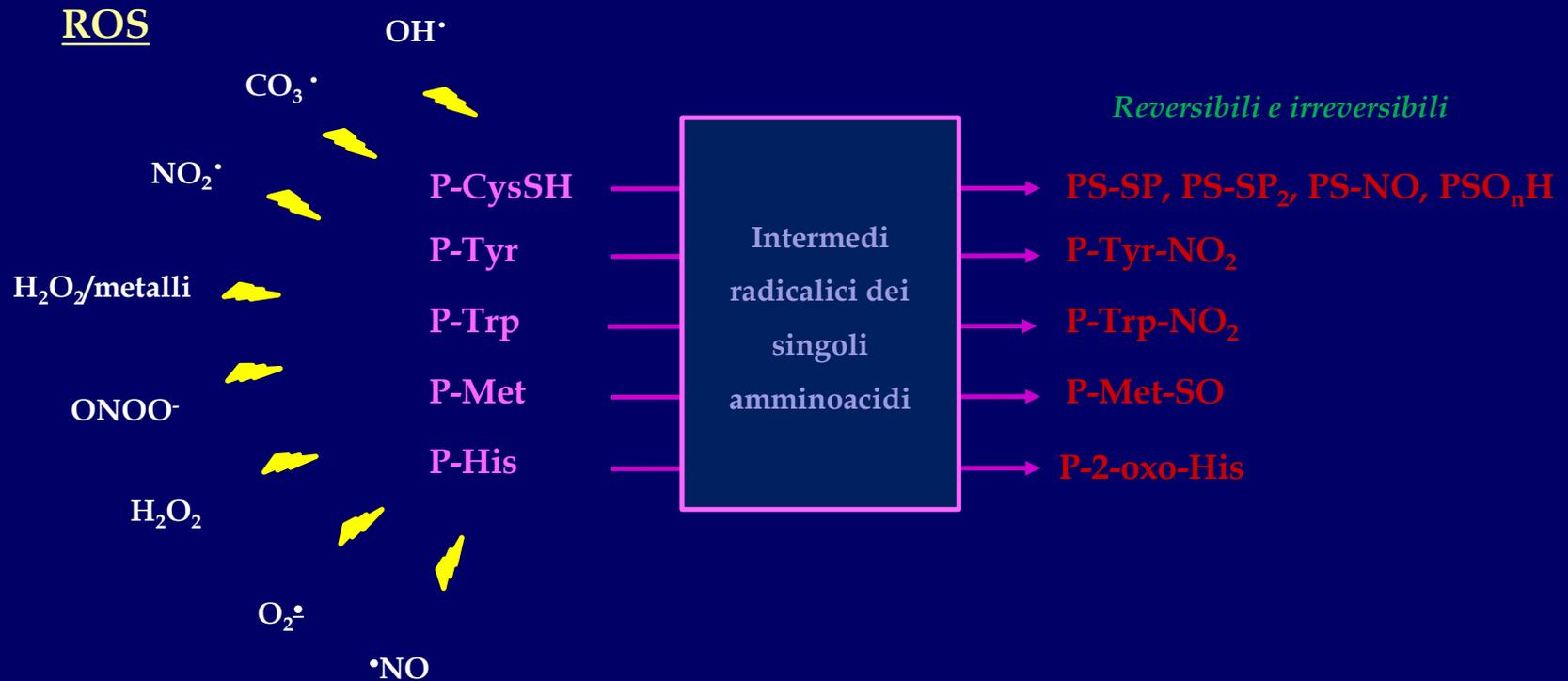
Ossido nitrico sintasi (costitutiva e inducibile),
attività nitrito-reduttasica



Radicali come biomarcatori diretti di stress ossidativo

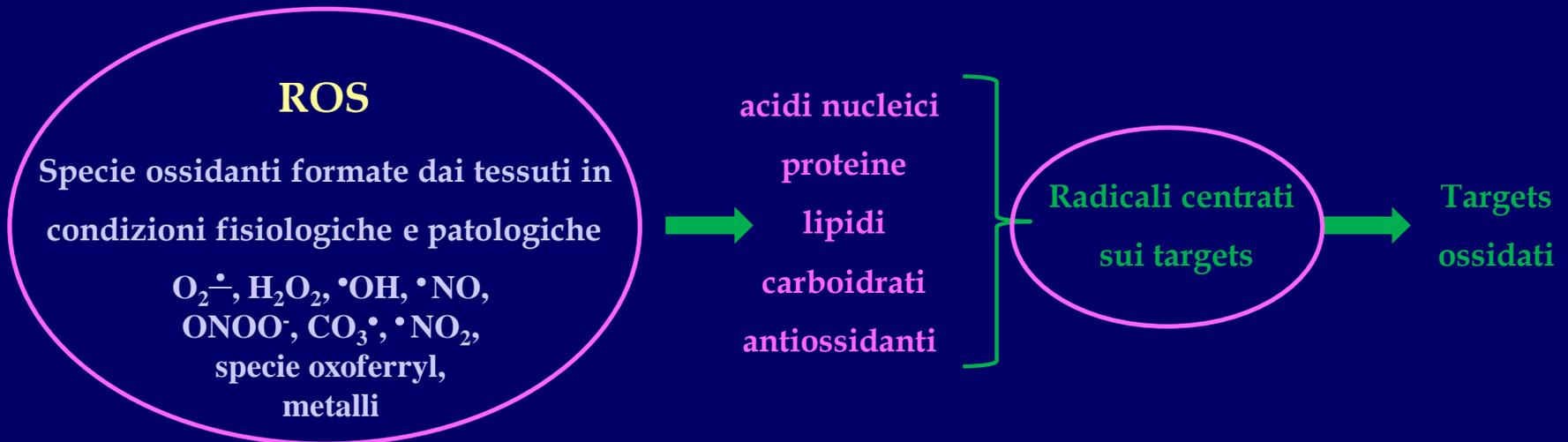


L'esempio delle proteine



Studio dei radicali nei sistemi biologici

La spettroscopia EPR è l'unica tecnica che permette di monitorare e caratterizzare i radicali formati in sistemi semplici e complessi



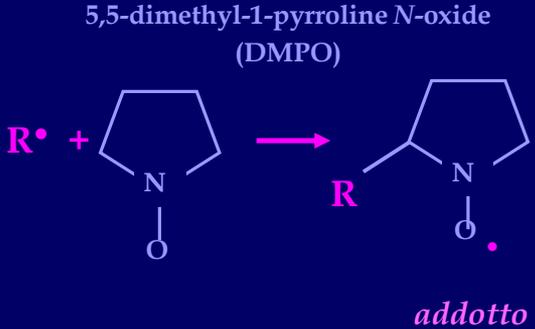
Studio dei radicali nei sistemi biologici

1. Misura delle specie ossidanti

ROS
 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, $\cdot NO$,
 $ONOO^{\cdot-}$, $CO_3^{\cdot-}$, $\cdot NO_2$,

Radicali instabili

EPR 
Spin trapping



$O_2^{\cdot-}$



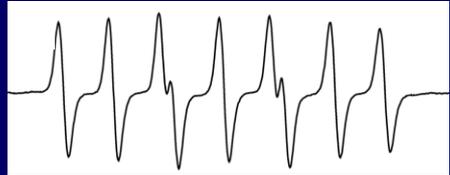
DMPO

$\cdot OH$

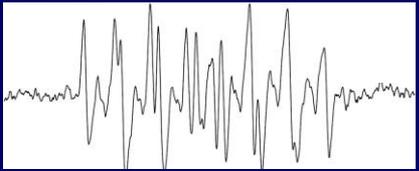


DMPO

$\cdot NO$



CPTIO



DEPMPO



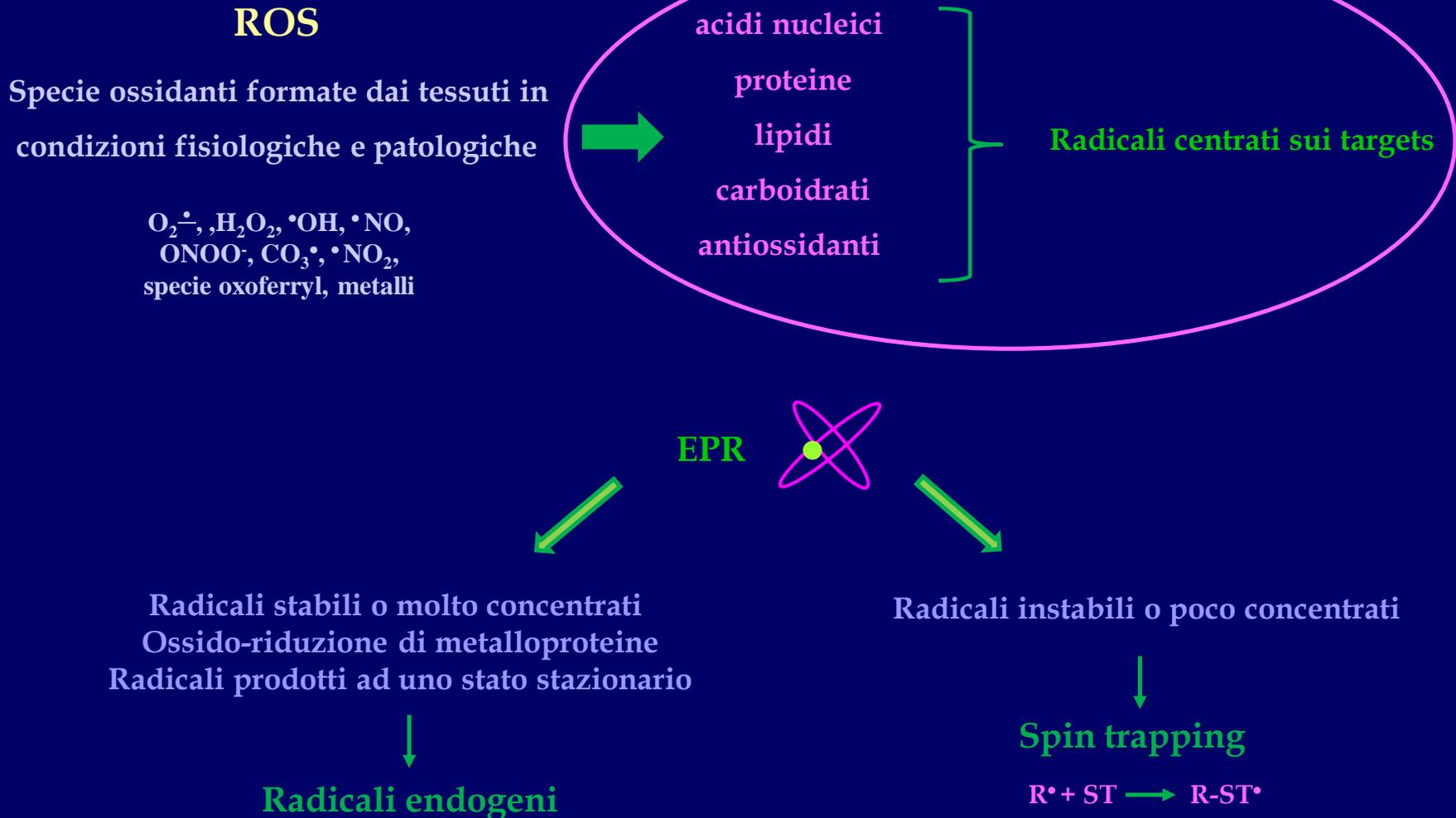
PBN



Fe-DETC

Studio dei radicali nei sistemi biologici

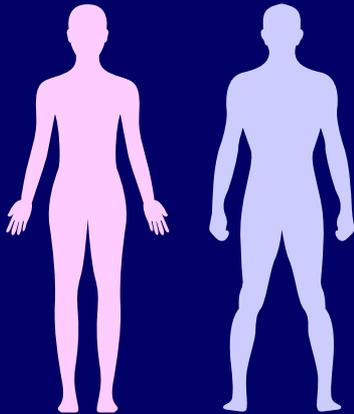
2. Misura degli intermedi radicalici delle specie ossidate



Misura EPR dei radicali formati in campioni biologici

In quali sistemi?

Sistemi biologici *ex vivo*
(condizioni fisiologiche e patologiche)

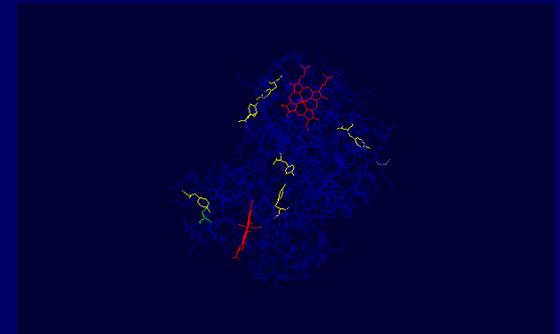


Patologie degenerative su base
infiammatoria (cardiovascolari,
neurologiche), tumori, diabete

Colture cellulari



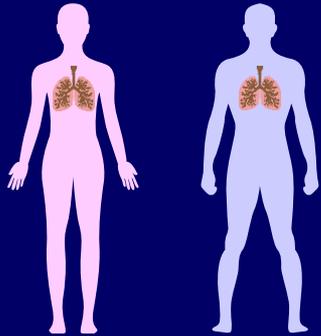
Molecole purificate per lo
studio di meccanismi



Un esempio di studio di radicali e stress ossidativo

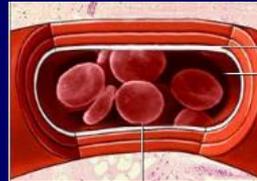
I radicali sono coinvolti nel decorso della patologia su base infiammatoria broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)?

colpisce piu' gli uomini ma e' piu' letale nelle donne



Sistemi biologici ex vivo

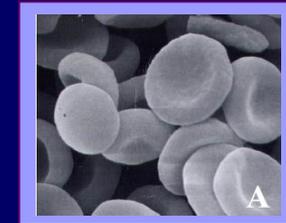
Gli eritrociti sono il principale sistema di difesa antiossidante del sangue



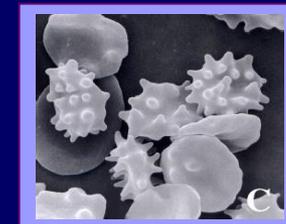
ROS?

Eritrociti di pazienti BPCO mostrano marcatori di ossidazione e invecchiamento

Down regulation glicoforina A&C
Clustering Banda 3
Ossidazione tioli

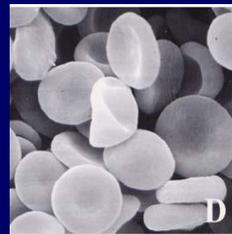


Eritrociti di donatori sani



Eritrociti di pazienti BPCO

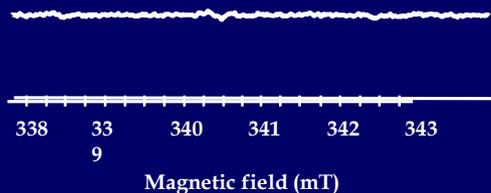
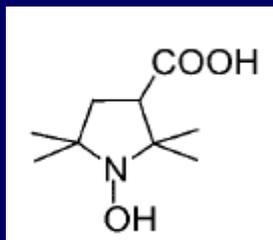
Regressione dei marcatori di ossidazione e invecchiamento



dopo trattamento farmacologico con N-acetylcisteina

Misura dei radicali formati nel sangue intero

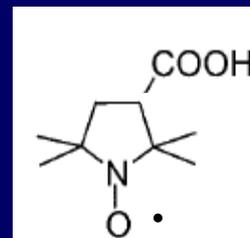
1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine
(CPH)



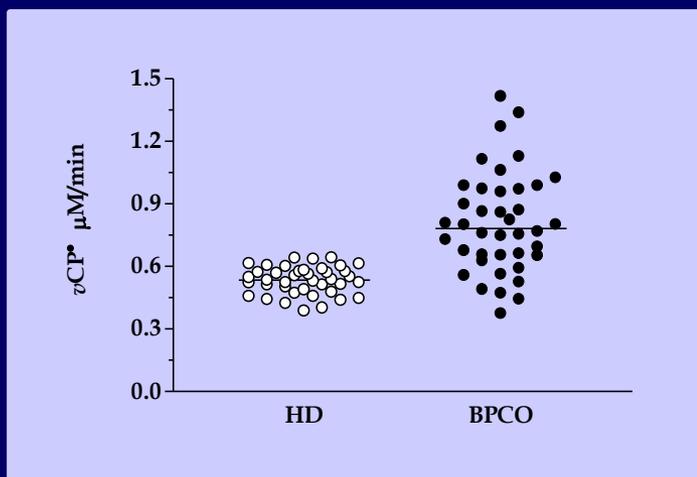
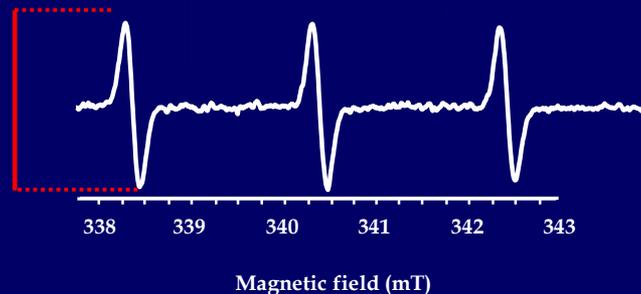
ROS



3-carboxy-proxyl
(CP[•])



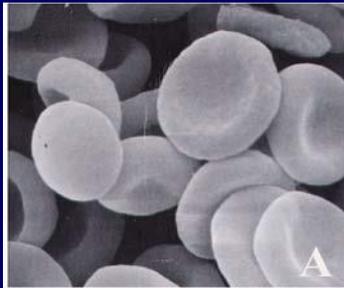
h in unità arbitrarie
(a.u.)



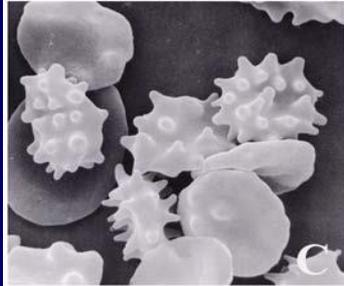
Il sangue intero di pazienti BPCO
ha più alti livelli di radicali
rispetto a quello di donatori sani

Modifiche ossidative (ROS e marcatori di senescenza) in RBC da pazienti BPCO molto simili a quelli ottenuti dal trattamento in vitro con perossinitrito

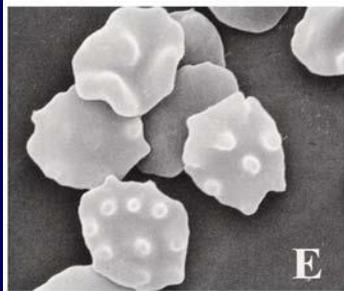
Eritrociti di donatori sani



Eritrociti di pazienti BPCO



Eritrociti di donatori sani + ONOO⁻

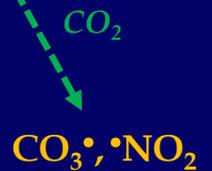


Marcatori di ossidazione e invecchiamento

perossinitrito



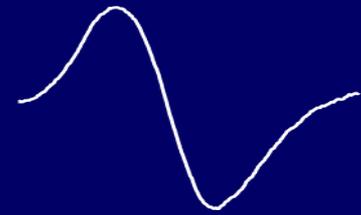
Pathway radicalico



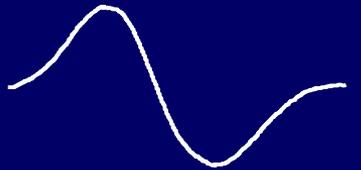
Caratterizzazione dei radicali endogeni stabili formati nella reazione tra sangue intero e perossinitrito

EPR del campione tal quale

Sangue intero



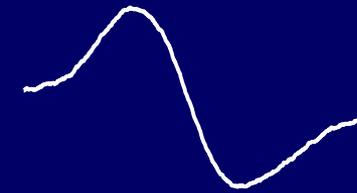
Eritrociti



Plasma



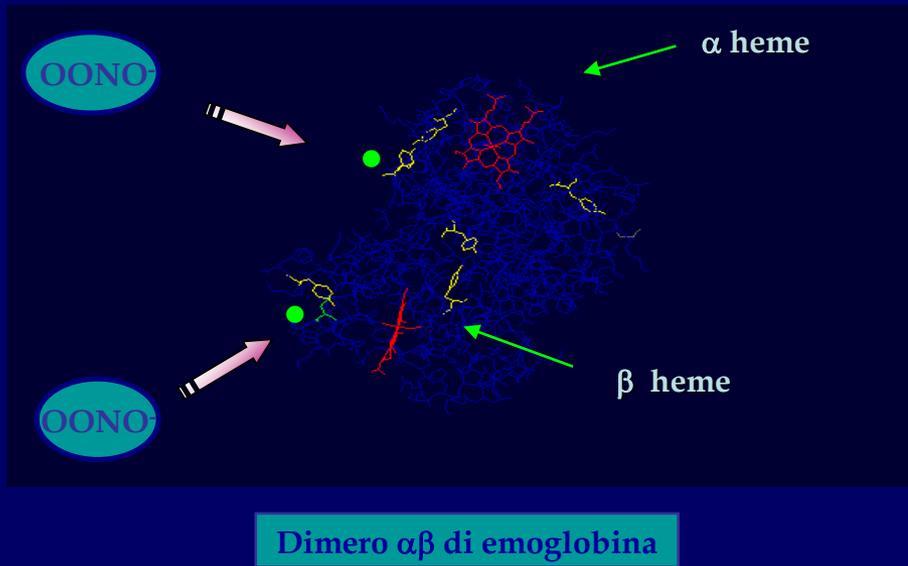
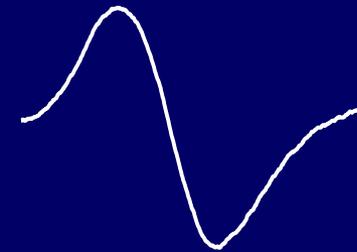
Emolisato



Ultrafiltrato a basso peso molecolare



Emoglobina purificata



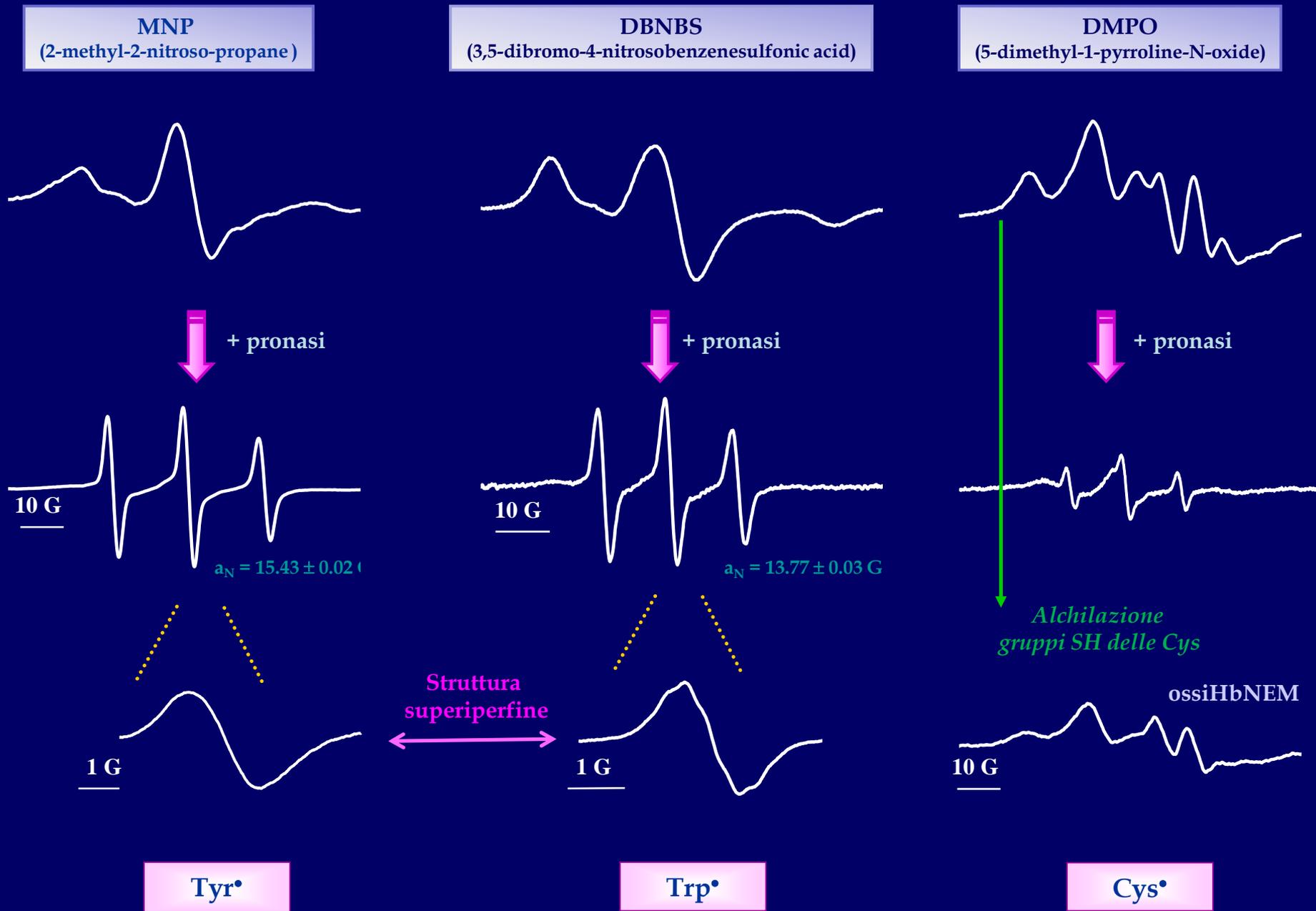
La stabilità e le caratteristiche spettroscopiche indicano che il radicale è centrato sui residui di tirosina dell'emoglobina

Altri radicali centrati sulla proteina?



EPR spin trapping

Emoglobina + perossinitrito → EPR spin trapping

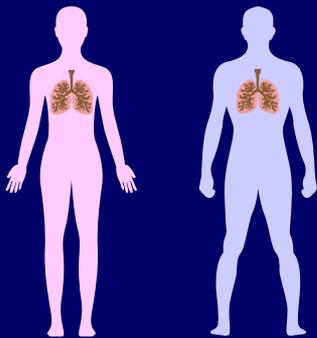


Emoglobina ossidata induce danno ossidativo ad altri targets, migra in membrana e altera il signaling

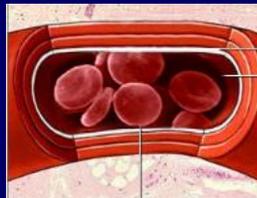


La spettroscopia EPR ci aiuta a studiare il contributo dello stress ossidativo nelle patologie di interesse umano a partire da un sistema complesso fino ad arrivare alla macromolecola

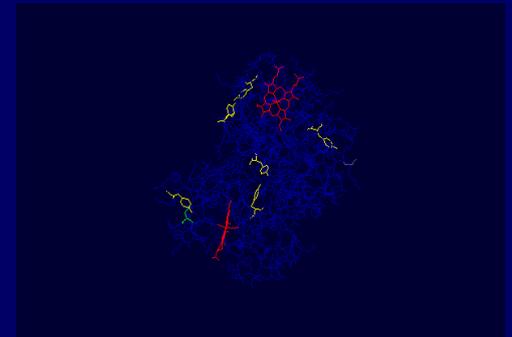
BPCO



Sangue



Emoglobina



Possiamo fare altro in questo modello cellulare?

Altre tecniche derivate dallo spin trapping per lo studio dei radicali nei sistemi biologici

$R^\bullet + \text{Spin trap}$



$R\text{-Spin trap}^\bullet$



Addotto stabile
rilevabile all'EPR



Immuno-spin trapping



+ anticorpi diretti contro lo spin trap

Complessi $R\text{-Spin trap/}$
 anti-spin trap



In vivo

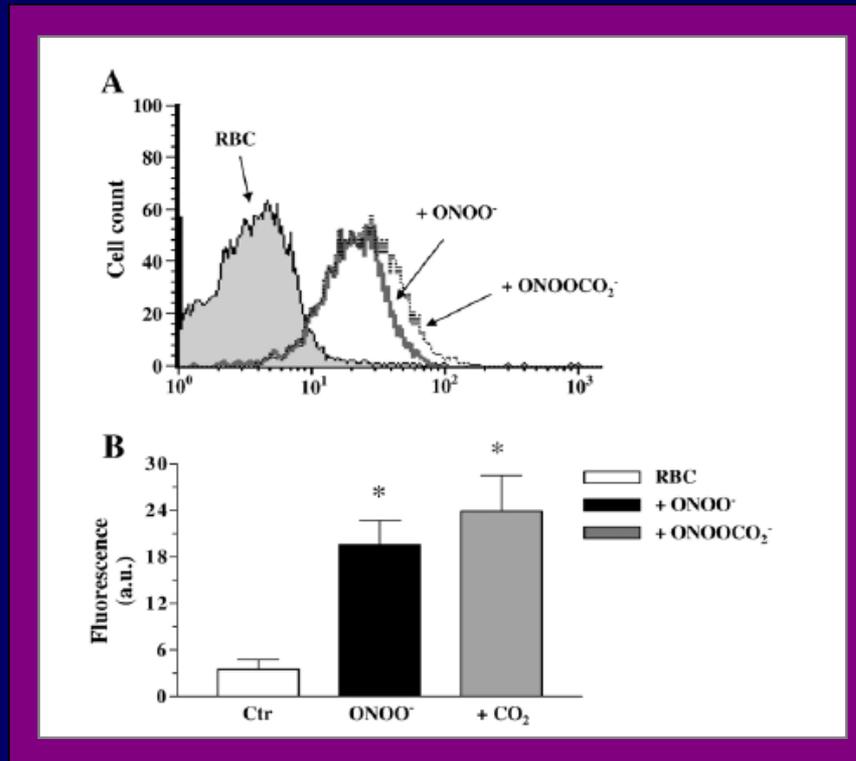


Imaging risonanza magnetica molecolare
Imaging EPR

ELISA
Western blot
Immunoprecipitazione
Immunoistochimica
Immunocitometria
Spettrometria di Massa

Tecnica di immuno spin trapping: citofluorimetria

Eritrociti trattati con ONOO^- in presenza di DMPO



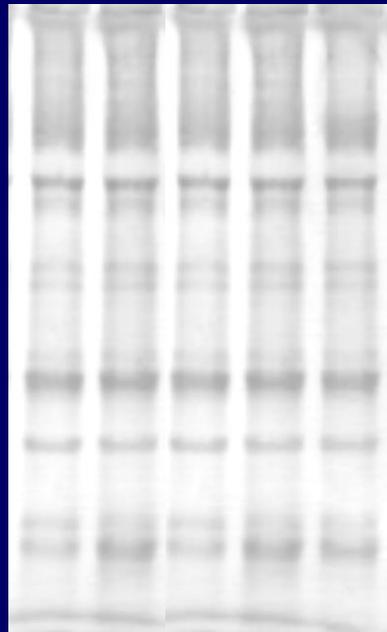
Tecnica di immuno spin trapping: Western blotting

Eritrociti trattati con ONOO^- in presenza di DMPO



Red Ponceau

Membrane



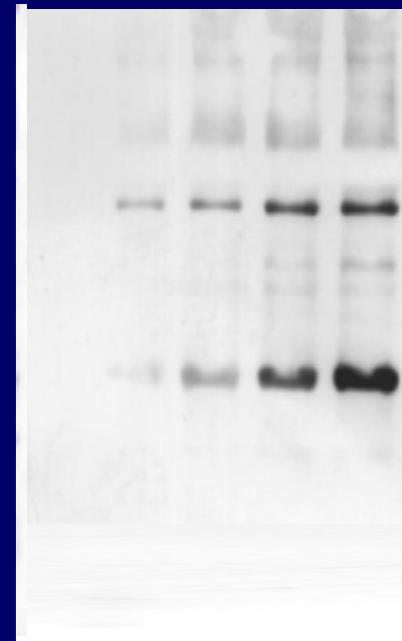
← Banda 3 →
← Prot 4.1 →
← Prot 4.2 →

← Actina →
← GAPDH →

0 100 250 500 1000
[Perossinitrito] μM

WB con anti-DMPO

Membrane



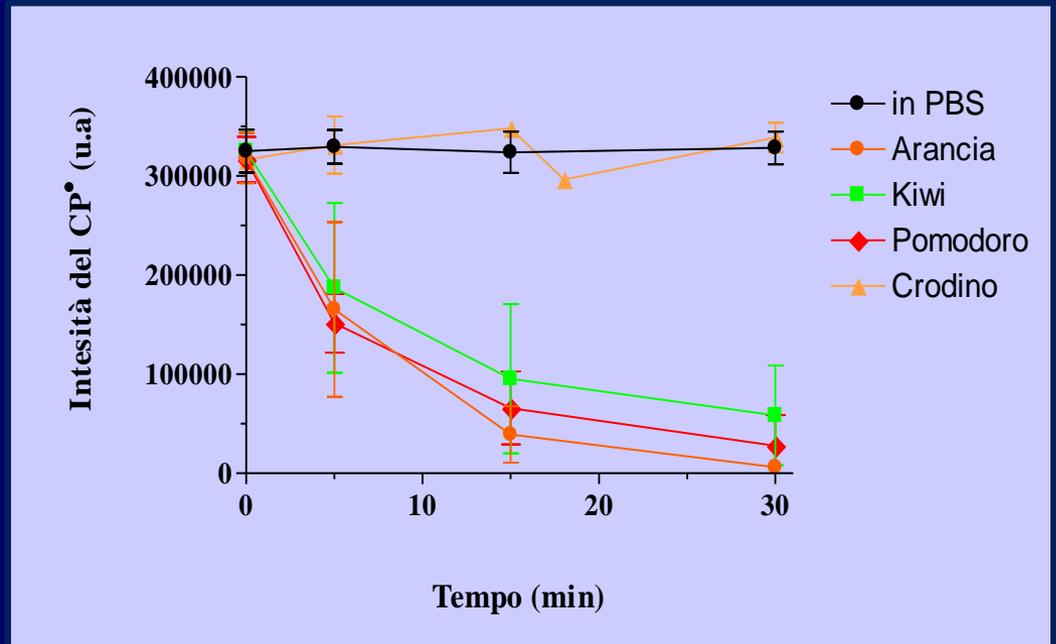
0 100 250 500 1000
[Perossinitrito] μM

Altre applicazioni dell'EPR in campo biologico: studio della capacità antiossidante degli alimenti

Cinetica di riduzione di un radicale stabile → 3-carboxy proxyl (CP[•])

Cinetica di riduzione del radicale CP[•] in presenza di alimenti e bevande contenenti, o meno, antiossidanti

Quanto più alta è la velocità di riduzione del CP[•], tanto più alta è la capacità antiossidante dell'alimento



Misura dei biomarcatori di stress ossidativo

Specie ossidanti

Biomarcatori indiretti



Vantaggi

- ✓ Indicazione formazione stress ossidativo
- ✓ Indicazione target stress ossidativo
- ✓ Misura prodotti di ossidazione

Limiti

- ✓ Non discriminano tra i radicali ossidanti
- ✓ Non misurano gli intermedi radicalici sui targets
- ✓ Reazioni secondarie dei probes utilizzati con la luce del laboratorio e i radicali formati nei campioni biologici

Vantaggi dell'EPR

- ✓ Studio on-line dell'evento ossidativo
- ✓ Possibilità di seguire in modo cinetico gli eventi ossidativi
- ✓ Identificazione degli atomi che formano i radicali ($\bullet\text{O-}$, $\bullet\text{C-}$, $\bullet\text{N-}$ o $\bullet\text{S-}$)
 - ✓ Studio delle strutture macromolecolari

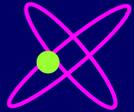
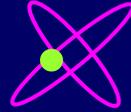
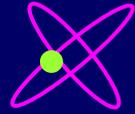
Limiti dell EPR

- ✓ Sensibilità dello strumento e bassa efficienza trapping
 - ✓ Complessità spettri
 - ✓ Non identificazione target
- ✓ Trasformazione addotto in specie EPR silente

...dove non arriva l'EPR, lavoriamo insieme!

- ✓ Identificazione strutture/proteine coinvolte
- ✓ Identificazione del residuo modificato
 - ✓ Localizzazione danno ossidativo
 - ✓ Dosaggio semi-quantitativo

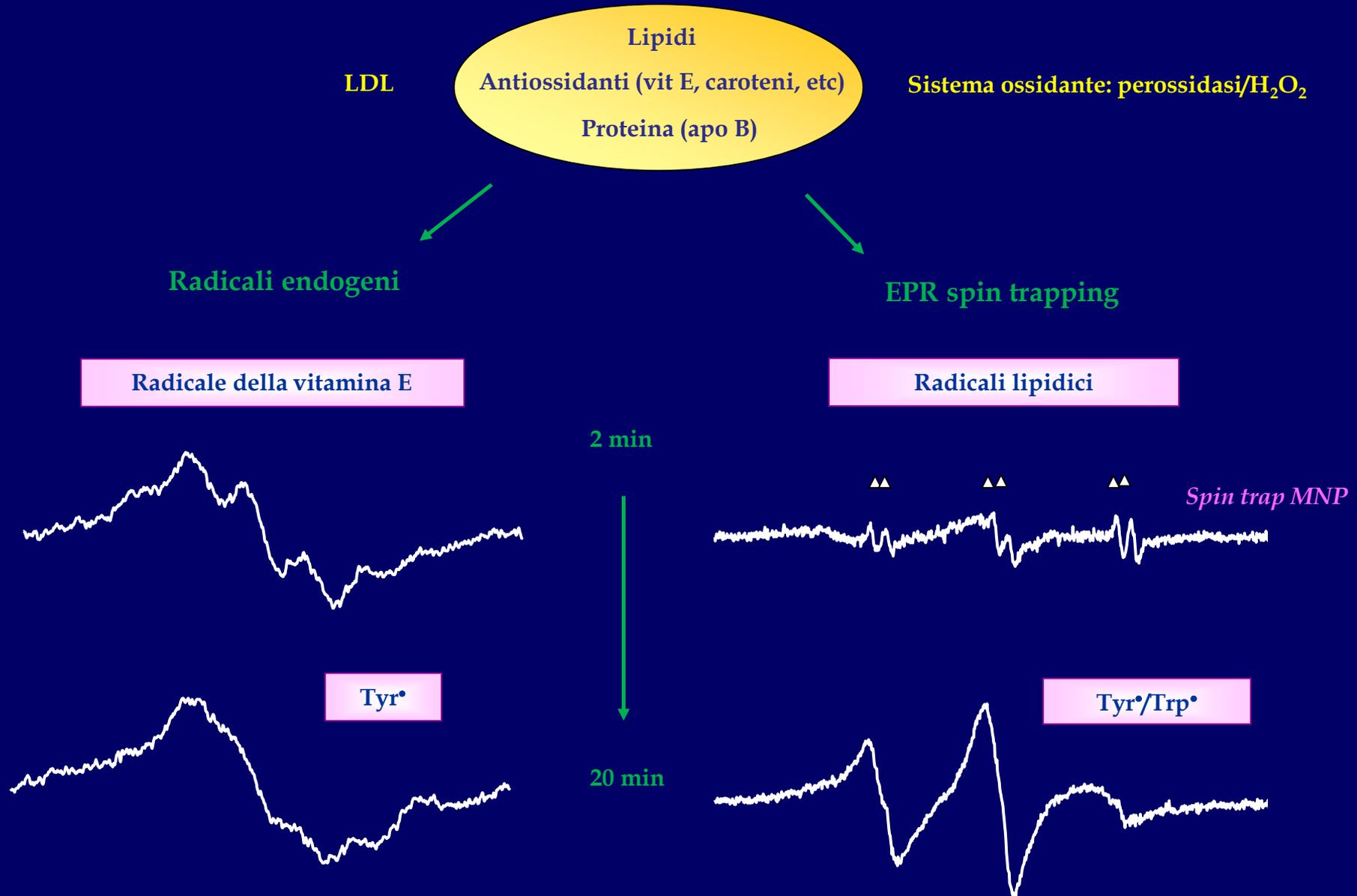
ELISA
Western blot
Immunoprecipitazione
Immunoistochimica
Immunocitometria
Spettrometria di Massa
Imaging risonanza magnetica molecolare
Imaging EPR



Grazie per l'attenzione!!!



Un altro esempio: l'ossidazione della proteina a bassa densità (LDL) del plasma

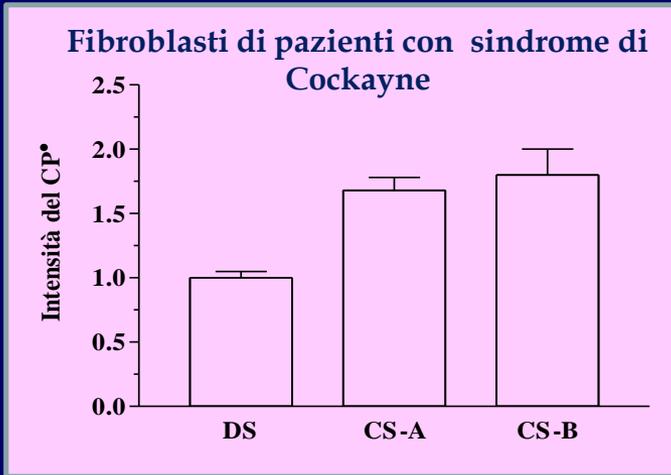


Applicazione della spettroscopia EPR allo studio del coinvolgimento di radicali in patologie rare

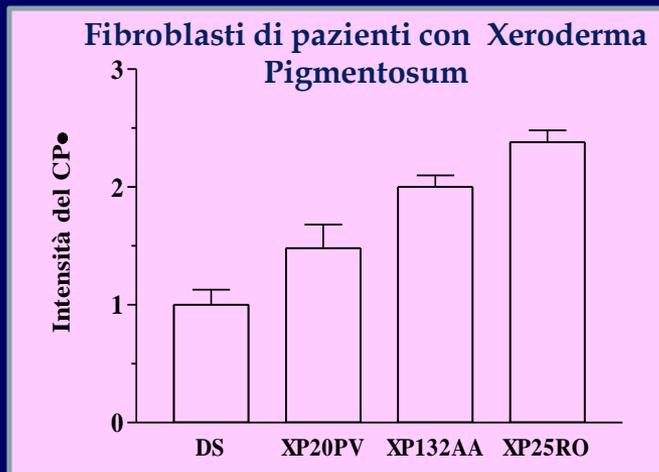
Patologie dovute ad accumulo del danno ossidativo nel DNA

DS = donatori sani

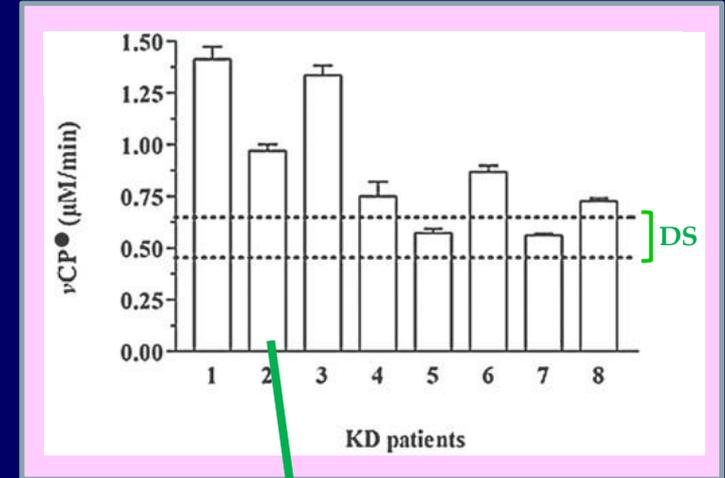
Malattia di Kawasaki
vasculite infiammatoria



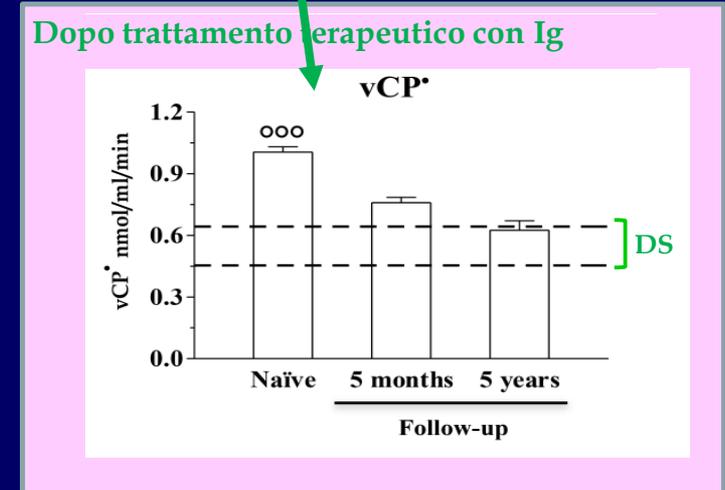
Pascucci et al (2016) *Oncotarget*



Parlanti et al (2015) *Mutat Res*



Straface et al (2012) *ARS*



Pietraforte et al (2015) *IJC*