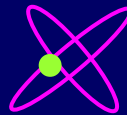




## L'EPR svelato: una trappola per radicali liberi e stress ossidativo

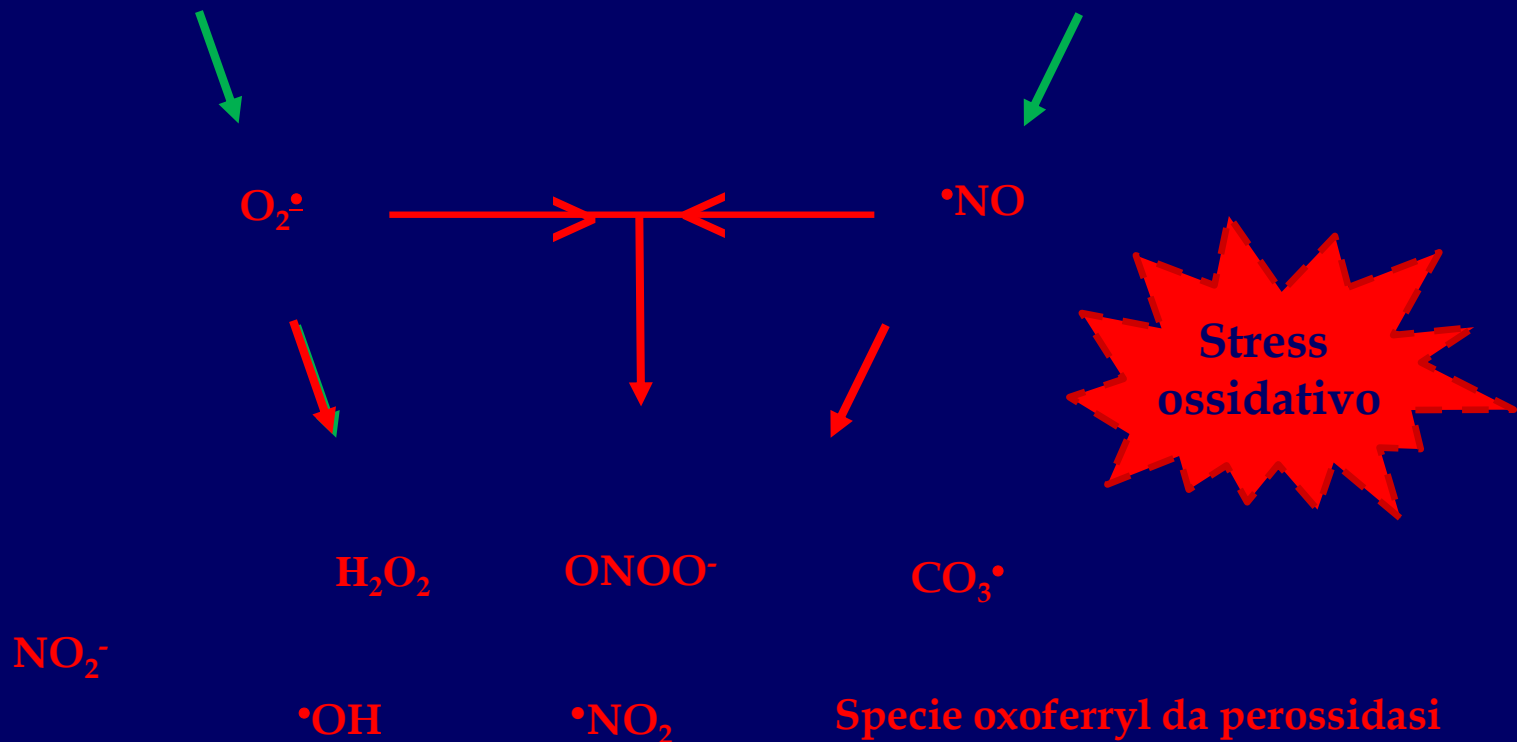
Catturare gli elettroni spaiati...  
quali informazioni possiamo ottenere  
in un sistema biologico?



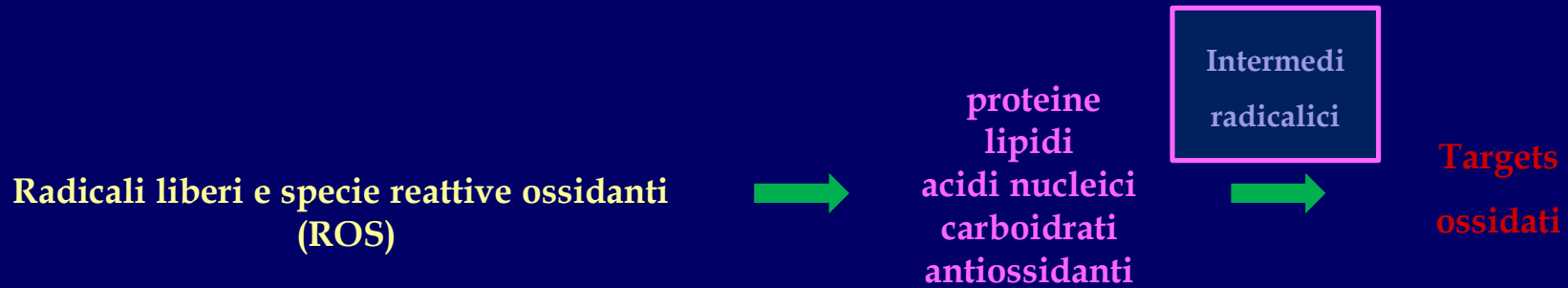
I radicali liberi e alcune specie ossidanti sono formati dai tessuti in condizioni fisiologiche e regolano il signaling e la funzionalità cellulare, ma aumentano significativamente in patologia

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

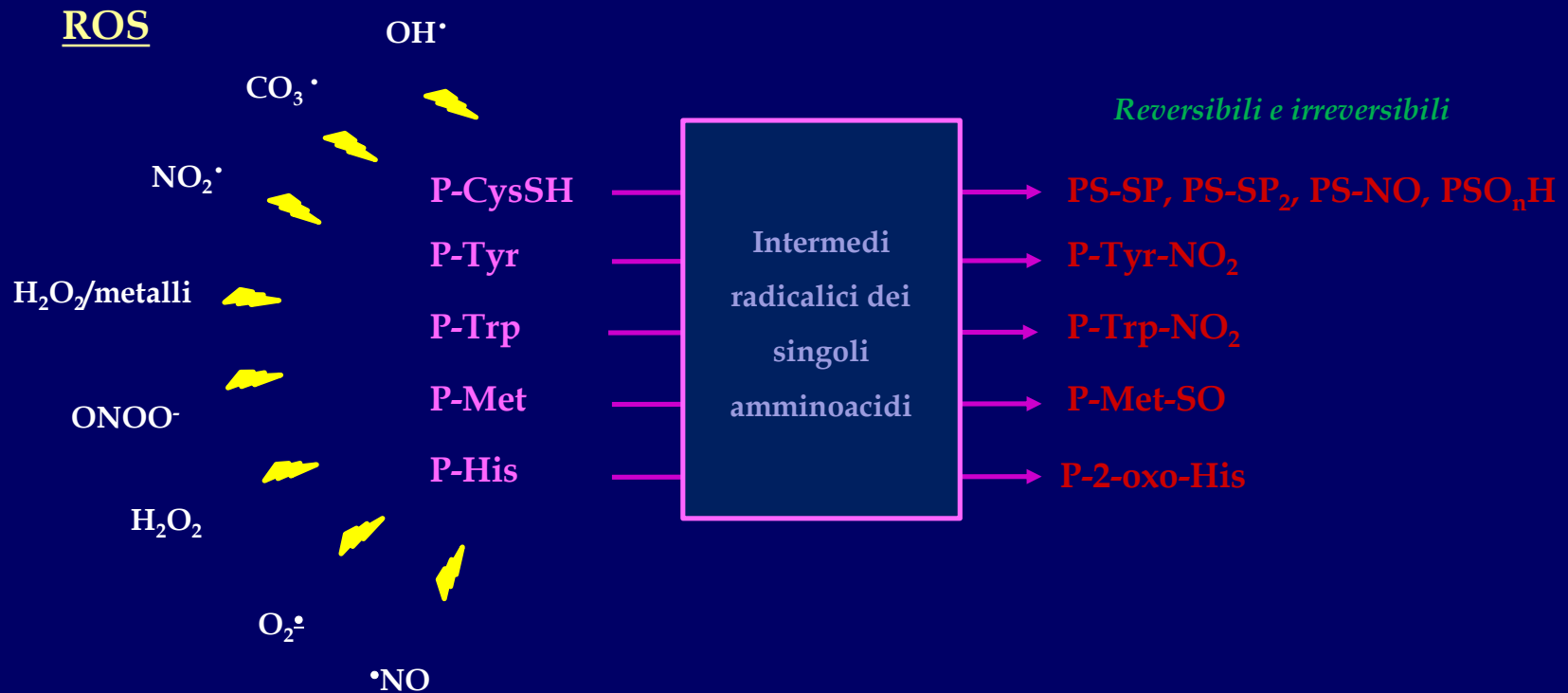
Ossido nitrico sintasi (costitutiva e inducibile),  
attività nitrito-reduttasica



# Radicali come biomarcatori diretti di stress ossidativo

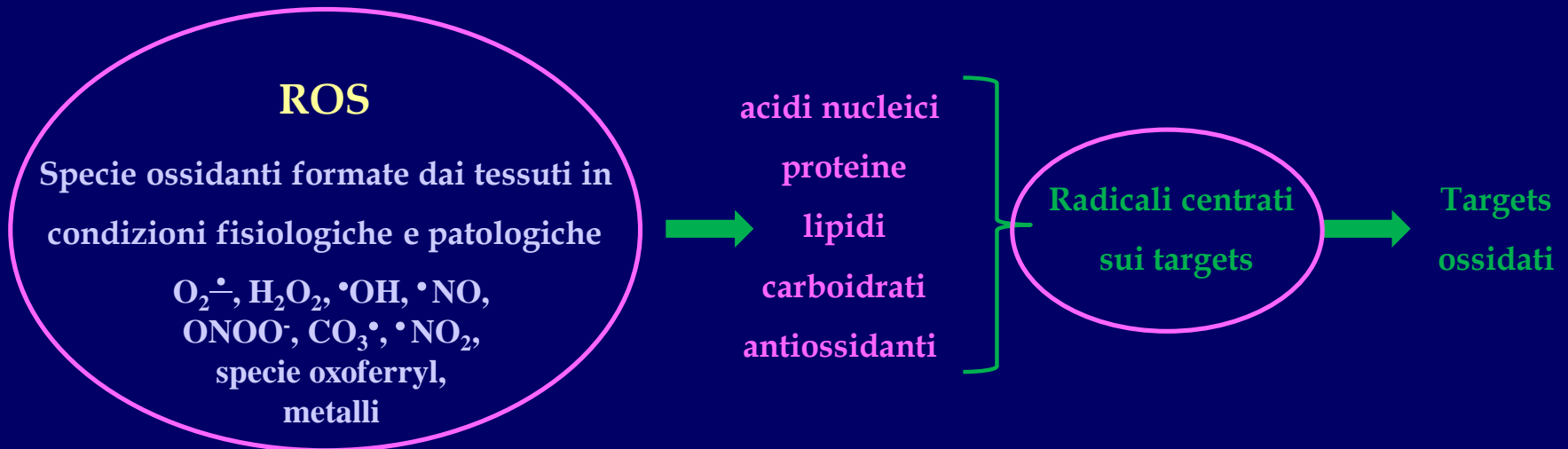


## L'esempio delle proteine



## 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



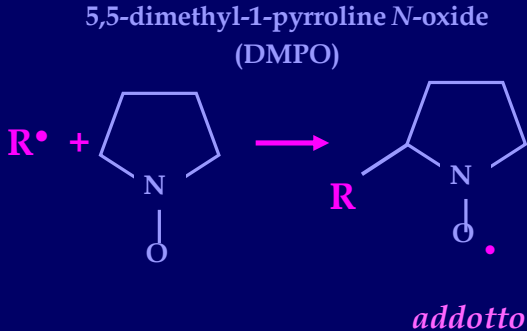
# Studio dei radicali nei sistemi biologici

## 1. Misura delle specie ossidanti

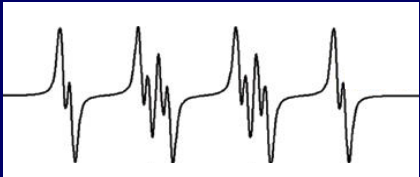
**ROS**  
 $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $\cdot NO$ ,  
 $ONOO^{\cdot-}$ ,  $CO_3^{\cdot-}$ ,  $\cdot NO_2$ ,

Radicali instabili

**EPR**   
Spin trapping



$O_2^{\cdot-}$



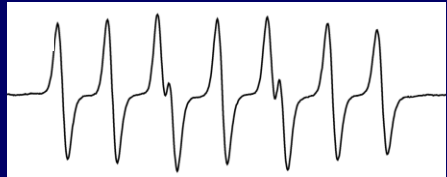
DMPO

$\cdot OH$

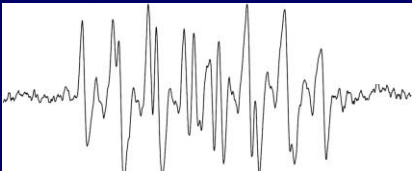


DMPO

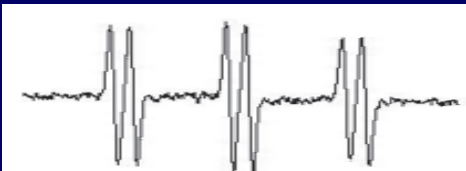
$\cdot NO$



CPTIO



DEPMPO



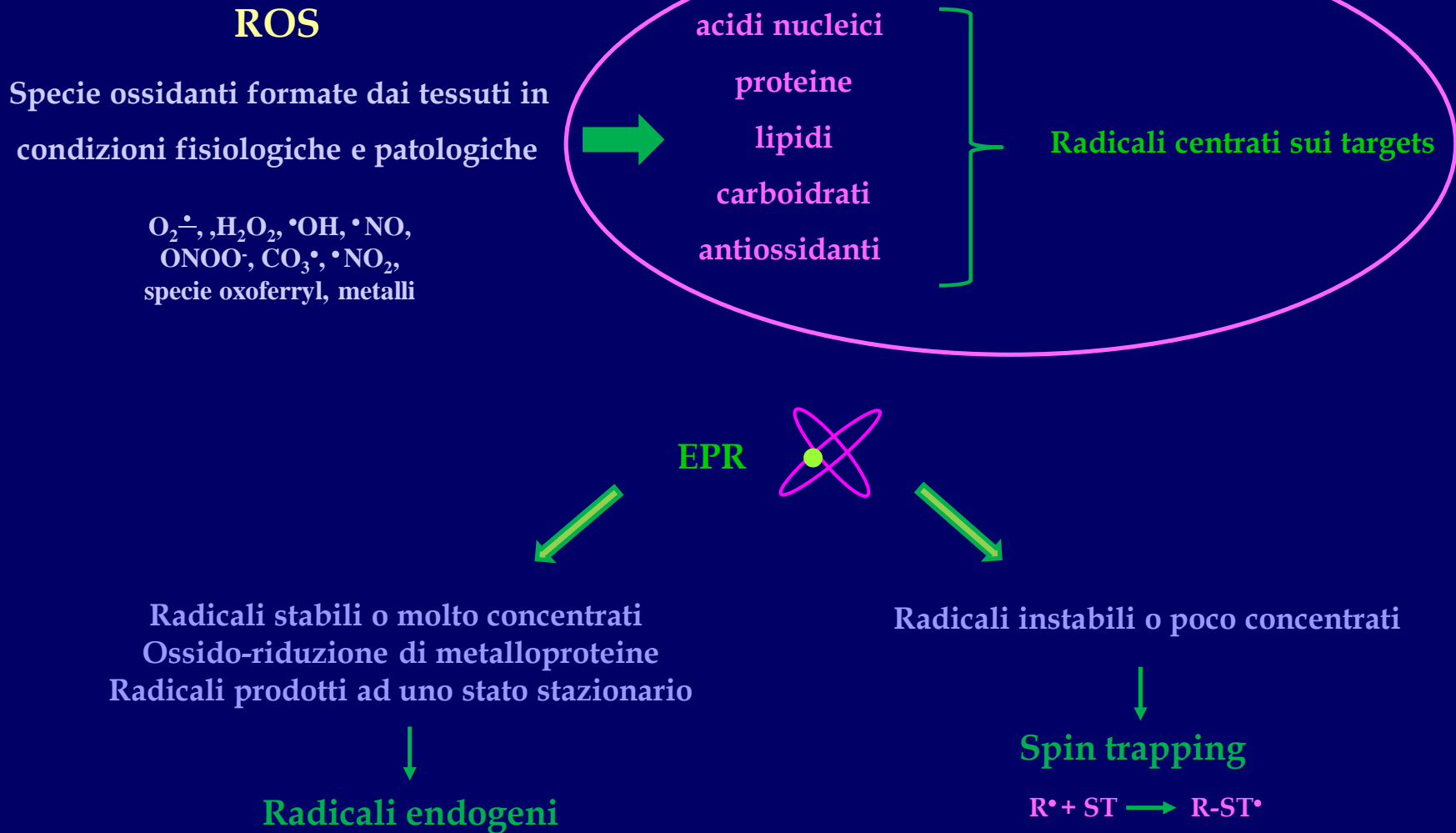
PBN



Fe-DETC

# Studio dei radicali nei sistemi biologici

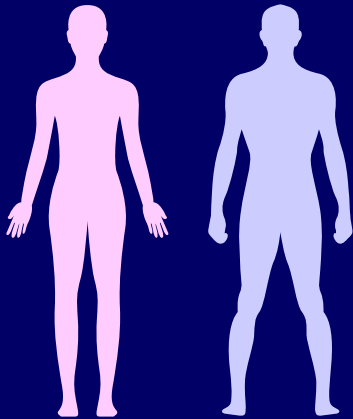
## 2. Misura degli intermedi radicalici delle specie ossidate



# Misura EPR dei radicali formati in campioni biologici

In quali sistemi?

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

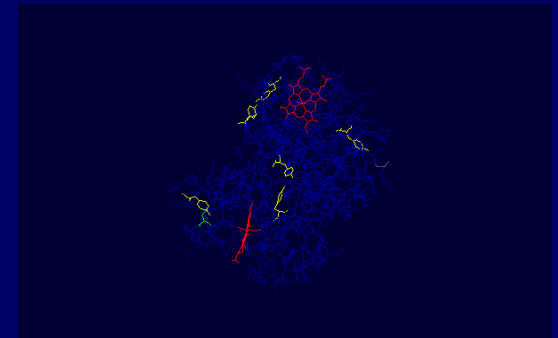


Patologie degenerative su base  
infiammatoria (cardiovascolari,  
neurologiche), tumori, diabete

Colture cellulari



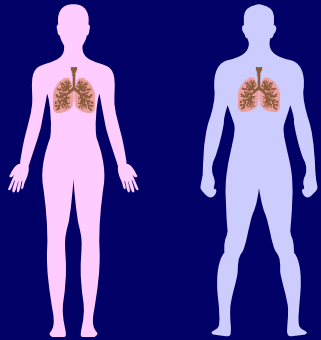
Molecole purificate per lo  
studio di meccanismi



# Un esempio di studio di radicali e stress ossidativo

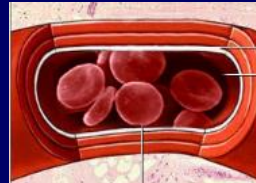
I radicali sono coinvolti nel decorso della patologia su base infiammatoria broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)?

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



Sistemi biologici ex vivo

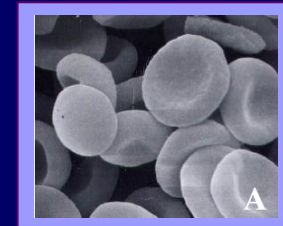
Gli eritrociti sono il principale sistema di difesa antiossidante del sangue



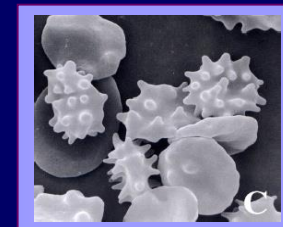
ROS?

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

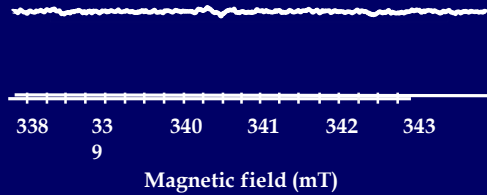
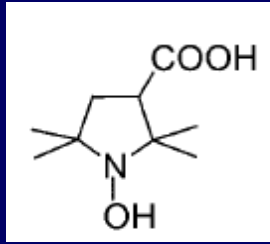


dopo trattamento farmacologico con N-acetylcisteina



# Misura dei radicali formati nel sangue intero

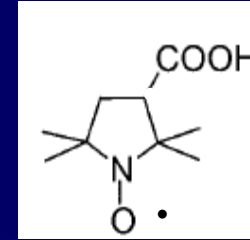
1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine  
(CPH)



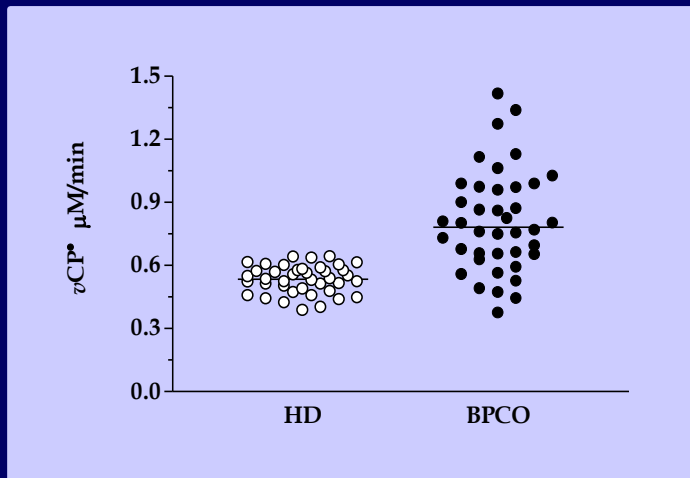
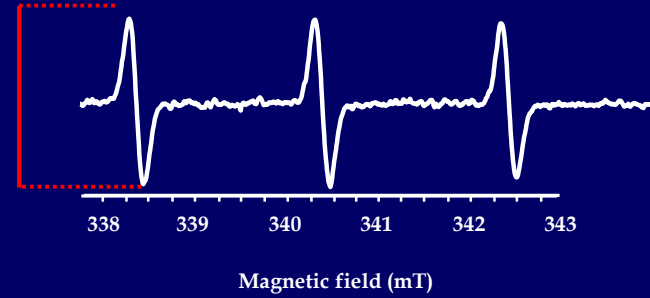
ROS



3-carboxy-proxyl  
(CP<sup>•</sup>)



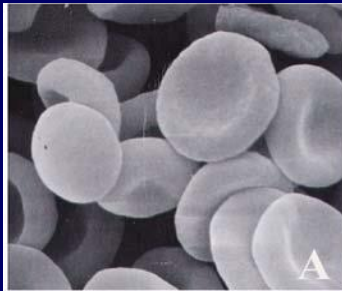
h in unità arbitrarie  
(a.u.)



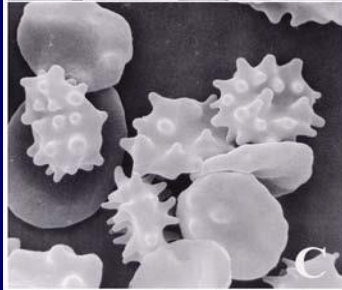
Il sangue intero di pazienti BPCO  
ha più alti livelli di radicali  
rispetto a quello di donatori sani

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

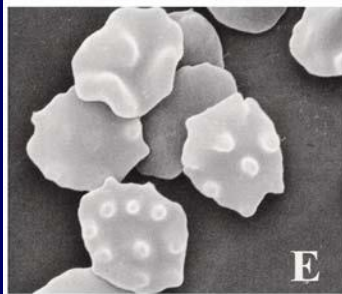
Eritrociti di donatori sani



Eritrociti di pazienti BPCO

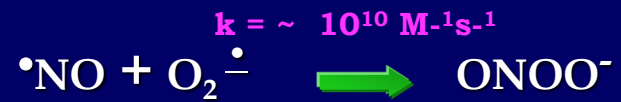


Eritrociti di donatori sani + ONOO<sup>-</sup>

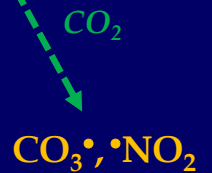


Marcatori di ossidazione e invecchiamento

perossinitrito



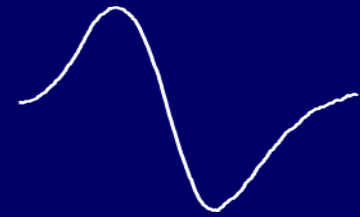
Pathway radicalico



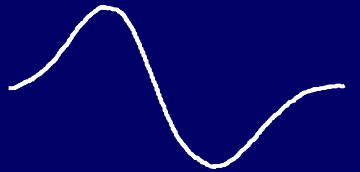
# Caratterizzazione dei radicali endogeni stabili formati nella reazione tra sangue intero e perossinitrito

## EPR del campione tal quale

Sangue intero



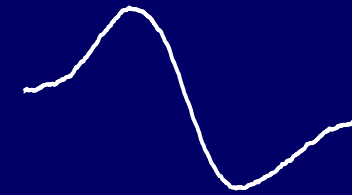
Eritrociti



Plasma



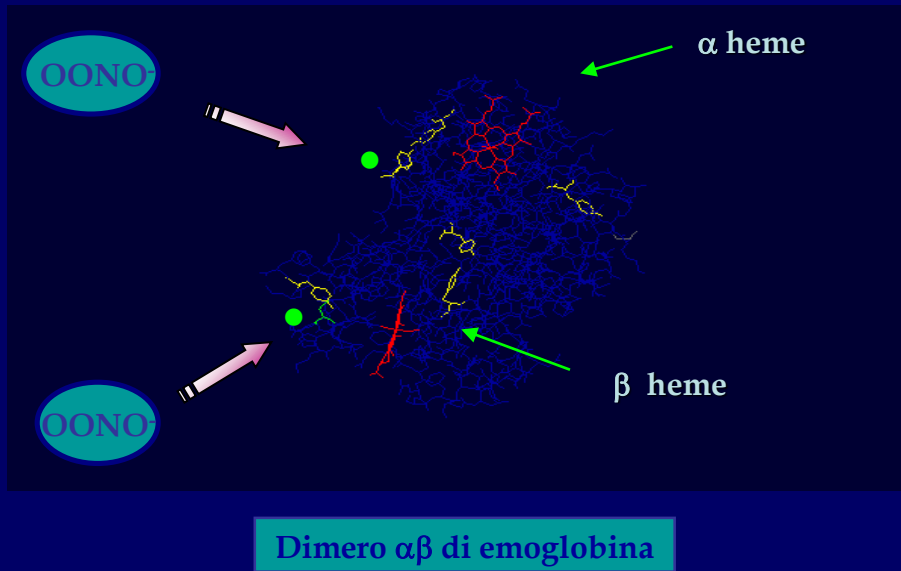
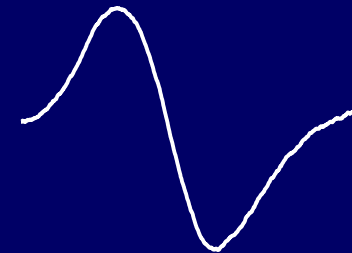
Emolisato



Ultrafiltrato a basso peso molecolare



Emoglobina purificata



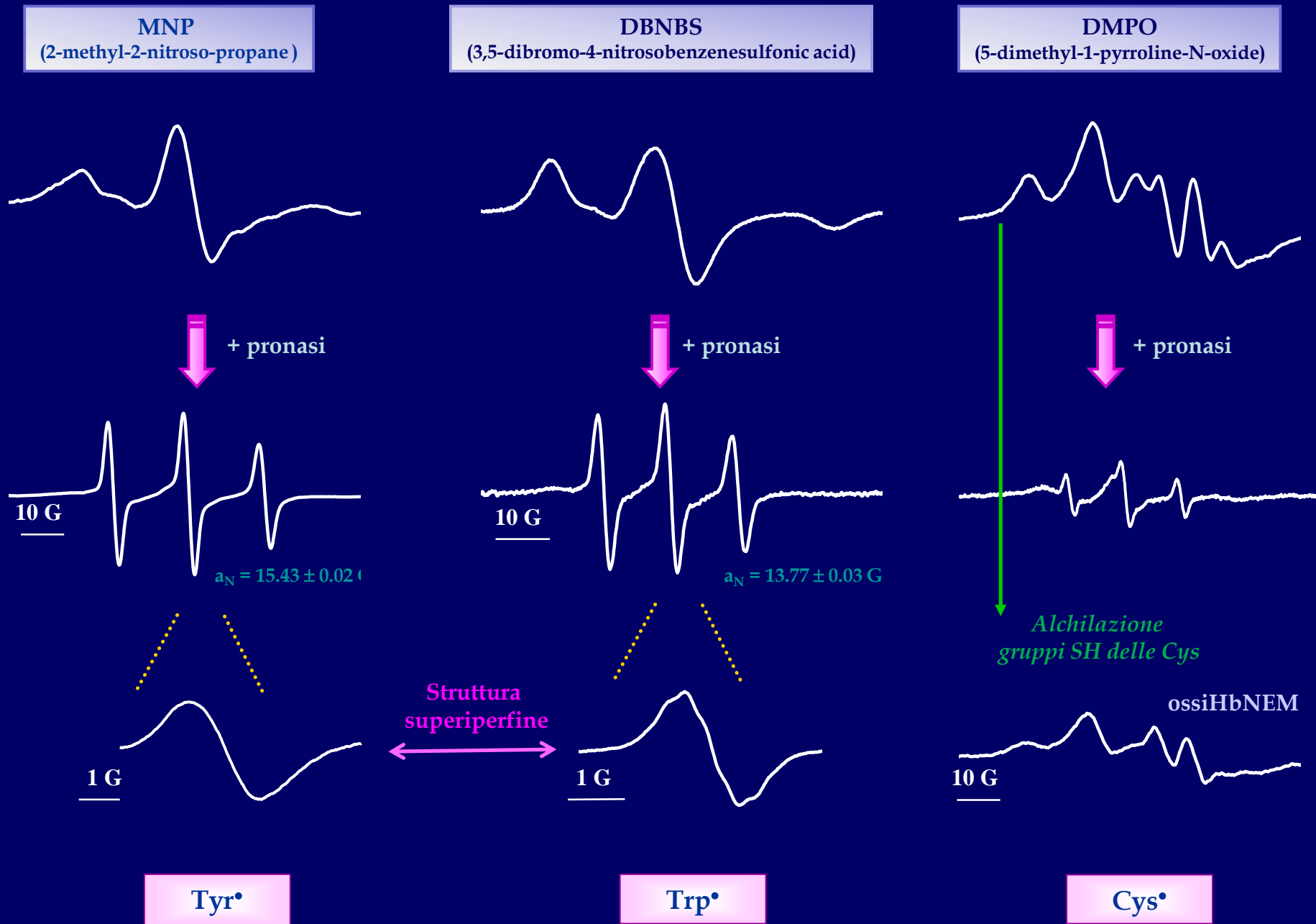
La stabilità e le caratteristiche spettroscopiche indicano che il radicale è centrato sui residui di tirosina dell'emoglobina

Altri radicali centrati sulla proteina?



EPR spin trapping

# Emoglobina + perossinitrito → EPR spin trapping

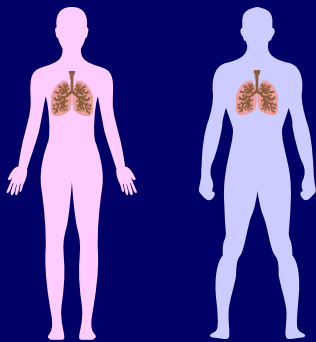


**Emoglobina ossidata induce danno ossidativo ad altri targets, migra in membrana e altera il signaling**



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

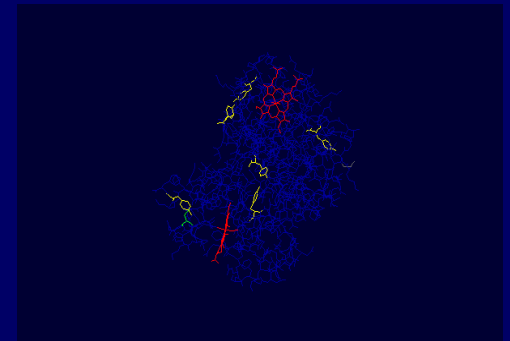
**BPCO**



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



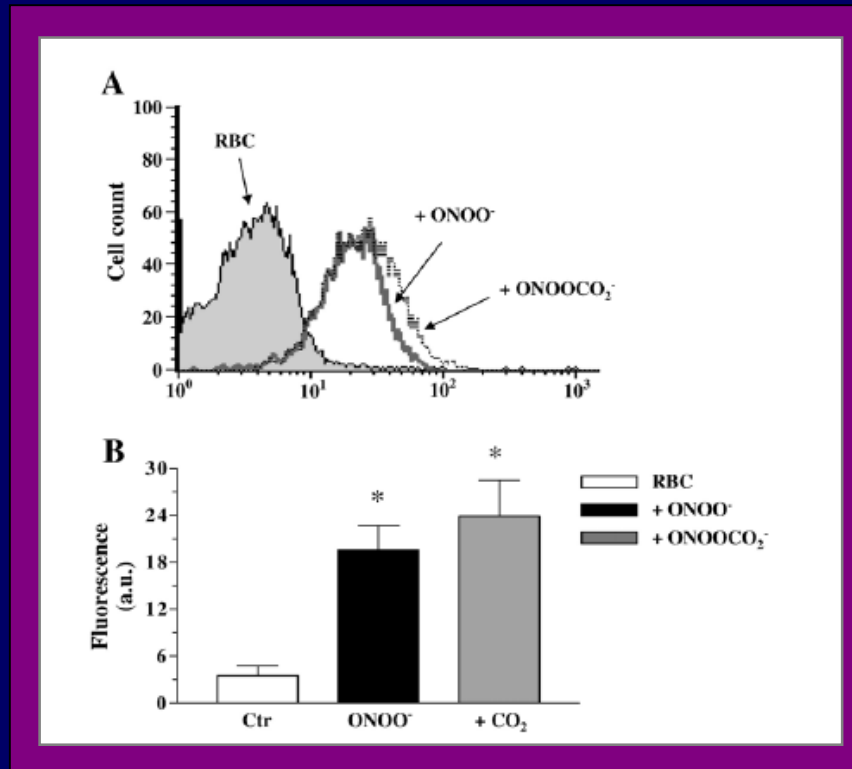
*In vivo*



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

## Tecnica di immuno spin trapping: citofluorimetria

### Eritrociti trattati con $\text{ONOO}^-$ in presenza di DMPO



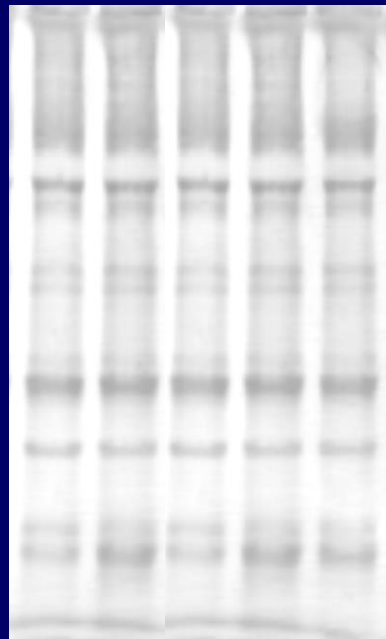
# Tecnica di immuno spin trapping: Western blotting

Eritrociti trattati con  $\text{ONOO}^-$  in presenza di DMPO



*Red Ponceau*

Membrane

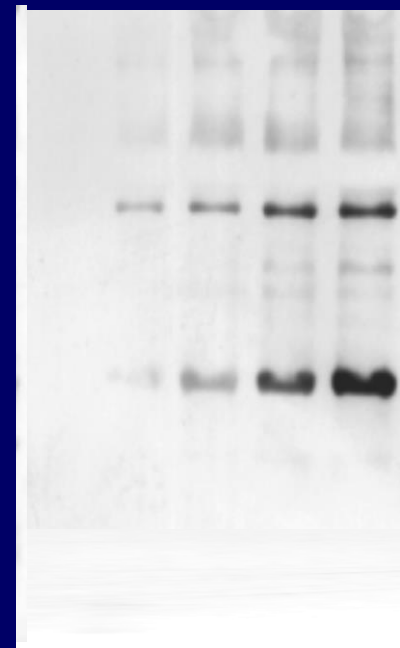


← Banda 3 →  
← Prot 4.1 →  
← Prot 4.2 →  
  
← Actina →  
← GAPDH →

0 100 250 500 1000  
[Perossinitrito]  $\mu\text{M}$

*WB con anti-DMPO*

Membrane



0 100 250 500 1000  
[Perossinitrito]  $\mu\text{M}$

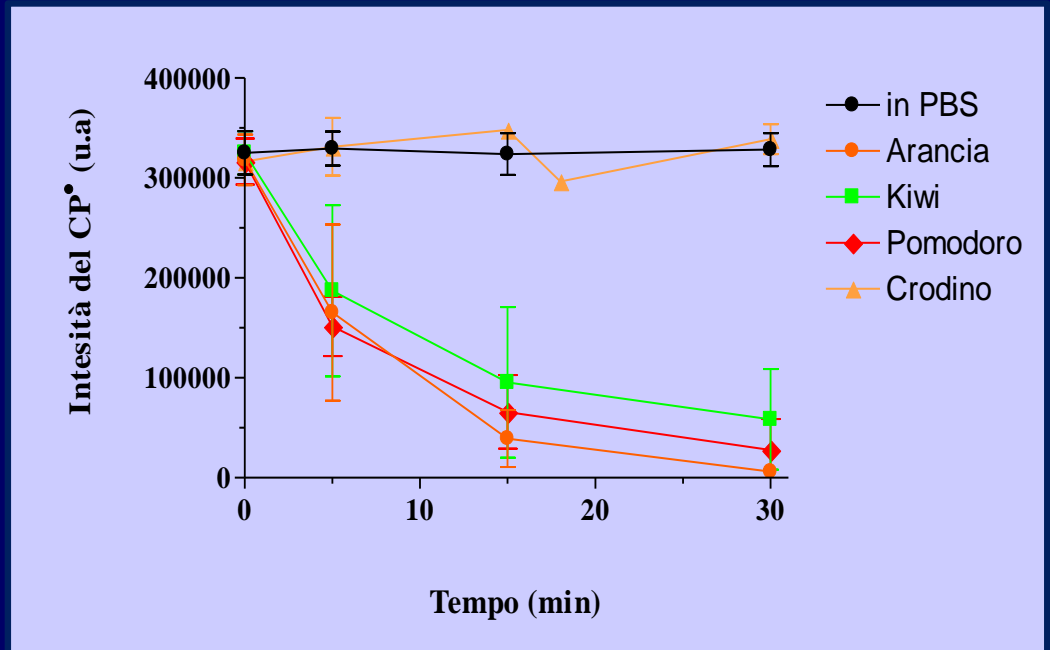


Altre applicazioni dell'EPR in campo biologico: studio della capacità antiossidante degli alimenti

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

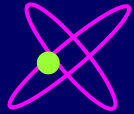
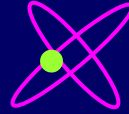
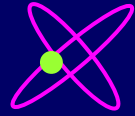
## Limiti dell EPR

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

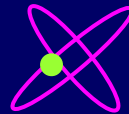
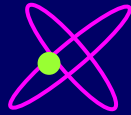
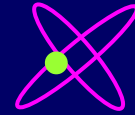
...dove non arriva l'EPR, lavoriamo insieme!

- ✓ 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

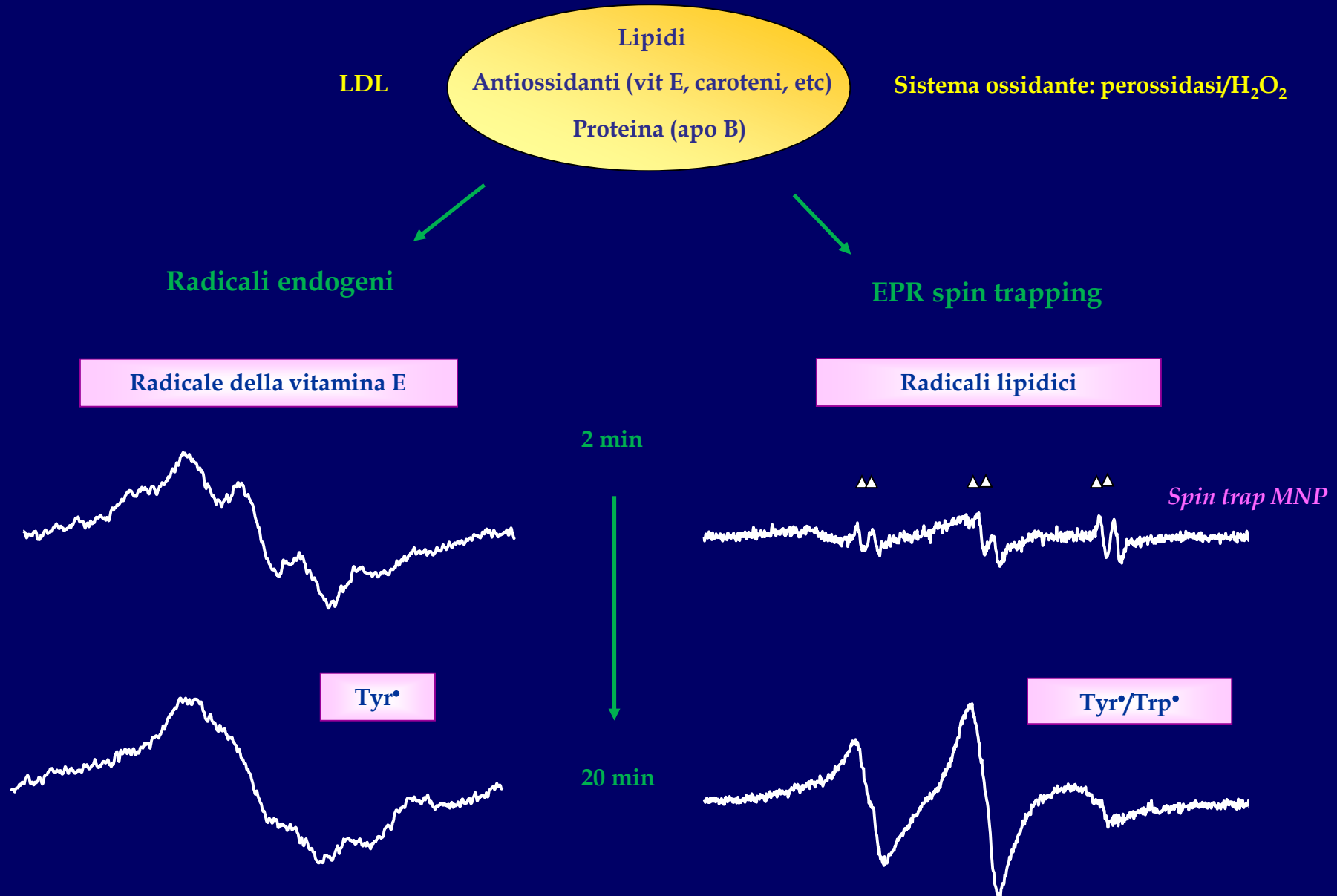


Grazie per l'attenzione!!!





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

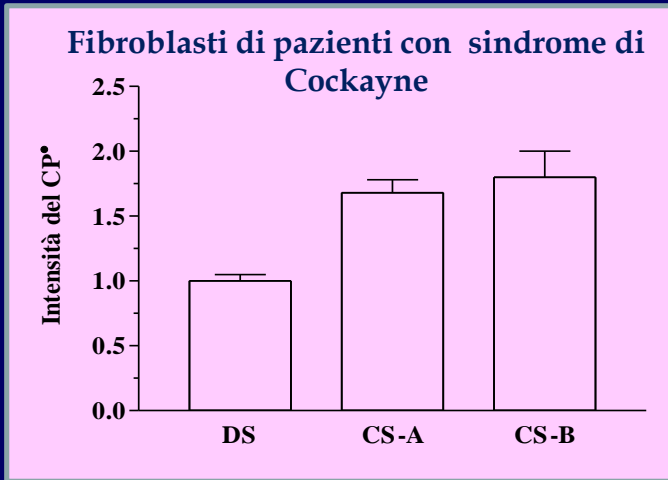


# Applicazione della spettroscopia EPR allo studio del coinvolgimento di radicali in patologie rare

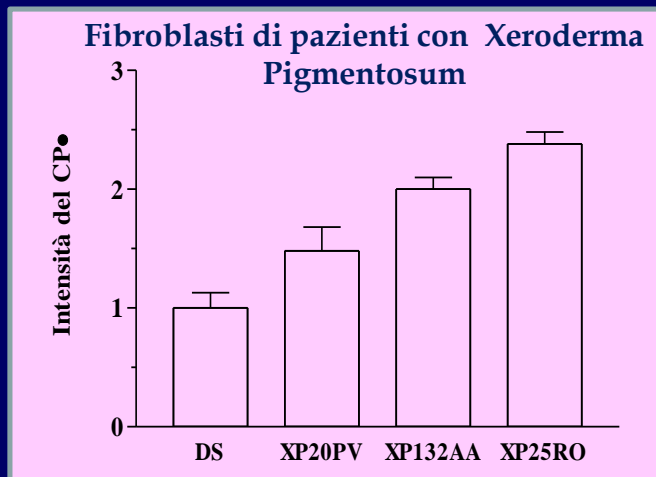
Patologie dovute ad accumulo del danno ossidativo nel DNA

DS = donatori sani

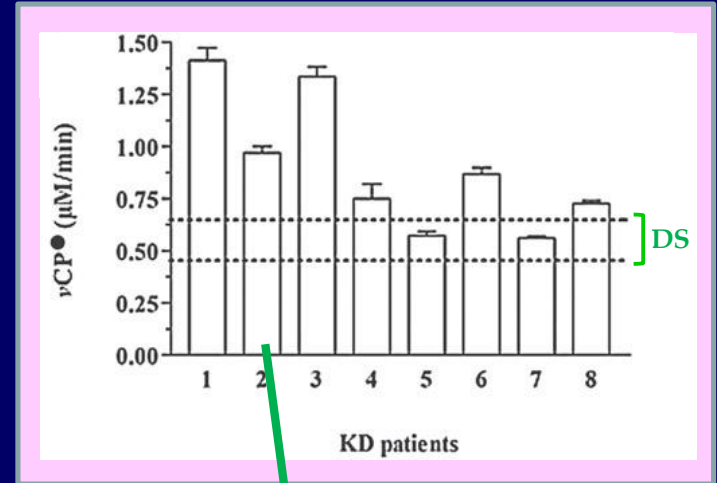
Malattia di Kawasaki  
vasculite infiammatoria



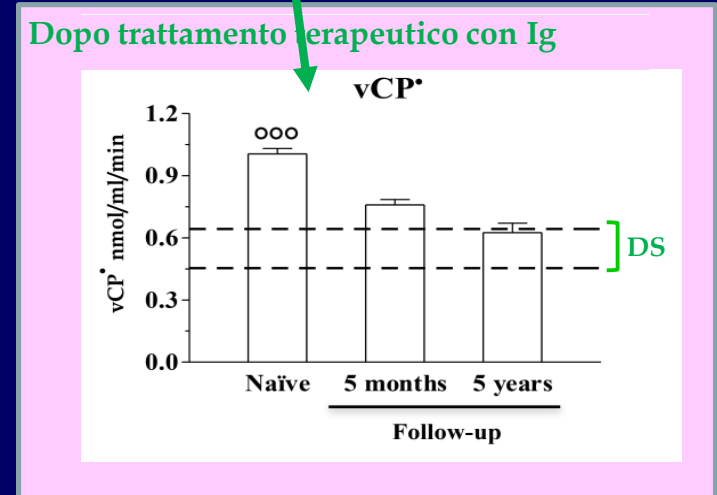
Pascucci et al (2016) *Oncotarget*



Parlanti et al (2015) *Mutat Res*



Straface et al (2012) *ARS*



Pietraforte et al (2015) *IJC*