

Università della Calabria

FACOLTÀ DI FARMACIA E SCIENZE DELLA
NUTRIZIONE E DELLA SALUTE

Dottorato di Ricerca in
“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”
XIX ciclo – Settore BIO/10

**EFFETTO DELL'ACIDO RETINOICO
SULLE CELLULE DEL LEYDIG:
REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI E DELLA
STEROIDOGENESI**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Tutor

Chiar.mo Prof. Giuseppe Genchi

Candidata

Dott.ssa Paola Tucci

Anno Accademico 2006-2007

*Alla mia famiglia
quanto di più caro
tra presente e futuro*

INDICE

<u>ABSTRACT</u>	pag. 1
1 <u>INTRODUZIONE</u>	pag. 4
1.1 ACIDO RETINOICO E RETINOIDI	pag. 4
1.1.1 <i>Origine dei retinoidi</i>	pag. 5
1.1.2 <i>Meccanismo d'azione dei retinoidi</i>	pag. 6
1.1.3 <i>Funzioni dell'acido retinoico</i>	pag. 9
1.2 STATO REDOX CELLULARE	pag. 11
1.3 APOPTOSI	pag. 15
1.3.1 <i>Apoptosi per via estrinseca</i>	pag. 22
1.3.2 <i>Apoptosi per via intrinseca</i>	pag. 24
1.4 FUNZIONE DELLE CELLULE DEL LEYDIG	pag. 29
1.4.1 <i>Regolazione della biosintesi di testosterone</i>	pag. 33
1.5 SCOPO DELLA TESI	pag. 35
2 <u>MATERIALI E METODI</u>	pag. 38
2.1 MATERIALI	pag. 38
2.2 LINEA CELLULARE	pag. 39
2.2.1 <i>Condizioni di coltura di routine</i>	pag. 40
2.3 SAGGIO DELLA VITALITÀ CELLULARE (MTT)	pag. 41
2.4 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CITOSOLICI	pag. 42
2.4.1 <i>Citocromo c</i>	pag. 43
2.4.2 <i>Caspasi-3</i>	pag. 43
2.5 DOSAGGIO PROTEICO	pag. 44
2.6 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	pag. 45

2.6.1	<i>Composizione dei gel elettroforetici</i>	pag. 45
2.6.2	<i>Separazione elettroforetica e trasferimento</i>	pag. 46
2.6.3	<i>Western blotting citocromo c</i>	pag. 47
2.6.4	<i>Western blotting caspasi-3</i>	pag. 47
2.6.5	<i>Chemiluminescenza</i>	pag. 48
2.7	ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA	pag. 49
2.8	RILASCIO DELLA LATTATO DEIDROGENASI	pag. 51
2.9	MISURA DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	pag. 53
2.10	SAGGIO DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI	pag. 55
2.10.1	<i>Glutazione S-transferasi</i>	pag. 55
2.10.2	<i>Superossido dismutasi</i>	pag. 56
2.10.3	<i>Catalasi</i>	pag. 57
2.11	DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DEL TESTOSTERONE	pag. 57
2.12	REAZIONE DI RETINOILAZIONE	pag. 58
2.12.1	<i>Incorporazione e misura della radioattività legata alle proteine</i>	pag. 59
2.12.2	<i>Analisi dell'acido retinoico legato covalentemente alle proteine</i>	pag. 60
2.13	ANALISI STATISTICA	pag. 61
3	<u>RISULTATI</u>	pag. 62
3.1	EFFETTO DELL'ACIDO RETINOICO SULLA VITALITÀ CELLULARE	pag. 62
3.2	EFFETTO DELL'ACIDO RETINOICO SULLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	pag. 65
3.3	L'ACIDO RETINOICO A CONCENTRAZIONI μ M INDUCE APOPTOSI	pag. 67
3.3.1	<i>RA induce il rilascio di citocromo c</i>	pag. 67
3.3.2	<i>RA produce l'idrolisi della procaspasi-3</i>	pag. 70
3.3.3	<i>RA induce frammentazione del DNA</i>	pag. 71
3.3.4	<i>L'apoptosi RA-indotta non è mediata dalla generazione di ceramidi</i>	pag. 72
3.3.5	<i>RA induce il rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi</i>	pag. 74

3.4 L'ACIDO RETINOICO MODULA L'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI	pag. 75
3.5 L'ACIDO RETINOICO È INCORPORATO NELLE PROTEINE DI CELLULE TM-3	pag. 77
3.5.1 <i>Effetto di RA sulla produzione di testosterone</i>	pag. 82
3.5.2 <i>Le proteine retinoilate regolano la steroidogenesi testicolare</i>	pag. 83
4 <u>DISCUSSIONE</u>	pag. 90
5 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 99
6 <u>ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI E DELLE COMUNICAZIONI A CONGRESSI</u>	pag. 112
6.1 PUBBLICAZIONI	pag. 112
6.2 COMUNICAZIONI A CONGRESSI	pag. 113

ABSTRACT

In addition to playing a fundamental role in very diverse processes such as vision and growth and differentiation, vitamin A (retinol) and its main biologically active derivate, retinoic acid (RA), are clearly involved in the regulation of testicular functions. Indeed vitamin A is necessary for the normal development and function of rodent testis. Accordingly, vitamin A deficiency results in testicular edema, degeneration of germinal epithelium and cessation of spermatogenesis.

Several studies have addressed the role of antioxidant retinoids in the protection against cancers and cardiovascular diseases. The antioxidant potency of β -carotene and vitamin A may scavenge oxygen radicals and protect against cancer occurrence. A growing body of evidence has in fact evidenced that retinoids have pro-oxidant properties, which might lead to cell oxidative damage and carcinogenesis.

The following thesis was undertaken to examine the direct effect of RA on Leydig cells (using the TM-3 *in vitro* cell line).

Metabolic vitality (MTT) assay showed that RA (at μ M concentration) exerts a cytotoxic effect on TM-3 cells in a dose- and time-dependent manner. RA treatment for 24 hours results in a dose-dependent induction of LDH release indicating the induction of a necrotic cell death. RA induces also a significant degree of apoptosis in the same cells in a dose-dependent manner. Apoptosis is demonstrated by the involvement of the mitochondrial pathway, that is release of cytochrome c and caspase-3 enzymatic activation. DNA ladders is visible on agarose gel after staining

with ethidium bromide, when the cells have been treated with 10 or 20 μ M RA for 24 hours.

Since higher RA doses induce lipid peroxidation with decreased cell viability, we investigated the effects of physiological RA treatment (at nM concentration) in TM-3 cells. In order to detect changes in the antioxidant defences we measured the GS-T, SOD and CAT activities in RA treated and non-treated TM-3 cells. RA increases the activity of antioxidant enzymes under physiological doses, thereby preventing oxidative cell damage as shown by the MDA content and cell viability.

Identification of the molecular mechanism of the RA action is of critical relevance in order to fully understand the biological effects of RA and therefore delineate a potentially more selective therapeutical exploitation.

The effects of RA are mediated through two classes of nuclear receptors, the RA receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs). These receptors belong to the steroid/thyroid hormone receptor superfamily, which regulate gene transcription through binding to selective DNA sequences, resulting in an increased or decreased synthesis of specific proteins. However, not all effects of RA can be explained by nuclear receptor pathways. Additional mechanisms may be involved in RA biological effects. Indeed, retinoylation (acylation of proteins by RA) is another mechanism of RA action. This is a peculiar post-translational modification of proteins, parallel to phosphorylation, palmitoylation, and myristoylation, and involves the formation of a retinoyl-CoA intermediate with the subsequent transfer and the covalent binding of the retinoyl moiety to the target protein.

The data reported in the present thesis show that in growing TM-3 cultures RA is linked via a thioester bond to proteins, the bond occurs on specific proteins and the extent of retinoylation depends in a saturable manner on the initial concentration of RA. Dose-response curves for the regulation of steroidogenesis by retinoic acid and retinoylation are similar showing a positive correlations. Thus, retinoylation seems to be a relevant physiological reaction of RA. Our results, demonstrating the presence of an alternative reaction of RA with proteins in steroidogenic cells, open a new perspective on the understanding of the molecular mechanisms regulating the effects of retinoids in testicular steroidogenesis.

In conclusion, retinoids are clearly involved in the regulation of testicular functions, and our results contribute to the understanding of their mechanisms of action, although these mechanisms are far away from being fully elucidated. Research on the effects, mode of action and physiological involvement of retinoids in testicular functions are currently conducted in rodents. It is therefore important to translate their potential therapeutic use on testicular functions in humans.

1. INTRODUZIONE

1.1 ACIDO RETINOICO E RETINOIDI

Gli organismi multicellulari richiedono l'esistenza di specifici meccanismi di comunicazione intercellulare per organizzare la loro complessa struttura durante l'embriogenesi e per mantenere le funzioni fisiologiche di ogni organo durante la vita. L'acido tutto-*trans*-retinoico (RA) e in generale i retinoidi sono molecole segnale che, insieme ai loro recettori nucleari, stabiliscono delle reti di comunicazione genetica essenziali per lo sviluppo embrionale e per il mantenimento dello stato differenziato dei tessuti attraverso la regolazione della proliferazione, differenziamento e morte cellulare (*see De Luca, 1991; Mendelsohn et al., 1994; see Ross et al., 2000*). Di particolare importanza è il ruolo esercitato sullo sviluppo e sulle funzioni fisiologiche del sistema nervoso e del sistema riproduttivo (*see Ross et al., 2000*).

I retinoidi, grazie al loro potere di condurre al differenziamento cellulare, offrono grandi potenzialità terapeutiche nel cancro. Gli effetti benefici della "terapia differenziante" sono in particolare ben conosciuti nel caso della leucemia acuta promielocitica, il cui trattamento standard prevede la combinazione di RA e di chemioterapia. Non bisogna tuttavia trascurare il fatto che a certe concentrazioni i retinoidi siano dei potenti teratogeni (*see Altucci & Gronemeyer, 2001*). È quindi indispensabile conoscere in modo approfondito le loro funzioni per poterne fare un corretto impiego.

1.1.1 Origine dei retinoidi

I retinoidi derivano dalla vitamina A (retinolo) assunta con la dieta, in particolare con uova, burro e olio di fegato di pesce, e dal β -carotene di origine vegetale. Dopo uptake ad opera delle cellule della mucosa intestinale, il retinolo viene esterificato e il retinil estere formatosi passa nel flusso sanguigno legato alle VLDL (Very Low Density Lipoprotein) da cui viene prelevato e immagazzinato nel fegato. In seguito alla rimozione attraverso il clivaggio del retinil estere, il retinolo viene ossidato a retinale e quindi ad acido retinoico (**Figura 1.1**).

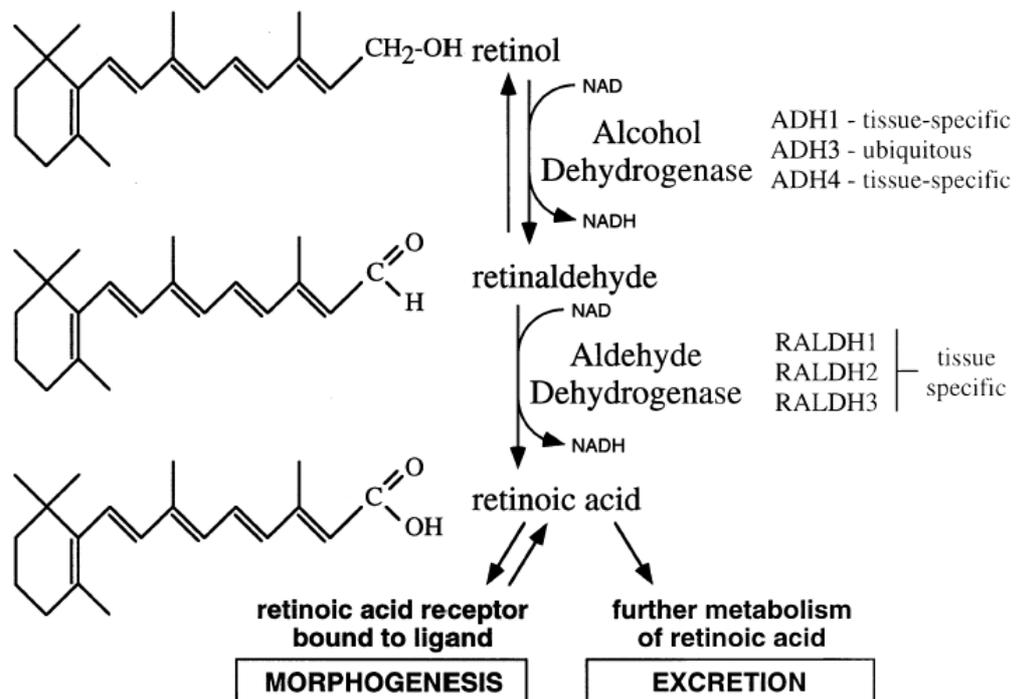


Figura 1.1 Biosintesi dell'acido retinoico da retinolo.

La prima reazione viene catalizzata da alcool deidrogenasi (ADH), nelle sue tre classi: ADH1, ADH3 e ADH4. La più attiva ed importante è la ADH3 che viene espressa ubiquitariamente nell'organismo. La retinaldeide deidrogenasi (RALDH) catalizza la seconda reazione. Anche questo enzima è presente in tre classi diverse (RALDH1, RALDH2 e RALDH3) che vengono espresse in maniera tessuto-specifica. Solo i tessuti in grado di esprimere questo enzima possono produrre acido retinoico. Si noti che sia ADH che RALDH richiedono NAD^+ per il loro funzionamento. Inoltre la seconda reazione è irreversibile e quindi molto delicata dal momento che, una volta sintetizzato, l'RA non può più essere riconvertito in retinale o retinolo (*Duester et al., 2003*). Solo una piccola porzione (0.2-5%) del retinolo presente nel plasma o nei tessuti viene convertita in acido tutto-*trans*-retinoico, il principale attivatore dei recettori per l'acido retinoico. Altri metaboliti con funzione di molecola segnale sono gli acidi 9-*cis*- e 13-*cis*-retinoico. Quest'ultimo ha un'attività inferiore rispetto agli altri due (*see Altucci & Gronemeyer, 2001*).

1.1.2 Meccanismo d'azione dei retinoidi

L'azione dei retinoidi si esplica attraverso due tipi di recettori nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei: RAR (Retinoic Acid Receptor) e RXR (Retinoic X Receptor) (*see Zhang & Pfahl, 1993; see Mangelsdorf & Evans, 1995*). Entrambi sono espressi in almeno tre isoforme denominate con α , β e γ , che differiscono nella distribuzione spazio-temporale e nell'affinità dei ligandi (*Kastner et al., 1990; Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991*).

I RAR e gli RXR sono fattori di trascrizione che funzionano principalmente come RAR-RXR eterodimeri. Questi eterodimeri presentano due funzioni distinte. La prima è quella di modulare la trascrizione di geni target in seguito al legame con i RARE (Retinoic Acid Response Element) presenti nei promotori di tali geni. La seconda consiste nel modulare l'efficienza di altre vie metaboliche attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti. L'effetto di questo tipo più importante è senz'altro la repressione dell'attivazione trascrizionale mediata da AP-1. È infatti anche grazie a questa inibizione che si può spiegare l'effetto anti-oncogenico dell'RA (*see Altucci & Gronemeyer, 2001*).

L'isomero acido tutto-*trans*-retinoico è il principale ligando e attivatore di RAR ma non di RXR. Il 9-*cis*-RA invece è in grado di legare e attivare sia RAR che RXR. Non è stato però ancora dimostrato che tale molecola sia il ligando fisiologico di RXR dal momento che sono stati identificati altri possibili ligandi endogeni (genericamente denominati "rexinoids").

In presenza di antagonisti del dimero RAR-RXR o in assenza dei loro ligandi, i geni target sono repressi. Questo può essere possibile a causa del reclutamento di HDAC (Histone DeAcetylase-containing Complex) legato per mezzo di corepressori (CoR) all'eterodimero (apo-)RAR-RXR (**Figura 1.2**, in alto). I due corepressori più importanti sono NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) e SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor). In questa situazione si verifica una deacetilazione degli istoni, una condensazione della cromatina e il conseguente silenziamento del gene.

Il legame di un agonista di RAR destabilizza il legame con il CoR e induce delle modificazioni allosteriche nella regione LBD (Ligand Binding Domain). Tali modificazioni generano una nuova superficie di interazione che, in un primo momento, permette la formazione di un complesso costituito dall'eterodimero (holo-)RAR-RXR e da un coattivatore (CoA). Il CoA lega HAT (Histone AcetylTransferase) che permette la decondensazione della cromatina (**Figura 1.2**, parte centrale). Successivamente si forma un complesso con TRAP (Thyroid hormone Receptor-Associated Protein) o con DRIP (vitamin D Receptor-Interacting Protein) o con SMCC (Srb and Mediator protein-Containing Complexes), il quale lega i macchinari per la trascrizione che può così avvenire (**Figura 1.2**, in basso) (*see Altucci & Gronemeyer, 2001*).

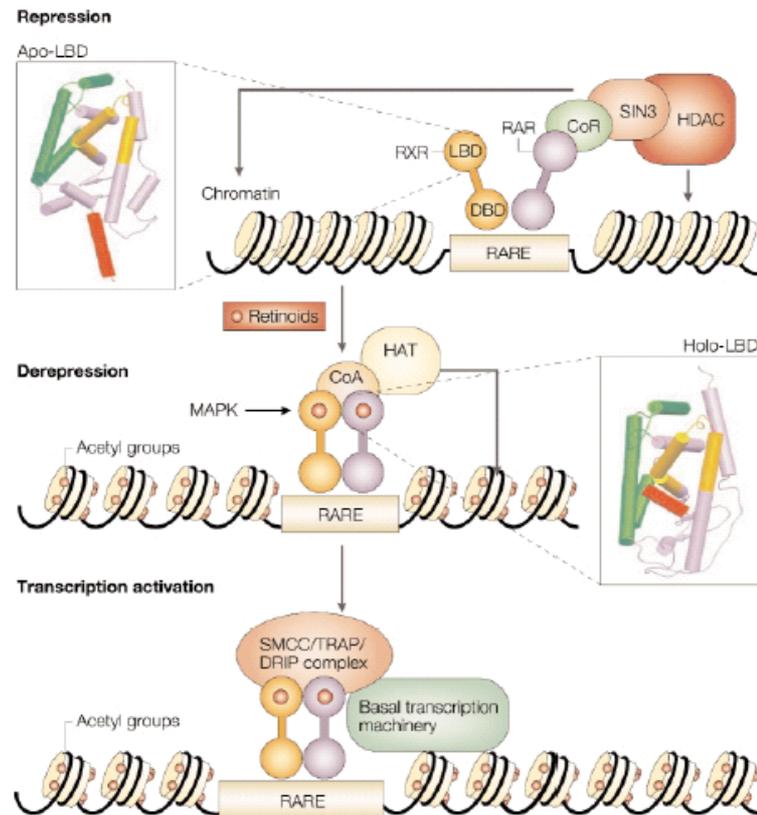


Figura 1.2 Meccanismi di repressione e attivazione trascrizionale attraverso l'eterodimero RAR-RXR

1.1.3 Funzioni dell'acido retinoico

Come precedentemente detto, l'RA è essenziale nella regolazione dell'embriogenesi. Una bassa concentrazione di vitamina A causa malformazioni, mentre se la concentrazione è elevata si hanno effetti teratogeni. Questo supporta l'idea che l'RA sia un agente importante per la morfogenesi. Alcuni esperimenti mostrano che quasi tutte le malformazioni congenite causate da deficienza di vitamina A sono dovute alla assenza delle funzioni di RAR e RXR. Quindi una dose sub-teratogena di RA può prevenire alcuni difetti congeniti, indicandone una notevole importanza

nella gravidanza. Nell'adulto i retinoidi sono indispensabili per il corretto funzionamento di diversi organi tra cui fegato, pelle, polmoni, sistema nervoso, sistema immunitario e sistema riproduttivo

Per quel che riguarda l'attività antitumorale dei retinoidi, bisogna considerare che esistono molti fattori che possono contribuire alla nascita di un tumore come ad esempio le modificazioni geniche o la carcinogenesi chimica. I retinoidi possono interferire con questi fattori su vari livelli (**Figura 1.3**).

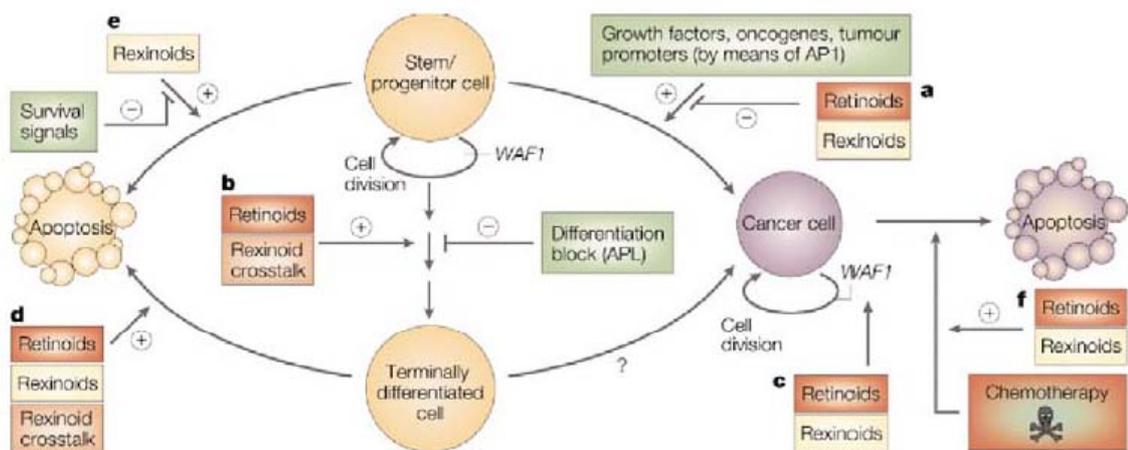


Figura 1.3 Punti chiave in cui i retinoidi e i rexinoidi possono interferire sulla genesi tumorale. **(a)** Blocco della carcinogenesi chimica probabilmente grazie all'inibizione di AP-1. **(b)** Induzione e stabilizzazione del differenziamento. **(c)** Blocco del ciclo cellulare della cellula cancerosa in G1. **(d)** Effetto apoptotico post-maturazione. **(e)** Morte delle cellule premature ad opera solo dei "rexinoidi" in certe condizioni. **(f)** Induzione di apoptosi di cellule cancerose (senza o in combinazione con agenti chemioterapici).

Le azioni principalmente note consistono nell'induzione del differenziamento e/o dell'apoptosi delle cellule tumorali e nell'inibizione della propagazione tumorale nei casi di cancro chimicamente indotti.

1.2 STATO REDOX CELLULARE

Per stato redox cellulare s'intende il rapporto di concentrazione intracellulare tra i composti pro- e anti-ossidanti. Tra i composti pro-ossidanti sono annoverate tutte le specie reattive dell'ossigeno (ROS), degli antiossidanti fanno parte invece tutte quelle molecole che hanno la funzione di tamponare la concentrazione e l'effetto dei primi.

Nell'ambiente intracellulare la presenza dei ROS è fisiologica e costante; essi infatti sono prodotti dal metabolismo aerobico mitocondriale, dall'attività degli enzimi con la funzione di ossidasi (xantina ossidasi, NADPH ossidasi, ammine ossidasi, mieloperossidasi, lipoossigenasi, cicloossigenasi) e dal reticolo endoplasmatico attraverso l'attività del Citocromo P450 (Cyt P450). La produzione endogena dei ROS non è l'unica fonte di specie ossidanti; infatti, costantemente le cellule sono bersagliate dall'esterno da radiazioni ionizzanti, ultrasuoni, fumo di sigaretta, pesticidi ed inquinanti, composti ossidanti di diversa natura chimica, che contribuiscono ad incrementare il pool interno delle molecole ossidanti.

I ROS includono radicali liberi come l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), i radicali idrossilici ($\cdot OH$), i perossi-radicali ($ROO\cdot$) e specie non radicaliche come il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Denominatore comune di queste specie chimiche è l'elevata reattività, che si manifesta anche a concentrazioni bassissime (pmol/L), ed una emivita che varia da 10^{-12} secondi a poche ore e raramente giorni, ed infine la capacità di danneggiare macromolecole quali acidi nucleici, proteine, ma soprattutto fosfolipidi delle membrane cellulari.

La pericolosità dei ROS è bilanciata e annullata nella cellula attraverso il vasto spiegamento e la meticolosa attività di enzimi antiossidanti e scavenger deputati alla rimozione di tali composti. Del primo gruppo fanno parte gli enzimi specifici per il tipo di ROS presente nella cellula, come la *superossido dismutasi* (SOD) che accelera la dismutazione dello ione superossido in perossido di idrogeno; la *catalasi* (CAT), che permette la degradazione del perossido di idrogeno in acqua ed ossigeno; e la *glutathione S-transferasi* (GS-T), che esercita un'azione detossificante coniugando una vasta gamma di composti elettrofilici al glutathione (GSH) (see Hayes & Pulford, 1995; see Salinas & Wong, 1999). Al secondo gruppo appartengono vitamine e composti antiossidanti ad attività generalizzata come l' α -tocoferolo (Vitamina E), il β -carotene, l'acido ascorbico (Vitamina C), il glutathione (GSH), ed il selenio, deputati alla protezione di tutte le molecole presenti nel citoplasma e della membrana cellulare.

Finché nella cellula la quantità delle molecole pro-ossidanti è mantenuta sotto stretto controllo dagli scavenger e dagli enzimi antiossidanti, queste svolgono funzione di regolazione dei processi di crescita e differenziamento, ma qualora la loro concentrazione superi quella dei composti antiossidanti si instaura un disequilibrio redox, conosciuto come *stress ossidativo* (see Halliwell, 1999), con conseguente insorgenza di gravi patologie degenerative che includono la malattia di Huntington, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la malattia di Alzheimer. Inoltre numerosi sono gli studi che evidenziano una stretta correlazione tra stress ossidativo e processi di carcinogenesi. Un così grande impatto a livello fisiologico dello stress ossidativo è da imputare

alla capacità dei ROS di modificare tutti i macro-componenti cellulari tra cui le proteine, gli acidi nucleici ed i fosfolipidi delle membrane lipidiche. Quando nella cellula si instaura un disequilibrio redox tanto forte da permettere l'affermazione di uno stato di stress, le proteine, abbiano esse ruoli funzionali o strutturali, vengono modificate e rese pressoché inattive o attive erroneamente. Ulteriore bersaglio dei ROS è il DNA che subisce mutazioni al livello di tutte e quattro le basi azotate e del deossiribosio permettendo che numerose mutazioni si accumulino sul doppio filamento (*see Valko et al., 2004*). I doppi legami dei fosfolipidi delle membrane biologiche sono anch'essi bersaglio dei ROS che attivano la reazione a catena di *perossidazione* responsabile della destabilizzazione strutturale e funzionale della membrana e delle lipoproteine in essa contenute con effetti deleteri sull'ambiente intracellulare. Durante la perossidazione lipidica, il gruppo idrossile $\cdot\text{OH}$, il ROS più reattivo nei confronti dei lipidi, si inserisce nel doppio strato attaccando le insaturazioni delle catene aciliche generando ulteriori radicali con la funzione di propagare la reazione che come termine ultimo produce idroperossi-lipidi (LOOH). Una volta formati, i lipoperossidi, in dipendenza da una varietà di circostanze intracellulari, possono degradarsi o riarrangiare la loro struttura aumentando il loro effetto citotossico con la formazione di intermedi e prodotti altamente reattivi come le aldeidi, quali la malondialdeide (MDA) e/o l'idrossinonenale (HNE) e i radicali alchilici che possono attaccare proteine e DNA minandone struttura e funzione (**Figura 1.4**).

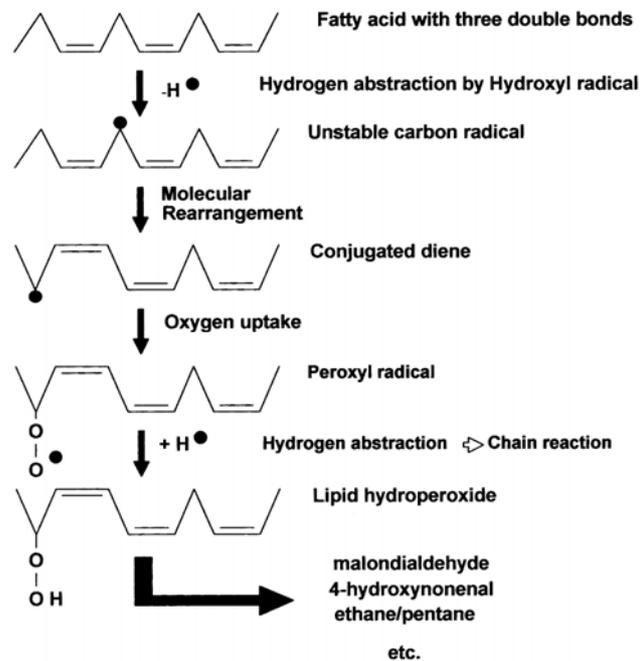


Figura 1.4. Reazione a catena della perossidazione lipidica e formazione della malondialdeide (MDA).

La perossidazione lipidica svolge un ruolo importante nell'attivazione dei processi apoptotici. Anche se la relazione tra morte cellulare programmata e lipoperossidi non è ancora del tutto chiara, è certo che essi svolgono un ruolo di spicco nell'attivazione della via apoptotica. Il livello di perossidazione e quindi il grado di stress subito dalla cellula fanno da elemento decisionale nella scelta del futuro cellulare: **(1)** l'assenza di fenomeni di perossidazione lipidica all'interno della cellula non dà situazione di stress per cui la quantità di specie pro-ossidanti è esattamente bilanciata da quelle antiossidanti e come risultato si ottiene la sopravvivenza cellulare; **(2)** una dose relativamente bassa di lipoperossidi può incrementare la risposta citoprotettiva da parte della cellula con aumento delle difese antiossidanti (GSH, α -tocoferolo, acido ascorbico,

attivazione CAT, SOD, GS-T) che fanno fronte allo stress assicurando vitalità cellulare; (3) un danno ossidativo più esteso e quindi non perfettamente tamponato dalle barriere antiossidanti prevede un aumento dei lipoperossidi che, superando un ancora indefinito valore soglia, inducono la morte cellulare attraverso la via apoptotica; (4) qualora il livello di danno ossidativo sia particolarmente elevato la cellula subisce passivamente la condizione di stress e muore per necrosi.

1.3 APOPTOSI

L'apoptosi riveste l'importante ruolo biologico di regolazione nella maggior parte dei processi fisiologici coinvolgendo il differenziamento, l'omeostasi e la rimozione di cellule anormali in tutti i tessuti. Nell'uomo i processi di morte cellulare programmata sono basilari nel normale sviluppo embrionale (*Meier et al., 2000*) oltre che nella maturazione del sistema nervoso centrale (*Naruse & Keino, 1995*), nell'atrofia tissutale endocrino-dipendente (*Kyprianou et al., 1988*) e nel turnover cellulare di un tessuto (*see Wyllie et al., 1980; Lynch et al., 1986*). Anche a livello del sistema immunitario l'apoptosi riveste un ruolo importante di regolazione; infatti la selezione timica, l'eliminazione di cellule infettate da virus o cancerose e lo spegnimento delle risposte immunitarie (*Cohen et al., 1992*) sono esempi di indispensabilità d'intervento del processo apoptotico. In questi termini è facile capire come una disfunzione o una deregolazione del programma di morte apoptotica possa essere la causa di un'ampia varietà di condizioni

patologiche anche gravi che sfociano spesso in malattie cancerose o autoimmuni e patologie neurodegenerative o ischemiche.

Dal punto di vista morfologico la cellula apoptotica segue una serie di stadi stereotipati come conseguenza di eventi biochimici e molecolari che in essa sopraggiungono. Durante le fasi precoci del processo apoptotico la cellula si condensa perdendo rapidamente volume, diminuisce i contatti con le cellule limitrofe e sostituisce le eventuali specializzazioni di membrana con catene proteiche, non espresse in condizioni normali, dette “molecole eat-me” con la funzione di rendere più semplice il compito dei macrofagi, che per fagocitosi, provvedono all’eliminazione dei detriti cellulari alla fine del processo. A livello nucleare si nota la disgregazione del nucleolo e la condensazione della cromatina, che verrà frammentata in porzioni discrete di 180-200 bp, lunghezza corrispondente ai tratti di DNA internucleosomale. L’ultima fase del processo prevede la frammentazione dell’intera cellula in complessi membranosi contenenti citosol, cromatina condensata e organelli, indicati come *corpi apoptotici*, che verranno rapidamente rimossi dai macrofagi per evitare possibili risposte infiammatorie e processi flogistici secondari. L’intero processo apoptotico interessa simultaneamente solo poche e singole cellule in un intero tessuto, e non dura che una o al massimo due ore, caratteristiche che ne rendono difficoltosa la localizzazione (Golstein et al., 1991; see Majno & Joris, 1995).

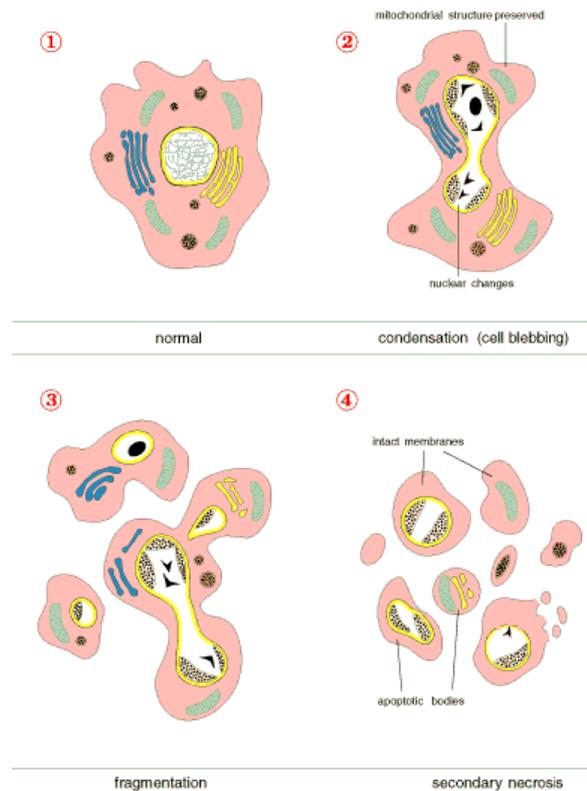


Figura 1.5 Fasi salienti del processo apoptotico: **(1)** Cellula in condizioni fisiologiche normali. **(2)** Fase precoce di condensazione e riduzione del volume. **(3)** Frammentazione della cellula e formazione dei corpi apoptotici. **(4)** Fase terminale del processo apoptotico con completa frammentazione cellulare e necrosi secondaria.

Le modifiche morfologiche stereotipate che caratterizzano una cellula apoptotica sono modulate e sviluppate secondo dei meccanismi genetici e molecolari altrettanto conservati che prevedono la presenza cellulare di fattori geneticamente determinati pronti ad essere attivati, secondo un ordine ben definito, in risposta ad un segnale di morte. Le fasi salienti attraverso cui si sviluppa il programma apoptotico riguardano: l'induzione del processo, l'esecuzione e il riconoscimento/fagocitosi dei corpi apoptotici da parte dei macrofagi.

La *fase di attivazione* della morte cellulare programmata prevede diversi stimoli sia di origine endogena sia esogena in grado di innescare i percorsi biochimici che porteranno alla fase di esecuzione, stereotipata ed irreversibile, dell'apoptosi. Importante induttore endogeno di morte cellulare programmata è il prodotto del gene onco-soppressore p53, la proteina p53. Tale proteina è responsabile dell'arresto della crescita e di una eventuale riparazione o eliminazione di cellule nelle quali si sia manifestato un danno del materiale genetico. La proteina p53 lavora di concerto, nell'eliminazione di cellule anormali, con il prodotto di un altro onco-soppressore: la proteina pRb, primo regolatore nell'avanzamento di una cellula attraverso il ciclo cellulare. Mutazioni a carico di ambedue gli onco-soppressori contribuiscono alla comparsa di gravi patologie neoplastiche, ne sono un esempio la sindrome di Li-Fraumeni, causata da una mutazione autosomica dominante a carico del gene p53, e il retinoblastoma infantile che è il risultato di una mutazione somatica del gene Rb.

L'assenza di fattori di crescita, indispensabili per la sopravvivenza cellulare, permette lo svolgersi di un programma endogeno di default che attiva l'apoptosi cellulare (*Kerr et al., 1972*); ne sono un esempio i linfociti T che in assenza di interleuchina-2 (IL-2), importante segnale mitogeno, attivano il programma di morte cellulare.

Un'altra importante causa di apoptosi è la riduzione di disponibilità di molecole di ATP. Pare infatti che esista un rapporto tra ADP ed ATP, pari a 1:5, che rappresenta un valore soglia al di sotto del quale la cellula attiva il programma suicida. Precisamente se il calo di ATP è massiccio, la morte

cellulare si manifesta sotto forma di necrosi, se risulta più moderato tutto si risolve per apoptosi (Leist et al., 1997).

Anche la regolazione di importanti messaggeri intracellulari, quali il calcio (Ca^{2+}) (see Richter & Kass, 1991) e di enzimi regolatori quali la proteinchinasi C (PKC) (Bertrand et al., 1994) può, in modo ancora non del tutto chiaro, indurre apoptosi in un'ampia varietà di tipi cellulari. Un aumento dei flussi intracitoplasmatici di Ca^{2+} avviene molto precocemente, e può derivare sia dall'entrata di tale ione dall'ambiente extracellulare sia dal suo rilascio dai siti di sequestro intracellulari. Tale aumento sembrerebbe implicato nel processo di morte cellulare programmata a due livelli: quello di traduzione del segnale, dove il Ca^{2+} potrebbe agire a monte di altri secondi messaggeri, convergenti poi sull'attivazione di una serie di proteinchinasi e/o fosfatasi in grado di regolare molecole effettrici del processo apoptotico; oppure quello di stimolare direttamente, in una fase più tardiva, l'attività di enzimi come proteasi ed endonucleasi, implicati nel meccanismo di morte cellulare.

Mentre, come sopra menzionato, tra gli induttori della fase di attivazione dell'apoptosi possono essere annoverati più fattori, per la *fase di esecuzione* del processo, la cellula prevede una serie di eventi stereotipati comuni o quasi, a tutte le vie d'innescamento. La fase di esecuzione avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche a catena non più arrestabili ed automatiche, che portano la cellula inevitabilmente verso la morte cellulare. Protagonisti della fase di esecuzione sono gli enzimi *caspiasi* (Cistein proteasi specifiche per l'amminoacido Aspartico), la cui attività catalitica dipende dalla presenza nel sito attivo (QACRG) di un residuo di cisteina altamente conservato, e di un residuo di acido aspartico

al livello del quale avviene il taglio proteolitico. Le caspasi sono presenti nel citosol in forma di procaspasi, zimogeni inattivi, che subiscono il taglio proteolitico da parte di altre caspasi a monte secondo reazioni a catena, attivandosi in forma di eterotetramero. Fine ultimo della cascata delle caspasi è disattivare tutti gli enzimi coinvolti nel mantenimento dei sistemi vitali cellulari quali riparazione e duplicazione del DNA, splicing dello RNA, conservazione della struttura citoscheletrica, per indurre a morte la cellula.

La famiglia delle caspasi nell'uomo raggruppa ben 12 membri, di cui solamente sette a tutt'oggi prendono attivamente parte al processo di morte cellulare. Le caspasi -1, -4, -5, -11, -12 sembrano infatti essere coinvolte nel processo proteolitico di maturazione di citochine proinfiammatorie quali pro-IL-1 β e pro-IL-8 piuttosto che nel macchinario esecutivo apoptotico (*see Denault & Salvesen, 2002*), mentre alle caspasi-2, -3, -6, -7 e caspasi-8, -9, -10 è stato riconosciuto il ruolo di protagoniste nello svolgimento del processo di morte cellulare. In particolare, mentre le caspasi-2, -3, -6 e -7 sono indicate come vere e proprie esecutrici del processo di morte, le caspasi restanti hanno funzione di "iniziatori", una sorta di innesco segnale-specifico per diverse modalità di svolgimento della morte cellulare programmata. La morte cellulare programmata prevede infatti due diverse vie di attivazione, **(I)** quella estrinseca o recettore-dipendente in cui il segnale di morte è fornito da oligomerizzazione del recettore di morte, espresso sulla superficie cellulare, attraverso il legame con il proprio ligando, e **(II)** la morte indotta per via intrinseca, indipendente da recettori extracellulari ma strettamente correlata alla presenza nel citosol di molecole pro-apoptotiche altrimenti confinate e

sequestrate in compartimenti cellulari. La prima via presenta la caspasi-8 come iniziatrice della fase di esecuzione del processo apoptotico, mentre la via intrinseca utilizza la caspasi-9 (Figura 1.6).

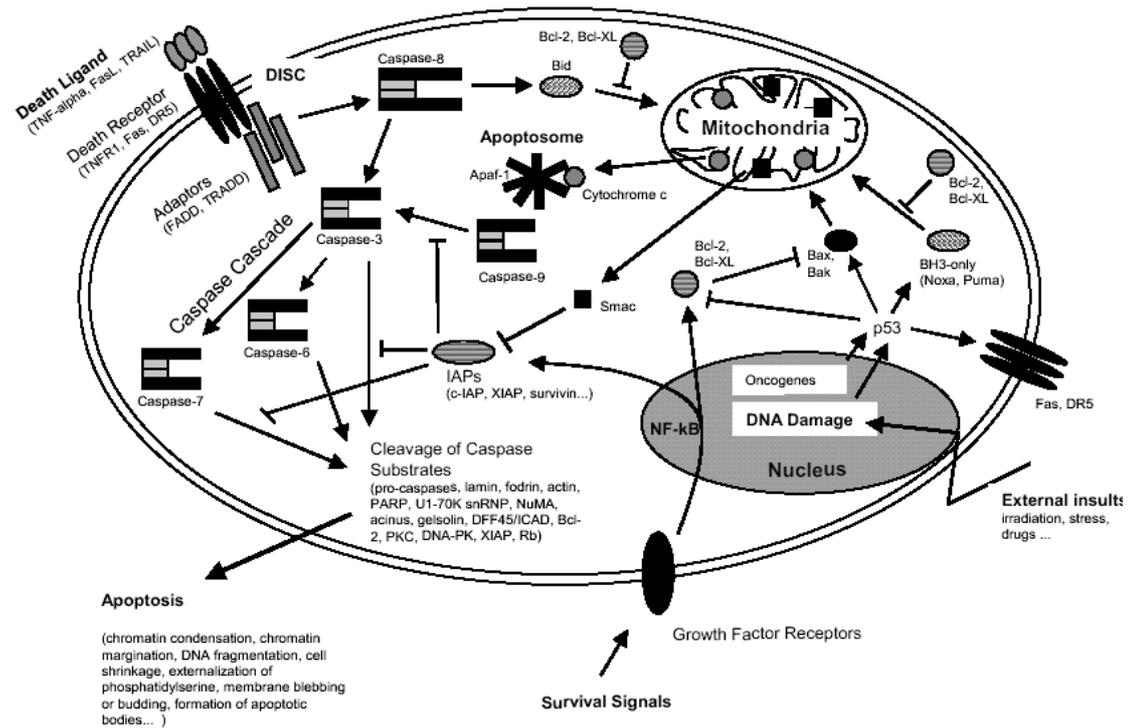


Figura 1.6 Rappresentazione schematica generale delle maggiori vie apoptotiche. L'apoptosi può essere indotta in risposta a diversi stimoli esterni o interni alla cellula, rispettivamente oligomerizzazione dei recettori di morte e stress intracellulare indotti da oncogeni, radiazioni o farmaci.

1.3.1 Apoptosi per via estrinseca

L'apoptosi per via estrinseca (**Figura 1.7**) è mediata dall'attivazione di recettori espressi sulla superficie cellulare, indicati come "death receptors", che a seguito di legame con il proprio ligando trasmettono il segnale apoptotico e l'attivazione del programma di morte. Tali recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori per TNF (Tumor Necrosis Factor) di cui fanno parte i recettori TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor- α Receptor), CD95 (Fas), e TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor) specifici per i loro ligandi, rispettivamente TNF, CD95L (FasL), TRAIL. Tali recettori condividono caratteristiche comuni sia dal punto di vista strutturale sia da quello funzionale e presentano un dominio extracellulare ricco in cisteina ad alta specificità per il proprio ligando che ne rende possibile l'attivazione tramite trimerizzazione, e un dominio citoplasmatico indicato come DD (Death Domain) indispensabile per il trasferimento del segnale dall'ambiente extra-cellulare all'interno della cellula. (Nagata, 1996; see Naismith & Sprang, 1998). Il DD, una volta ricevuto il segnale di trimerizzazione recettoriale, recluta molecole adattatrici intracellulari FADD (Fas-Associated Death Domain) che tramite i loro DED (Death Effector Domain) sequestrano molecole di procaspasi-8 iniziatrici in prossimità della membrana per la formazione del DISC (Death Initiation Signalling Complex). Attraverso un processo di trans- e auto-proteolisi nel DISC, lo zimogeno procaspasi-8 viene trasformato in complesso attivo, caspasi-8, capace di processare a sua volta ulteriori caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7). La reazione a catena può culminare nell'attivazione diretta della caspasi-3, vera effettrice della via di morte poiché capace di inattivare e processare gli enzimi indispensabili alla

vitalità cellulare (Apoptosi recettore-mediata di Tipo I), oppure nel processamento della proteina Bid, appartenente alla famiglia di Bcl-2, che integrandosi nel mitocondrio permette il rilascio dei fattori proapoptotici in esso contenuti (Apoptosi recettore-mediata di Tipo II) (*Scaffidi et al., 1998*).

La via estrinseca è normalmente utilizzata dal sistema immunitario per la selezione e la delezione timica della popolazione di linfociti T, lo spegnimento della risposta immunitaria evitando l'accumulo di linfociti reattivi, il mantenimento dello stato di immuno-privilegio per alcuni organi come occhi e testicoli, l'attività citotossica di linfociti CTL e cellule NK nei confronti di cellule infettate da virus o in tumorigenesi .

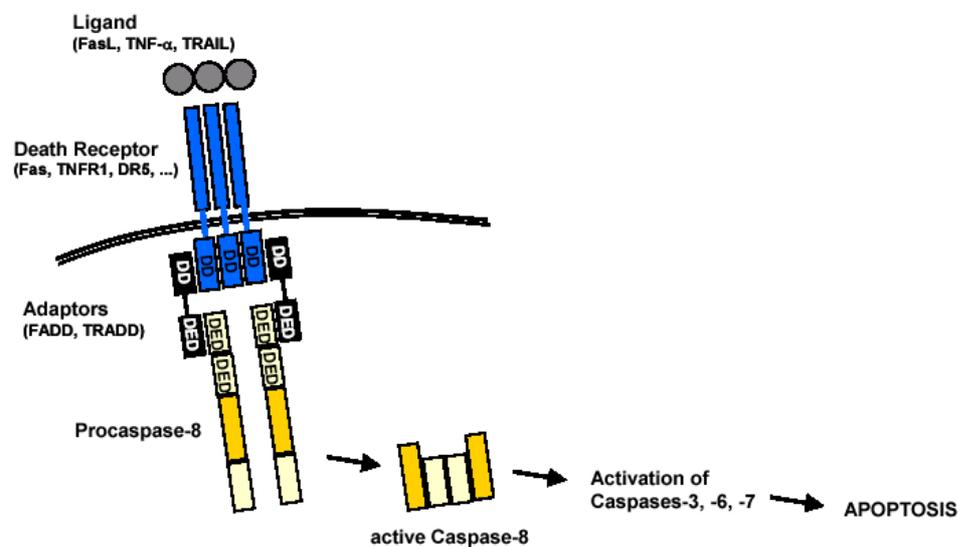


Figura 1.7 Apoptosi per via estrinseca. Dopo il legame con il proprio ligando (FasL, TNF- α , TRAIL) il recettore di morte (Fas, TNF-R1, TRAIL-R) oligomerizza e recluta dal citosol molecole adattatrici e procaspasi-8 formando il DISC. Attraverso il taglio auto-proteolitico, la procaspasi si attiva processando le caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7) per la fase di esecuzione dell'apoptosi.

1.3.2 Apoptosi per via intrinseca

Nell'apoptosi che procede secondo il meccanismo intrinseco (**Figura 1.8**), il segnale di attivazione del processo può essere sia interno che esterno alla cellula. Deprivazione di fattori di crescita e sostanze nutritive, attivazione degli oncogeni, radiazioni UV, danni a carico del materiale genetico, stress di varia natura (stress ossidativo o indotto da agenti chemioterapici), sono solo alcuni esempi di fattori che minano la stabilità cellulare attivando il processo di morte cellulare programmata. La via intrinseca si manifesta a seguito di una alterazione dello stato fisiologico dei mitocondri, organelli che non solo sono sede della respirazione cellulare ma rappresentano compartimenti di sequestro per vari fattori proapoptotici (*Green & Reed, 1998; Bernardi et al., 1999; Kroemer & Reed, 2000; see Loeffler & Kroemer, 2000*). I segnali di morte endogeni hanno come bersaglio preferito il potenziale di membrana interna del mitocondrio ($\Delta\psi$). Tale potenziale viene destabilizzato dall'incremento della permeabilità di membrana (PT, Permeability Transition) che in maniera incontrollata permette il passaggio nell'organello di acqua citosolica e soluti fino al suo rigonfiamento e rottura della membrana esterna. Una volta distrutta l'integrità mitocondriale, segue il rilascio nell'ambiente citoplasmatico di fattori ad effetto proapoptotico come il citocromo c, AIF (Apoptosis-Inducing Factor) (*Susin et al., 1999*), endonucleasi endoG (*Li et al., 2001*), Smac/Diablo (*Verhagen et al., 2000*). Il rilascio di tali fattori, l'incremento della permeabilità di membrana (PT), la dissipazione del potenziale di membrana del mitocondrio sono causa di una diminuzione dell'omeostasi cellulare durante la quale la sintesi dell'ATP è sospesa e le molecole implicate nella regolazione dello stato

redox generale sono ossidate (NADPH, NADH, GSH) con relativo aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Kroemer *et al.*, 1997; Kroemer & Reed, 2000). Ne consegue una ossidazione aspecifica ed indiscriminata di lipidi, proteine e acidi nucleici (Marchetti *et al.*, 1997). Sono molti i meccanismi che sono stati proposti per spiegare PT, e a tutt'oggi il riferimento maggiore è verso i cosiddetti Pori PT (PTP, Permeability Transition Pore), composti dalla fusione del traslocatore di adenin nucleotide (ANT, Adenin Nucleotide Traslocator) e un canale per anioni voltaggio-dipendenti (VDAC, Voltage-Dependent Anion Channel) (Halestrap & Brennerb, 2003). ANT è una proteina *trans*-membrana della membrana mitocondriale interna con funzione di canale antiporto. Questa proteina è responsabile dello scambio di ATP dal mitocondrio al citosol e contemporaneamente di ADP dal citosol al mitocondrio. In realtà l'ATP prodotto all'interno del mitocondrio non è la stessa molecola che verrà a trovarsi nel citoplasma. Infatti nello spazio intermembranale, il fosfato altamente energetico dell'ATP viene scambiato con la creatina, formando la creatina-fosfato, ad opera della creatina chinasi (CK). Mentre l'ADP risultante ritorna indietro attraverso la membrana mitocondriale interna, la creatina-fosfato attraversa la membrana mitocondriale esterna grazie all'azione di VDAC. Nel citoplasma una nuova molecola di CK scambia nuovamente il gruppo fosfato trasformando una molecola citosolica di ADP in ATP. La creatina ritorna nello spazio intermembranale mitocondriale per effettuare un nuovo trasporto. VDAC, anche chiamata *porina*, è presente invece sulla membrana mitocondriale esterna dove costituisce un poro non selettivo. Tramite interazioni proteina-proteina i due tipi di molecole *trans*-membrana formano complessi VDAC-ANT che mettono in contatto la

membrana esterna con quella interna costituendo dei siti di connessione tra di esse (*Beutner et al., 1998*). Poiché la variazione di permeabilità PT della membrana è il fattore scatenante della morte cellulare mitocondrio-mediata, i pori PTP rappresentano per la vitalità cellulare un punto critico da mantenere sotto stretto controllo utilizzando dei raffinati meccanismi regolatori di cui sono protagoniste le proteine della famiglia Bcl-2 (*Adams & Cory, 1998; see Cory & Adams, 2002*).

Con il termine Bcl-2 si definisce una famiglia di geni che codificano per proteine ad attività anti-apoptotica e pro-apoptotica, localizzate sia sulla membrana mitocondriale esterna, dove svolgono un'importante funzione regolatoria, sia sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico. Nei mammiferi sono stati codificate almeno 30 proteine appartenenti a questa classe, alcune delle quali manifestano attività anti-apoptotica come le proteine Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A-1, altre invece rivestono il ruolo di induttori di morte come Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Bim, Bad, e Bid. Esse condividono uno o più motivi fortemente conservati detti Bcl-2 Homology Domains (BHs), conosciuti come BH1, BH2, BH3, BH4, con la funzione di mediare l'interazione proteina/proteina per formare dimeri o oligomeri .

Dal momento della loro scoperta le proteine Bcl-2 hanno sollevato nel mondo scientifico non pochi dibattiti sul loro meccanismo d'azione nella regolazione del processo di morte cellulare programmata. Il primo modello fu quello che prevedeva una regolazione diretta da parte delle proteine Bcl-2 sull'attivazione della reazione a catena delle caspasi (*see Strasser et al., 2000a, 2000b*), poi abbandonato a favore della seconda ipotesi di cui si è fatto portavoce Wang (*see 2001*), il quale ipotizzava per le proteine Bcl-2 un ruolo centrale nella regolazione del processo apoptotico, ma solo in

riferimento al mantenimento dell'integrità mitocondriale e al controllo del rilascio nel citosol di fattori pro-apoptotici in esso contenuti. Secondo la teoria di Wang, peraltro non del tutto accettata, la funzione di regolazione del processo apoptotico da parte delle proteine Bcl-2 risiede nella possibilità di tali proteine di sequestrare e rendere inattiva la controparte pro-apoptotica eterodimerizzando con essa. In questo modo il rapporto tra proteine inibitrici e attivatrici del programma di morte della famiglia Bcl-2 può determinare la propensione di una cellula a sopravvivere o a morire (see *Yang & Korsmeyer, 1996*).

Poiché la principale funzione delle proteine Bcl-2 ad azione pro-apoptotica è quella di dimerizzare e modificare la permeabilità mitocondriale, formando pori attraverso la membrana (*Antonsson et al., 2000*), e di destabilizzare l'integrità dei pori PT preesistenti legandosi ad uno dei suoi componenti VDAC (see *Tsujimoto & Shimizu, 2000*), è chiaro come Bcl-2 e proteine anti-apoptotiche affini svolgano un ruolo regolatorio di spicco nell'attivazione del programma apoptotico intrinseco. Questa funzione di regolazione da parte di Bcl-2 è resa possibile grazie alla sua localizzazione a livello della membrana mitocondriale, la proteina sembra infatti legata ai complessi sopramolecolari (ANT/VDAC) che compongono i pori PTP. Qualora l'attività anti-apoptotica di Bcl-2 non fosse sufficiente a contenere la traslocazione e l'attivazione dei membri pro-apoptotici Bax e Bak, i pori che essi formano attraverso la membrana mitocondriale permettono il passaggio dal mitocondrio al citosol di fattori, primo fra tutti il citocromo c, scatenanti la fase di esecuzione dell'apoptosi con l'attivazione della cascata delle caspasi. Il passaggio del citocromo c nel citoplasma e del fattore Apaf-1 in presenza di ATP permette la produzione

dell'*apoptosoma*, un complesso multiproteico citosolico che comprende molecole di procaspasi-9, caspasi iniziatrice nella via intrinseca mitocondrio-mediata (*see Salvesen & Renatus, 2002*). Nell'*apoptosoma*, grazie all'attività proteolitica di Apaf-1, la procaspasi-9 da zimogeno inattivo passa alla forma attiva (*see Denault & Salvesen, 2002*) in grado di processare gli effettori procaspasi-3, -6, -7 che taglieranno ulteriori proteine substrato con l'effetto di ampliare il segnale di morte e avviare i cambiamenti morfologici e biochimici caratteristici di una cellula apoptotica.

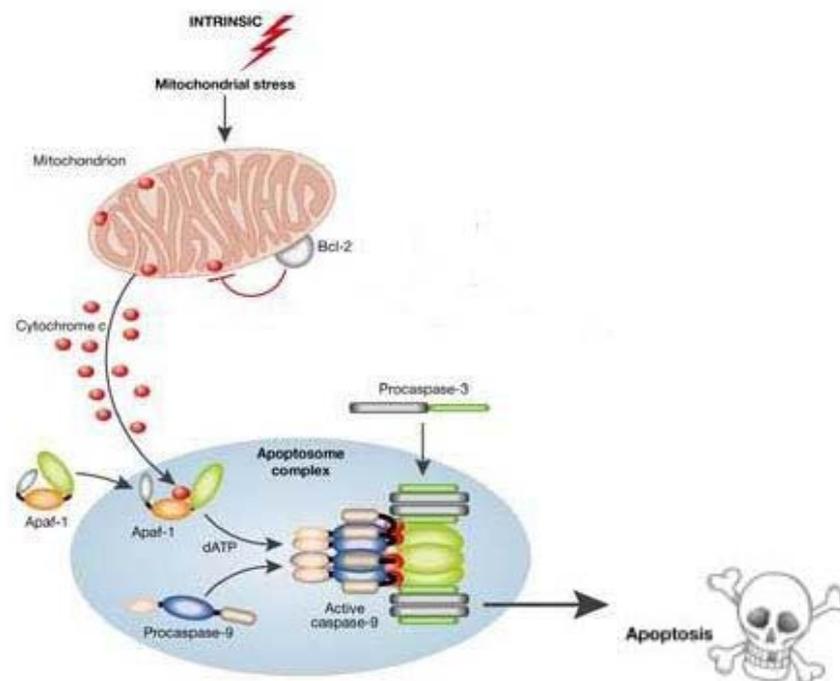


Figura 1.8 Apoptosi per via intrinseca. I segnali di morte inducono il rilascio di fattori pro-apoptotici dal mitocondrio come il citocromo c che, nel citosol, inducono la formazione dell'*apoptosoma* (citocromo c, Apaf-1 e dATP) e la processazione della procaspasi-9 a caspasi-9 attiva in grado così di attivare le caspasi effettrici a valle (caspasi-3).

1.4 FUNZIONE DELLE CELLULE DEL LEYDIG

Come è noto i testicoli svolgono due funzioni, una endocrina, caratterizzata dalla secrezione di androgeni, e l'altra, esocrina, caratterizzata dalla produzione di spermatozoi. Queste due funzioni sono peraltro collegate tra loro, essendo da tempo dimostrato che la spermatogenesi è androgeno-dipendente.

All'interno del testicolo esistono due compartimenti strutturalmente diversi che rivestono funzioni fisiologiche differenti:

- Tubuli seminiferi
- Tessuto interstiziale

I tubuli seminiferi contengono esclusivamente le *cellule del Sertoli* e le *cellule germinali* e sono responsabili della spermatogenesi.

Disposte negli interstizi tra i tubuli seminiferi si trovano, invece, numerose cellule grandi, poliedriche e ricche di granuli lipidici: le *cellule del Leydig* (**Figura 1.9**).

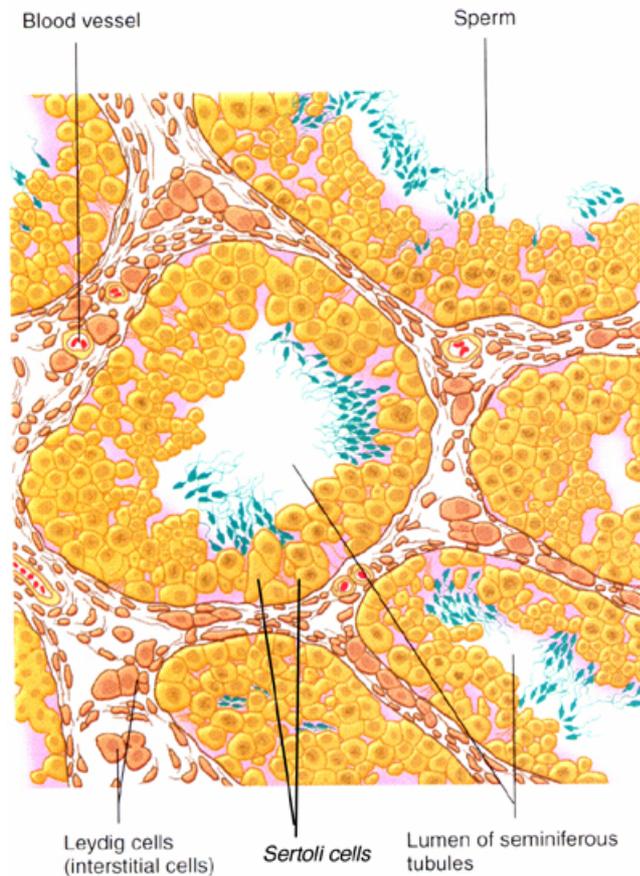


Figura 1.9 Struttura del tubulo seminifero.

Le cellule del Leydig o cellule interstiziali del testicolo presiedono alla produzione e alla secrezione degli androgeni, in particolare del *testosterone*, la cui azione è determinante sia per la differenziazione, per lo sviluppo e per la funzione degli organi sessuali maschili, sia per il manifestarsi dei caratteri sessuali secondari. Queste cellule sono altamente specializzate e hanno il tipico aspetto di un tessuto molto attivo nella secrezione degli steroidi.

Al microscopio ottico, queste cellule appaiono poligonali e hanno un diametro compreso tra 10 e 25 μm ; esse costituiscono il 20% circa del peso

del testicolo e sono localizzate in prossimità dei capillari. Tali cellule contengono numerose goccioline lipidiche, hanno nucleoli ben evidenti ed il loro citoplasma mostra una notevole quantità di reticolo endoplasmatico liscio nonché di mitocondri (**Figura 1.10**).

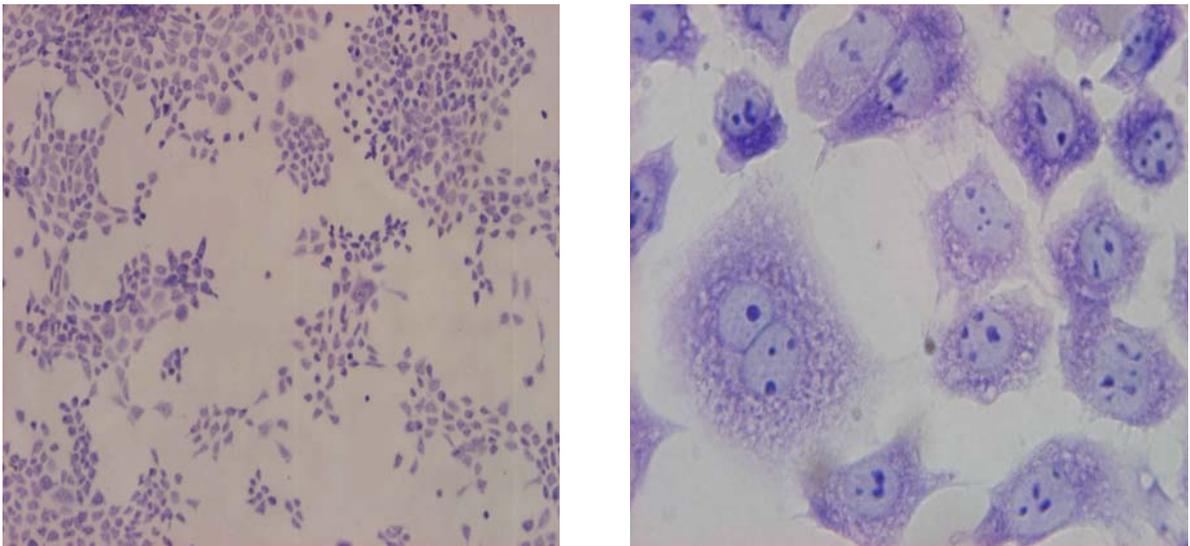


Figura 1.10 Cellule del Leydig (TM-3) al microscopio ottico Olympus bx51 ai rispettivi ingrandimenti 10x e 100x (metodo di colorazione di May-Grünwald-Giemsa).

La sintesi degli ormoni steroidei nei testicoli è realizzata dalle cellule del Leydig a partire dal colesterolo, che nelle gonadi è sintetizzato a partire dal precursore acetil CoA, prodotto dalla β -ossidazione degli acidi grassi. La prima tappa del processo biosintetico è il taglio della catena laterale del colesterolo, effettuato da un complesso multienzimatico detto *desmolasi*, che porta alla formazione di pregnenolone. Tale sistema enzimatico è localizzato nella membrana mitocondriale interna delle cellule del Leydig e richiede NADPH come coenzima. Il pregnenolone a sua volta viene

trasformato in *testosterone* attraverso una serie di reazioni enzimatiche, che possono avvenire secondo le vie $\Delta 4$ o $\Delta 5$. Nell'uomo la via principale sembra essere la $\Delta 5$ attraverso la formazione di 17-idrossi pregnenolone ed androstendiolo (**Figura 1.11**).

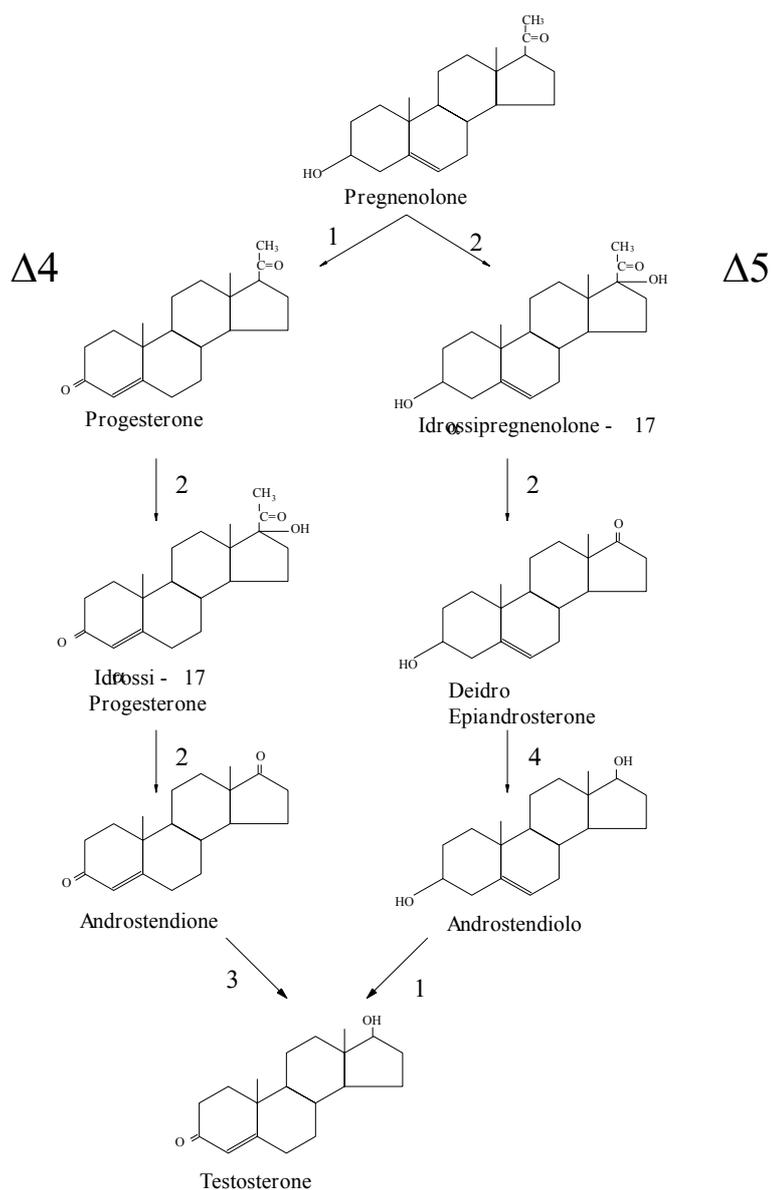


Figura 1.11 Biosintesi del testosterone (via $\Delta 4$ e $\Delta 5$). Enzimi che catalizzano le reazioni: **1.** 3β -idrossisteroide-deidrogenasi/isomerasi; **2.** 17-desmolasi; **3.** 17β -idrossisteroide-reduttasi; **4.** 17-chetosteroide-reduttasi.

1.4.1 Regolazione della biosintesi di testosterone

L'attività delle cellule del Leydig è regolata dall'*ormone luteinizzante* (LH), secreto dal lobo anteriore dell'ipofisi, che ne stimola la produzione di testosterone.

La *gonadotropina corionica umana* (hCG), si forma preferenzialmente nelle prime settimane di gravidanza, secreta dalla placenta, e presenta un'attività biologica simile a quella dell'LH. La funzione fisiologica dell'hCG durante i primi mesi di gravidanza è la stimolazione della steroidogenesi nel corpo luteo e la crescita delle cellule del Leydig e delle ovaie. La somministrazione di hCG nell'uomo determina un aumento del contenuto di testosterone nelle cellule interstiziali dei testicoli e la sua secrezione.

L'LH/hCG, attraverso l'interazione con una proteina G stimolatrice, attiva l'adenilato ciclasi, che converte l'ATP in AMP-ciclico (AMPc) e pirofosfato. L'aumento dei livelli di AMPc attiva la proteina chinasi A, che fosforila una o più proteine nelle cellule del Leydig o induce de novo la sintesi di proteine che svolgono un ruolo importante durante la steroidogenesi. Queste proteine facilitano il trasferimento del colesterolo attraverso la membrana mitocondriale interna verso la matrice; qui il colesterolo viene metabolizzato a pregnenolone ad opera del complesso multienzimatico *desmolasi*.

Precisamente la risposta alla stimolazione da parte dell'AMPc produce effetti sulla sintesi del testosterone sia di tipo acuto che cronico. Gli effetti acuti portano alla mobilizzazione e distribuzione alla membrana mitocondriale interna del colesterolo. Gli effetti cronici sono mediati da un aumento della trascrizione dei geni che codificano per gli enzimi implicati

nella steroidogenesi. I dati disponibili indicano che viene indotta una proteina regolatrice che facilita la traslocazione del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna, dove si trova localizzato il complesso multienzimatico; questa proteina di 30 kDa è nota come *proteina Regolatrice della Steroidogenesi Acuta* (StAR).

L'LH/hCG può agire anche attraverso l'attivazione della fosfolipasi C e quindi attraverso una via Ca^{2+} dipendente fosfoinositolo-proteinchinasi C.

Queste reazioni determinano, quindi, la produzione di una maggiore quantità di testosterone, che viene secreto dalle cellule del Leydig e inviato ai tessuti bersaglio attraverso la circolazione sanguigna (**Figura 1.12**).

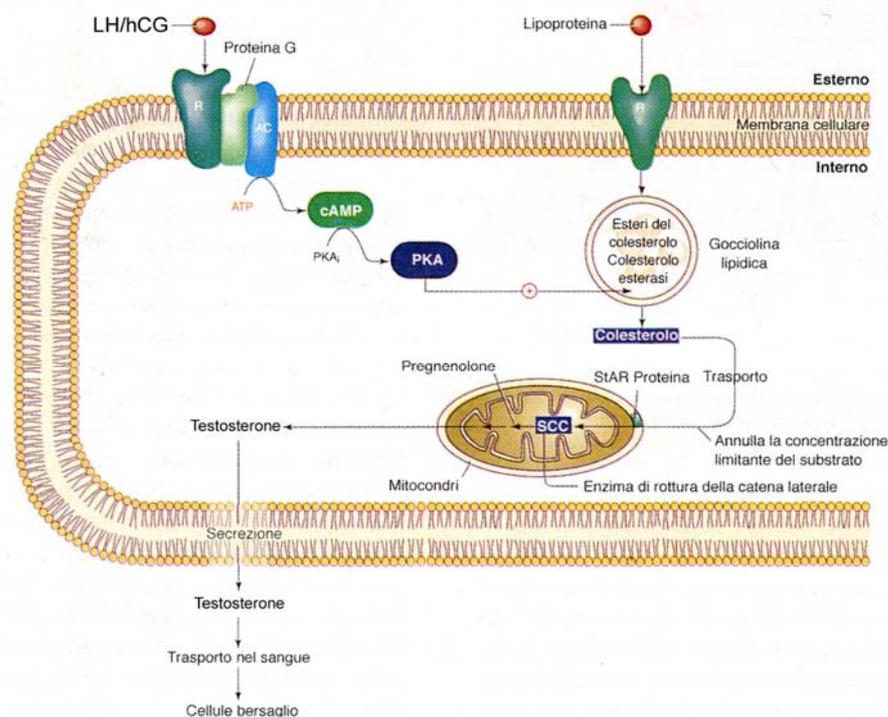


Figura 1.12 Stimolazione della biosintesi e della liberazione del testosterone da parte dell'LH/hCG nelle cellule del Leydig.

R: recettore; AC: adenilato ciclasi; AMPc: AMP-ciclico; PKA: proteina chinasi A; StAR: proteina regolatrice della steroidogenesi acuta.

1.5 SCOPO DEL LAVORO

La vitamina A e i suoi derivati sono necessari per lo sviluppo e le normali funzioni dei testicoli. In condizioni di carenza di vitamina A, infatti, tra le anomalie riproduttive si osservano difetti della spermatogenesi e degenerazione dei testicoli (*Hardman et al., 1996*). Inoltre, si osserva una riduzione dell'attività degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi, quali l'enzima deputato al taglio della catena laterale del colesterolo e la 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi (*Chaudhary et al., 1989*).

Molti studi hanno rivolto l'attenzione al ruolo dei retinoidi come potenti antiossidanti contro il cancro e le patologie cardiovascolari (*Slaga, 1995*). Altri studi hanno invece dimostrato come i retinoidi abbiano proprietà pro-ossidanti, che porterebbero la cellula al danno ossidativo e alla carcinogenesi (*Dal-Pizzol et al., 2000; Palozza et al., 2001*).

È quindi indispensabile conoscere in modo approfondito le loro funzioni per poterne fare un corretto impiego.

Alla luce di queste considerazioni, scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di studiare gli effetti dell'acido retinoico (RA), a concentrazioni sia fisiologiche che sovra-fisiologiche, in cellule del Leydig (TM-3), derivate da tessuto interstiziale di testicolo di ratto, ed eventualmente determinare i meccanismi molecolari alla base di tali effetti. Dopo aver verificato l'efficacia dell'RA, a concentrazioni sovra-fisiologiche, ad indurre il blocco proliferativo e la perossidazione lipidica, si è voluto: **(1)** verificare la suscettibilità di tali cellule all'apoptosi RA-indotta; **(2)** studiare l'eventuale ruolo dei mitocondri nel processo; **(3)** indagare il meccanismo attraverso cui l'RA induce il processo di morte

cellulare programmata a monte della caspasi-3. Poiché a dosi fisiologiche la vitalità cellulare non è ridotta e l'RA non induce perossidazione lipidica, si è voluto studiare una probabile modulazione dell'attività degli enzimi antiossidanti e una possibile perturbazione delle funzioni testicolari indotte dall'RA *in vitro* su tale linea cellulare.

Studi recenti hanno mostrato gli effetti diretti dei retinoidi sulla produzione di testosterone in cellule di Leydig di ratto adulto in coltura primaria. Si è visto che il retinolo e in maggior misura l'RA stimolano la produzione di testosterone, svolgendo un ruolo importante nel mantenimento e nella regolazione della funzione delle cellule del Leydig (Chaudhary *et al.*, 1989). Benché studi *in vivo* hanno dimostrato l'importanza della vitamina A nella steroidogenesi, non è ancora chiaro come i retinoidi agiscano sulle cellule del Leydig.

Recentemente sono stati identificati tre tipi di recettori nucleari per l'RA (α , β e γ), che appartengono alla superfamiglia multigenica dei recettori nucleari per gli ormoni tiroidei/steroidi e presentano un sito di legame ad alta affinità per l'RA (Mangelsdorf *et al.*, 1994; *see Mangelsdorf & Evans, 1995; see Chambon, 1996*). Oltre al legame ai recettori nucleari, l'RA è incorporato nelle proteine delle cellule in coltura (Takahashi & Breitman, 1989, 1990a, 1990b, 1994; *see Breitman & Takahashi, 1996; Tournier et al., 1996*) e dei tessuti di ratto sia *in vivo* (Myhre *et al.*, 1996) che *in vitro* (Olson *et al.*, 1985; Renstrom & DeLuca, 1996; Myhre *et al.*, 1998). Fra le proteine che subiscono il processo di retinoidizzazione si possono includere le citocheratine dei cheratinociti epidermici umani (Takahashi *et al.*, 1991a), le proteine che legano l'AMP-ciclico nelle cellule HL-60 (Takahashi *et al.*, 1991b; Tournier *et al.*,

1996), la vimentina sempre nelle cellule HL-60 (Takahashi & Breitman, 1994) e la tioredoxina riduttasi nelle cellule del melanoma umano (Schallreuter & Wood, 1989). Recentemente Kubo *et al.* (2005) hanno dimostrato che l'RA, lega molto fortemente, in tessuti di ratto quali fegato, rene, cervello e testicolo, una proteina, probabilmente citosolica, dal peso molecolare di circa 17 kDa. Inoltre è stato dimostrato che anche proteine mitocondriali di testicolo di ratto sono molto attive nel legare l'RA (Genchi & Olson, 2001).

Sotto molti aspetti il processo di retinoilazione è direttamente analogo al processo di miristoilazione (acido miristico) o di palmitoilazione (acido palmitico) delle proteine (Dunphy & Linder, 1998). Poiché questi processi fanno sì che le proteine modificate covalentemente svolgano importanti funzioni fisiologiche nella cellula, si pensa che anche le proteine retinoilate possano svolgere funzioni fisiologiche nella cellula ed essere coinvolte nelle azioni dell'RA sulle cellule del Leydig.

Alla luce di queste considerazioni, si è voluto studiare innanzitutto la reazione di retinoilazione su proteine di cellule del Leydig e successivamente dimostrare una correlazione tra la suddetta reazione e la biosintesi di testosterone che avviene all'interno delle cellule.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Il terreno di coltura DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F-12), il siero bovino fetale (FBS), il siero di cavallo (HS), la penicillina/streptomina e la glutammina sono stati acquistati da GIBCO (Berlino, Germania).

Il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la tripsina, la digitonina, il sodiododecilsolfato (SDS), il 1-metossifenazina metosulfato (MPMS), l'albumina di siero di bue (BSA), l'RNAasi, la proteinasi K, l'idrossilammina (NH₂OH), l'etidio bromuro, il NAD⁺, l'acido tiobarbiturico (TBA), l'acido tricloroacetico (TCA), il butilato idrossi toluene (BHT), la fumonisina-B1, la cicloesimide, il dibutiril AMP ciclico (db-cAMP), la forskolina e il manganese cloruro (MnCl₂), sono stati acquistati dalla ditta SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA).

I saggi per determinare l'attività degli enzimi antiossidanti e il dosaggio radioimmunologico del testosterone sono stati effettuati con i Kit acquistati rispettivamente dalla SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA) e BIOGEMINA sas (Catania, Italia).

Gli inibitori delle proteasi, aprotinina, Na⁺-ortovanadato, leupeptina e fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), sono della ditta SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA).

L'anticorpo monoclonale anti-citocromo c di ratto, l'anticorpo monoclonale di pecora per la caspasi-3 e la β-actina, e gli anti IgG di ratto e

anti IgG di pecora entrambi coniugati alla perossidasi di rafano (HRP) sono stati forniti da SANTA CRUZ (CA, USA).

L'acido 11,12-³H-tutto-*trans*-retinoico (³H-RA), 50 mmoli è stato acquistato da PERKIN-ELMER (Boston, USA)

L'acido tutto-*trans*-retinoico (RA) è stato acquistato da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Viene preparato al momento dell'uso in etanolo e diluito nel mezzo di coltura alla concentrazione desiderata. La concentrazione finale di etanolo era uguale o meno dello 0.01% negli esperimenti e non era tossica per le cellule.

Tutti gli esperimenti con l'RA erano condotti alla luce gialla mentre i tubi e le piastre di coltura contenente RA erano coperti con fogli di alluminio.

Le cellule del Leydig (TM-3) sono state gentilmente fornite dal Dr. S. Andò, Università della Calabria.

2.2 LINEA CELLULARE

Le cellule del Leydig (TM-3), utilizzate nel presente lavoro di tesi, derivano da linee cellulari continue di tessuto interstiziale di testicolo di ratto. Le cellule presiedono alla produzione e alla secrezione degli androgeni, in particolare del testosterone, la cui azione è determinante sia per la differenziazione, per lo sviluppo e per la funzione degli organi sessuali maschili, sia per il manifestarsi dei caratteri sessuali secondari.

2.2.1 Condizioni di coltura di routine

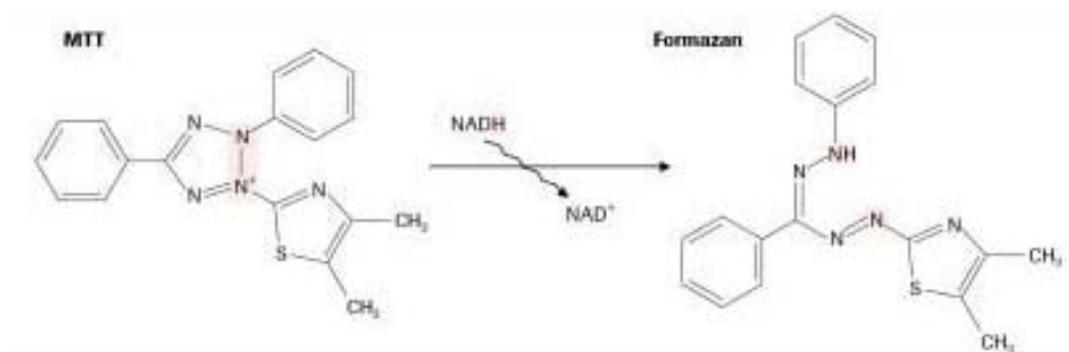
Le cellule vengono piastrate in capsule Petri da 9 cm di diametro in presenza del mezzo di coltura DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F-12), addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 2,5%, siero di cavallo (HS) al 5%, penicillina/streptomina all'1%, glutammina all'1%, e sono fatte crescere a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Le cellule crescono aderendo alla superficie delle piastre di coltura fino ad occuparne l'intera superficie. A confluenza la crescita si arresta e le cellule vengono trasferite in nuove piastre. Per il trasferimento è necessario prima staccare le cellule dal fondo della piastra con una soluzione di EDTA e tripsina, previo lavaggio con PBS (KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, NaCl 136.9 mM, pH 7.2) per rimuovere completamente il siero e i cationi bivalenti presenti nel terreno di coltura. L'EDTA chela il Ca⁺⁺ e il Mg⁺⁺ indispensabili all'adesione, mentre la tripsina degrada le proteine extracellulari che permettono alle cellule di aderire alla Petri. Una volta ottenuto il distacco delle cellule, l'azione della tripsina e dell'EDTA viene neutralizzata con l'aggiunta di terreno che contiene sia un eccesso di Ca⁺⁺ sia inibitori specifici della tripsina (contenuti nel siero). Le cellule vengono quindi seminate in nuove piastre e fatte crescere a confluenza.

La conta delle cellule, per determinare il numero di cellule da utilizzare negli esperimenti, viene effettuata con la camera di Burker. Prima di essere sottoposte a trattamento, le cellule vengono piastrate ad una percentuale di confluenza di circa il 60% e, dopo l'avvenuta adesione, mantenute per 24 ore in DMEM/F-12 privo di siero. Il giorno dopo, le cellule vengono trattate con le sostanze richieste dall'esperimento.

2.3 SAGGIO DELLA VITALITÀ CELLULARE (MTT)

La vitalità cellulare è valutata mediante il saggio dell'MTT (*Mosmann, 1983*). Si tratta di un saggio colorimetrico che valuta la vitalità cellulare mediante analisi spettrofotometrica. Il substrato MTT [bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolo] di colore giallo viene ridotto, solo dalle cellule metabolicamente attive per azione di deidrogenasi mitocondriali a formare cristalli di formazano blu che sono impermeabili alle membrane cellulari e si accumulano quindi dentro le cellule sane. La solubilizzazione delle cellule per aggiunta di un detergente permette il rilascio dei cristalli che vanno in soluzione. La quantità di colore prodotto è direttamente proporzionale al numero di cellule sopravvissute.



La sperimentazione viene condotta su una sospensione di 2×10^5 cellule/ml di mezzo di coltura completo, in piastre contenenti 12 pozzetti. Dopo 24 ore d'incubazione il mezzo di coltura viene eliminato e le piastre vengono incubate per altre 24 ore con mezzo fresco privo di siero; quindi si aggiungono i trattamenti a seconda dell'esperimento. Al termine del periodo di incubazione, le cellule vengono lavate con PBS e si aggiungono 100 μ l di MTT 12 mM ad ogni pozzetto in presenza di 1 ml di mezzo

bianco (privo di colorante rosso-fenolo, che interferirebbe con la lettura allo spettrofotometro). Le piastre vengono poste nuovamente a 37°C per 4 ore, periodo sufficiente alla formazione di un precipitato blu intracellulare. Successivamente si aspira delicatamente il terreno di coltura da ogni pozzetto e i cristalli di formazano formati vengono solubilizzati per aggiunta di 1 ml di HCl 0.04 N in isopropanolo assoluto. L'assorbanza è poi misurata con uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm, usando come riferimento l'assorbanza a 690 nm. La percentuale di vitalità cellulare viene calcolata come:

$$\frac{\text{OD trattato}}{\text{OD controllo}} \times 100$$

Dove OD è il valore della densità ottica, ottenuta sottraendo il valore della densità ottica alla lunghezza d'onda di 690 nm da quello ottenuto alla lunghezza d'onda di 570 nm.

2.4 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CITOSOLICI

Per rilevare il rilascio di citocromo c o la presenza di caspasi-3 le cellule sono solubilizzate nei modi descritti di seguito.

2.4.1 Citocromo c

Dopo il trattamento sperimentale di 24 ore, viene eliminato il mezzo di coltura dalla piastra e le cellule vengono lavate due volte con PBS, tripsinizzate, raccolte in Eppendorf e centrifugate per 10 minuti a 4°C a 1.200 rpm. Si elimina il supernatante e si risospende il pellet in 36 µl di tampone di lisi senza digitonina; quindi, si aggiungono 4 µl di digitonina 0.1% e si incuba per 15 minuti a 4°C; allo scadere del tempo, i campioni vengono centrifugati a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il supernatante viene delicatamente aspirato e posto in una nuova Eppendorf e centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Tampone di lisi: saccarosio 250 mM, EGTA 1.5 mM, EDTA 1.5 mM, MgCl₂ 1 mM, TRIS/HCl 25 mM, pH 6.8, digitonina 0.01%, DTT 1 mM, ed inibitori delle proteasi (aprotinina 10 µg/ml, Na⁺-ortovanadato 50 mM e PMSF 50 mM) (*Giannecchini et al., 2003*).

2.4.2 Caspasi-3

Dopo due lavaggi e centrifugazione, come descritto sopra, le cellule sono sospese in 50 µl di tampone di lisi e incubate per 15 minuti a 4°C; allo scadere del tempo, i campioni vengono centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C.

Tampone di lisi: TRIS/HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, sodio deossicolato 0.5%, SDS 0.1%, ed inibitori delle proteasi (aprotinina 10 mg/ml, leupeptina 10 mg/ml, PMSF 1 mM) (*Kim et al., 2000*).

2.5 DOSAGGIO PROTEICO

Allo scopo di caricare la stessa quantità proteica (30-40 µg) in ogni pozzetto, su un'aliquota del supernatante delle frazioni citosoliche è stato effettuato il dosaggio proteico secondo il metodo di Lowry *et al* (1951). Questo metodo è sensibile a concentrazioni proteiche fra 5 e 100 µg/ml. La determinazione della concentrazione proteica con il metodo del Lowry prevede la preparazione, di fresco, di una soluzione costituita da (quantità per 10 ml di soluzione):

- 9.8 ml di Na₂CO₃ al 4% in NaOH 0.05 M
- 100 µl di CuSO₄ · 5H₂O al 2%
- 100 µl di Na⁺K⁺ tartrato · 4H₂O al 4%

A 2.490 ml della soluzione del Lowry si aggiungono 10 µl dei diversi preparati biologici, dei quali si vuole determinare la concentrazione proteica, si agita al vortex e si lascia a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente, a ciascun campione, si aggiungono 250 µl di reattivo di Folin-Ciocalteau, costituito da acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico (diluito 1:1 con acqua distillata); si agita al vortex e si lascia a temperatura ambiente per altri 15 minuti per permettere lo svolgimento della reazione con sviluppo del colore.

Il Cu²⁺, complessato dal tartrato, forma un complesso di colore blu legandosi all'azoto delle proteine. Maggiore è la concentrazione proteica, più complessi di questo tipo si formano e più intensamente colorata in blu è la soluzione. Il metodo si basa sulla reazione di ossidazione degli amminoacidi aromatici in quanto viene coinvolto il gruppo fenolico dei residui tirosinici delle proteine. La soluzione, interagendo col reattivo di

Folin-Ciocalteu, assume colorazione blu-porpora, proporzionale alla quantità di proteine, con un massimo di assorbimento a 660 nm. La lettura dei campioni avviene allo spettrofotometro ed è effettuata contro il bianco, preparato aggiungendo 10 µl della soluzione di lisi a 2.490 ml della soluzione del Lowry. Il valore dell'assorbimento ottenuto dalla lettura dei campioni è riportato su una retta di taratura ottenuta aggiungendo a 2.490 ml della soluzione del Lowry, 10 µl di uno standard proteico a concentrazioni note e crescenti. Si utilizza come standard la BSA per l'elevato grado di purezza e per la sua facile disponibilità.

2.6 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

2.6.1 Composizione dei gel elettroforetici

I gel di elettroforesi di 0.75 mm di spessore sono formati facendo polimerizzare la soluzione di acrilammide al 15% per rilevare il citocromo c e la caspasi-3 (pesi molecolari di 13 e 32 kDa rispettivamente).

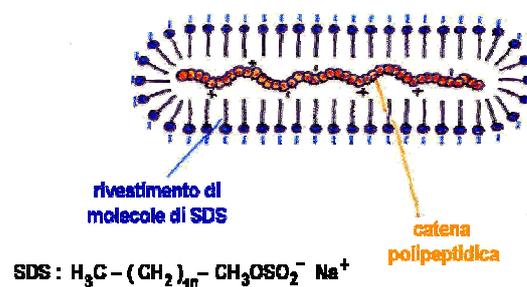
15% acrilammide: 4 ml di acrilammide (29.2%) e N,N'-metilenbis-acrilammide (0.8%), 2 ml di TRIS/HCl 1.5 M, pH 8.8, con SDS 0.4%; 2 ml di H₂O; 100 µl di ammonio persolfato (APS) 10%; 10 µl di TEMED.

Ad ogni gel, ben polimerizzato, viene aggiunto lo *Stacking Gel* in cui vengono modellati dei pozzetti del volume di 30 µl con l'ausilio di un pettinino. In ciascuno di tali pozzetti vengono caricati i campioni proteici da separare.

Stacking Gel: 600 µl di acrilammide (29.2%) e N,N'-metilenbis-acrilammide (0.8%); 950 µl di TRIS/HCl 0.5 M, pH 6.8, con SDS 0.4%; 2.25 ml di H₂O; 25 µl di APS 10%; 2.5 µl di TEMED.

2.6.2 Separazione elettroforetica e trasferimento

A polimerizzazione avvenuta vengono caricati nei pozzetti i campioni proteici solubilizzati in 30 µl di tampone di Laemmli (TRIS 0.6 M pH 6.8; SDS 0.26 M; glicerolo 3.26 M; DTT 0.1 M; blu di bromo-fenolo). Il glicerolo aumenta la densità dei campioni consentendone l'adagiamento nei pozzetti, il DTT riduce i ponti disolfuro delle proteine per permettere loro di svolgersi completamente, il blu di bromo-fenolo, che è un colorante tracciante ionizzabile, ci dà la possibilità di seguire la corsa elettroforetica. L'SDS è un detergente anionico che denatura le proteine e ne determina una forma filamentosa. La presenza di una molecola di SDS ogni due amminoacidi circa della catena conferisce alle proteine una carica negativa costante per unità di lunghezza, mascherando completamente la loro carica netta.



Quando si applica il campo elettrico, la migrazione delle proteine avviene in base al loro peso molecolare e non alla loro carica. Dopo aver

caricato i pozzetti, il gel viene posto nella cella elettroforetica ed immerso in un tampone (diluito 1:10), costituito da TRIS 25 mM, glicina 200 mM, pH 8.3, ed SDS 0.1%. Si applica una differenza di potenziale costante di 150V finchè il blu di bromo-fenolo non raggiunge il fondo del gel. Al termine della separazione (circa 2 ore per un gel di 10 cm circa) si rimuove il gel dalle lastre. Sia il gel che la membrana di nitrocellulosa vengono equilibrati nel *blotting buffer* (3 g di TRIS, 14.4 g di glicina e 20% metanolo per litro di soluzione) prima del trasferimento che viene condotto a 40V per 1 ora.

2.6.3 Western blotting citocromo c

In seguito al trasferimento, la membrana viene prima sottoposta a lavaggi (tre per dieci minuti ciascuno) con PBS/0.05% Tween 20. Successivamente vengono bloccati tutti i siti di legame che possono interferire con il successivo legame dell'anticorpo specifico per il citocromo c, con una soluzione contenente latte scremato al 5% (in PBS/0.05% Tween 20) ad una temperatura di 4°C per tutta la notte.

Dopo questo processo la membrana viene incubata con l'anticorpo primario diluito 1:1000 in PBS/0.05% Tween 20 per 2 ore a temperatura ambiente e poi con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano, diluito 1:2000 in una soluzione contenente il 5% di latte scremato in PBS/0.05% Tween 20.

2.6.4 Western blotting caspasi-3

Dopo aver bloccato i siti di legame interferenti con il legame dell'anticorpo per la caspasi-3 con la soluzione contenente latte scremato al

5% (in PBS/0.05% Tween 20) ad una temperatura di 4°C per tutta la notte, la membrana viene incubata (2 ore a temperatura ambiente) con l'anticorpo primario (diluito 1:2000) in grado di riconoscere la casapsi-3. Dopodiché la membrana viene di nuovo lavata tre volte ed incubata con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano diluito 1:3000, per 1 ora a temperatura ambiente.

2.6.5 Chemioluminescenza

Le bande proteiche vengono rivelate mediante chemioluminescenza. In particolare, la membrana viene trattata al buio con una soluzione di H₂O₂ (50%) e di luminolo (50%). La perossidasi legata all'anticorpo secondario reagisce con l'H₂O₂ ed il luminolo libera un fotone per ogni sito di razione. I fotoni liberati andranno ad impressionare una lastra sensibile ai fotoni posta a contatto con la membrana. Le lastre vengono sviluppate per 20 minuti e fissate. Il contenuto proteico del citocromo c è stato determinato densitometricamente.

Per normalizzare il risultato, i vari blot sono stati strippati a caldo per 30 minuti a 52°C con 100 ml di *stripping buffer* (TRIS/HCl 62.5 mM, pH 6.7 ed SDS 2%), addizionato con 700 µl di β-mercaptoetanololo, e incubati con l'anticorpo anti-β-actina (diluito 1:10000).

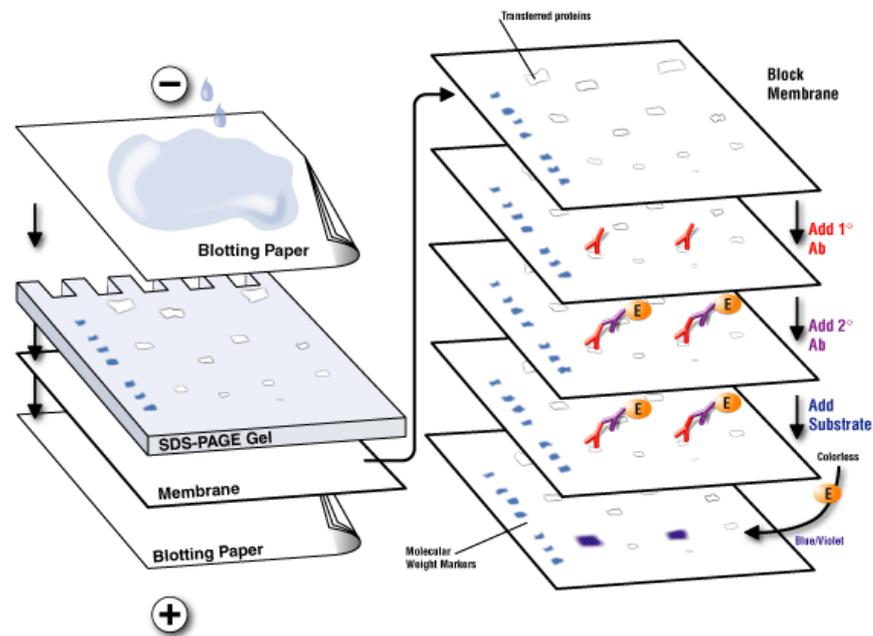


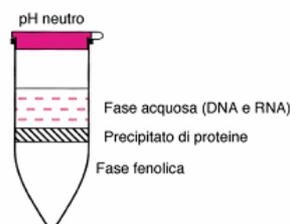
Figura 2.1 Schema rappresentativo della tecnica del Western Blotting.

2.7 ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA

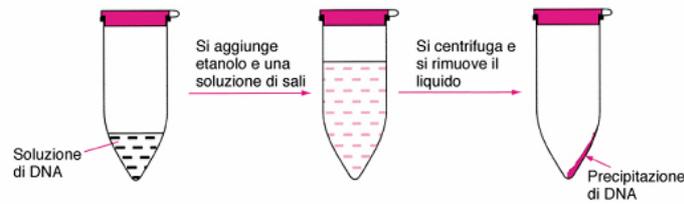
L'apoptosi può essere caratterizzata biochimicamente tramite l'attivazione di endonucleasi nucleari che tagliano il DNA in frammenti costituiti da circa 180-200 paia di basi (Lu *et al.*, 2003). Le cellule trattate con acido retinoico vengono seminate in piastre di coltura da 9 cm di diametro. Dopo 24 ore di incubazione si elimina il mezzo di ciascuna piastra, si effettua un lavaggio con 2 ml PBS, si tripsinizza e si recupera il tutto in Falcon di polietilene da 15 ml che verranno centrifugate a 1.800 rpm per 5 minuti a 4°C. Si elimina il supernatante, si risospende il pellet in 0.5 ml di tampone di lisi (TRIS/HCl 50 mM, pH 7.8, EDTA-2Na⁺ 10 mM,

SDS 0.5%), si trasferisce in Eppendorf e si incuba per 20 minuti a 4°C sotto leggera agitazione.

Per eliminare completamente l'RNA si aggiungono 25 µl di RNasi dallo stock 10 mg/ml e si incuba a 37°C per 60 minuti. Le proteine invece subiscono degradazione facendole reagire con proteinasi K (0.5 mg/ml) per 60 minuti a 50°C. Successivamente si centrifuga a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C e si recupera il supernatante contenente il DNA. L'estrazione del DNA avviene tramite aggiunta di un uguale volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1). Si agita la soluzione al vortex e si centrifuga a 14.000 rpm per 5 minuti. È possibile notare, dopo centrifugazione, la separazione della fase acquosa, contenente il DNA, dalla fase lipidica. Si aspira velocemente la fase acquosa e si ripete l'operazione di estrazione.



Si prosegue poi con altre 2 estrazioni, stavolta utilizzando cloroformio/alcool isoamilico (24:1). Anche in questo caso è possibile visualizzare la separazione delle due fasi e si aspira nuovamente la fase acquosa. Il DNA verrà quindi precipitato aggiungendo alla soluzione etanolo ghiacciato (2.5 volume) e acetato di Na⁺ 3 M (0.1 volumi). I campioni vengono posti a -20°C per tutta la notte.



Il giorno successivo si centrifuga a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C. Eliminato il supernatante, il sedimento ottenuto è solubilizzato in 25 µl di acqua sterile.

I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.2% che consente di separare i frammenti di DNA in base al numero di paia di basi. Il gel d'agarosio è preparato in 1X TAE buffer (TRIS/HCl 40 mM ed EDTA 1 mM, pH 8) in presenza di etidio bromuro alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml, per evidenziare le molecole di DNA. L'etidio bromuro, infatti, si inserisce tra le coppie di basi del DNA rendendolo visibile sotto l'azione della luce ultravioletta. La banda di DNA su gel d'agarosio all'1.2% è visibile utilizzando un transillumunatore UV.

2.8 RILASCIO DELLA LATTATO DEIDROGENASI

Un metodo per determinare la perdita di integrità delle membrane cellulari consiste nel misurare il rilascio nel mezzo di coltura dell'enzima citosolico lattato deidrogenasi (LDH) (*Abe & Matsuki, 2000*). Per verificare la quantità di enzima LDH rilasciato vengono piastrate 2×10^5 cellule/ml di mezzo di coltura completo in piastre da 12 pozzetti e si incuba a 37°C per 24 ore. Dopo il periodo d'incubazione, si aspira il mezzo, si effettuano i

lavaggi in PBS, si aggiunge mezzo fresco privato del siero e si lascia incubare per altre 24 ore.

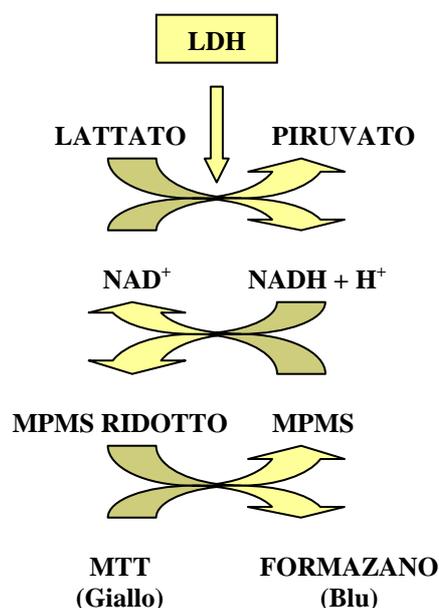
Successivamente si elimina il mezzo, si lava in PBS e si aggiungono i trattamenti in un volume finale di 0.5 ml di mezzo bianco. Le piastre vengono poste nell'incubatore per altre 24 ore.

La miscela di substrati viene preparata estemporaneamente ed è costituita da:

- lattato di litio 2.5 mg/ml
- NAD^+ 2.5 mg/ml
- 1-metossifenazina metosulfato (MPMS) 100 μM
- MTT 600 μM
- Triton X-100 0.1%

in 900 μl di TRIS/HCl 0.2 M a pH 8.2.

Si prelevano 250 μl di mezzo di coltura e si trasferiscono in una provetta Eppendorf, in cui si aggiungono 250 μl della miscela di substrati e si incuba a 37°C. In queste condizioni l'MTT viene ridotto in cristalli di formazano blu in maniera proporzionale all'attività della LDH; infatti l'ossidazione del lattato a piruvato ad opera dell'enzima è accompagnata dalla contemporanea riduzione del NAD^+ a NADH, il quale a sua volta è responsabile della riduzione dell'MTT in sali di formazano.



Dopo 5 minuti si aggiungono 0.5 ml di detergente costituito da HCl 0.04 N in isopropanolo assoluto. Infine si legge allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm con una lunghezza d'onda di riferimento a 655 nm.

2.9 MISURA DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

La perossidazione lipidica viene valutata mediante il saggio dell'acido tiobarbiturico (*Lefevre et al., 1998; Yagi, 1998*). Si tratta di un saggio colorimetrico che valuta la perossidazione mediante misura spettrofotometrica. Il substrato TBA (acido tiobarbiturico), addizionato ai campioni cellulari, produce una miscela di perossido d'idrogeno e aldeidi come risultato di una reazione di ossidoriduzione. Le specie reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) prodotte vengono determinate quantitativamente dall'assorbanza misurata ad uno spettrofotometro alla

lunghezza d'onda di 532 nm e vengono espresse come equivalenti di malondialdeide (MDA), uno dei prodotti della perossidazione lipidica (Kwon & Watts, 1964).

Il saggio viene condotto su una sospensione di 3×10^6 cellule/5 ml di mezzo di coltura completo. Dopo 24 ore d'incubazione il mezzo di coltura viene aspirato e le piastre vengono incubate per altre 24 ore con mezzo fresco privato del siero; quindi si aggiungono i trattamenti a seconda dell'esperimento. Al termine del periodo di incubazione le cellule vengono lavate con PBS, tripsinizzate, raccolte in Falcon da 15 ml e centrifugate a 1.200 rpm a 4°C per 10 minuti. Quindi le cellule vengono risospese in 500 μ l di PBS e sonicate per 3 volte ad intervalli di 5 secondi a 40V. Al termine di questa operazione, i campioni vengono centrifugati a 1.200 rpm per 10 minuti a 4°C. Il supernatante (circa 500 μ l) viene delicatamente aspirato e posto in nuove Eppendorf, da cui viene prelevata una aliquota per il dosaggio proteico. A questi 500 μ l di soluzione proteica si aggiungono 2.5 ml di TCA al 10% per favorire la precipitazione per denaturazione delle proteine. I campioni vengono agitati al vortex e incubati in un bagno bollente per 15 minuti. Dopo averli fatti raffreddare sotto acqua corrente, vengono centrifugati a 1.200 rpm per 10 minuti. Quindi vengono delicatamente prelevati 2 ml di supernatante, ai quali viene aggiunto 1 ml di TBA 0.67%. I campioni vengono ancora incubati in bagno bollente per ulteriori 10 minuti e lasciati successivamente raffreddare a temperatura ambiente per eseguire la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 532 nm (Draper & Hadley, 1990). I valori ottenuti vengono espressi come nmoli di MDA prodotta/mg di proteina.

2.10 SAGGIO DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

Per la misura dell'attività degli enzimi antiossidanti, le cellule sono state piastrate in capsule Petri da 9 cm di diametro e lasciate aderire per 24 ore. Raggiunto il 60% di confluenza il mezzo di coltura viene sostituito con mezzo fresco privo di siero preventivamente supplementato con i trattamenti. Dopo 24 ore di incubazione le cellule vengono lavate e tripsinizzate. Dopo la sonicazione delle cellule in PBS, l'omogenato viene centrifugato a 1.200 rpm per 10 minuti a 4°C e il supernatante è utilizzato per il dosaggio della glutatione S-transferasi, della superossido dismutasi e della catalasi.

2.10.1 *Glutazione S-transferasi*

L'attività dell'enzima glutatione S-transferasi (GS-T) viene determinata secondo il metodo di Habig *et al.* (1973). Brevemente, alla miscela del saggio, costituita da 980 µl di PBS, 10 µl di glutatione ridotto (GSH) 200 mM e 10 µl di substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 100 mM, vengono aggiunti 2-50 µl di supernatante e il tutto trasferito in una cuvetta di quarzo.

L'enzima GS-T catalizza la coniugazione del glutatione ridotto al substrato CDNB attraverso il gruppo tiolico del glutatione. Il prodotto della reazione (GS-DNB coniugato) assorbe spettrofotometricamente a 340 nm e il rapporto di aumento nell'assorbimento è direttamente proporzionale all'attività della GS-T nel campione. La lettura è effettuata ogni 30 secondi per un periodo di 5 minuti dopo un lag time di 1 minuto e i valori di assorbanza ottenuti vengono elaborati nel modo seguente:

$$\Delta(A_{340})/\text{min} = \frac{(A_{340})_{\text{finale}} - (A_{340})_{\text{iniziale}}}{\text{Tempo di reazione (min)}}$$

E l'attività specifica della GS-T viene espressa come:

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg proteina} = \frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V \text{ (ml)}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)}}$$

Dove ϵ_{mM} è il coefficiente di estinzione molare del complesso GS-CDNB a 340 nm (9.6 mM^{-1}).

2.10.2 Superossido dismutasi

La superossido dismutasi (SOD), che catalizza la dismutazione dell'anione superossido (O_2^-) in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare, è uno dei più importanti enzimi antiossidanti.

Il saggio prevede l'utilizzo di un sale di formazano altamente solubile in acqua, [2-(4-iodiofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolo, sale monosodico] (WST) che produce un sale di formazano solubile in acqua dopo reazione con l'anione superossido. Il rapporto della riduzione con l'ossigeno è relativo all'attività della xantina ossidasi (XO), ed è inibita dalla SOD. La miscela di reazione contenente 20 μl di campione, WST e XO viene incubata a 37°C per 20 minuti e successivamente viene letta l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 450 nm usando un microplate reader (*Das et al., 2000*). L'attività della SOD viene calcolata come % di inibizione dell'attività della XO.

2.10.3 Catalasi

La misura dell'attività della catalasi (CAT) è saggiata secondo il metodo di Aebi (1974). Il metodo si basa sulla misura del perossido di idrogeno (H_2O_2) che rimane dopo l'azione della CAT. Prima, la CAT converte il H_2O_2 in acqua e ossigeno e poi questa reazione enzimatica è bloccata con sodio azide. Un aliquota della miscela di reazione è poi saggiata per la quantità di H_2O_2 che rimane mediante un metodo colorimetrico. Questo usa un fenolo sostituito (acido 3,5-dicloro-2-idrossibenzene-sulfonico), che si accoppia ossidativamente alla 4-aminoantipirina in presenza di H_2O_2 e perossidasi di cavallo (HRP) per dare un sale rosso (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzochinone-monoimina) che assorbe a 520 nm. L'attività della CAT viene espressa come unità per mg di proteina (1 unità è la quantità di enzima che utilizza 1 μ mol di H_2O_2 consumato al minuto).

2.11 DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DEL TESTOSTERONE

L'ormone è stato dosato nel mezzo di coltura privo di siero, dopo i vari trattamenti fatti alle cellule TM-3. La procedura segue il principio fondamentale del dosaggio radioimmunologico (R.I.A.), che comporta la competizione tra l'antigene radioattivo e lo stesso non radioattivo per un numero fisso di siti leganti l'anticorpo. La quantità di testosterone analogo marcato con ^{125}I legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di testosterone presente. La separazione dell'antigene libero da quello legato si ottiene rapidamente e facilmente decantando o aspirando

la soluzione di reazione dalle provette rivestite dall' anticorpo. La curva di testosterone standard è costruita per ogni saggio, utilizzando quantitativi di testosterone note e crescenti. Gli standard vengono tenuti per 15 minuti a temperatura ambiente, agitandoli di volta in volta dolcemente; i campioni, invece, vengono liofilizzati e ripresi in 0.5 ml di H₂O distillata. Un volume di 25 µl, sia di campioni sia di standard, vengono trasferiti nelle provette rivestite dall'anticorpo. Quando tutti i campioni sono stati pipettati si aggiunge 1 ml di ¹²⁵I-testosterone e si agita brevemente al vortex. Si incubano tutte le provette a 37°C per 2 ore, si aspira il contenuto delle provette nello stesso ordine in cui sono state pipettate e si asciuga con carta assorbente. La radioattività è contata in un γ-counter calibrato per ¹²⁵I. I valori di testosterone sono presentati come ng/10⁶ cellule.

2.12 REAZIONE DI RETINOILAZIONE

La sperimentazione viene condotta su una sospensione di 8x10⁴ cellule/0.5 ml di mezzo di coltura completo in piastre da 24 pozzetti a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Dopo circa 24 ore di incubazione, le cellule vengono lavate con PBS per 2-3 volte, il mezzo viene sostituito con mezzo di coltura fresco privo di siero, e addizionato dei trattamenti a seconda dell'esperimento. Dopo ulteriori 24 ore di incubazione, il mezzo viene sostituito con mezzo privo di siero e addizionato con acido tutto-*trans*-retinoico triziato (³H-RA) ad una concentrazione finale di 100 nM.

2.12.1 Incorporazione e misura della radioattività legata alle proteine

La reazione di retinoilazione, quindi, viene fatta partire aggiungendo alle cellule ^3H -RA (100 nM finale) ed incubando per 24 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 . Dopo il periodo di incubazione, le piastre vengono prelevate dall'incubatore e dai pozzetti viene aspirato il mezzo di coltura privo di siero. Le piastre vengono messe in ghiaccio e le cellule lavate per tre volte con PBS freddo. Successivamente, eliminata la soluzione salina, si aggiungono ad ogni pozzetto 100 μl di tampone di lisi, costituito da HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl_2 1.5 mM, EGTA 1 mM, glicerolo 10%, Triton X-100 1% e inibitori delle proteasi (aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMSF 50 mM e Na^+ -ortovanadato 0.2 mM). Il tampone di lisi, distribuito uniformemente nei pozzetti e lasciato agire per un tempo non superiore ai 15 minuti, disgrega le membrane cellulari, consentendo il recupero dell'intero contenuto proteico cellulare. Il lisato cellulare viene pipettato in una provettina Eppendorf, che viene quindi centrifugata a 14.000 rpm per 15 minuti alla temperatura di 4°C . Questa operazione consente la separazione delle membrane dal citosol, contenente le proteine cellulari totali. Le proteine cellulari contenute nel supernatante in un volume di poco più di 100 μl vengono recuperate, trasferite in una seconda provettina Eppendorf e precipitate con acetone freddo (1:10 v/v). Dopo 10 minuti in acqua e ghiaccio, si centrifuga a 14.000 rpm per 15 minuti. Il pellet così ottenuto, costituito dalle proteine cellulari, viene trattato per due volte con 500 μl di cloroformio/metanolo (2:1) contenente BHT allo 0.005% per allontanare l'acido retinoico radioattivo legato specificamente. Con questi lavaggi il secondo estratto contiene meno dello 0.5% della radioattività aggiunta. Il pellet proteico viene essiccato per 30

minuti a 50°C, e viene quindi solubilizzato con 200 µl di una soluzione costituita da SDS 1%, TRIS 40 mM, EDTA 2 mM ed NaOH 50 mM, a 50°C per 20 minuti. Si pipettano i 200 µl delle proteine solubilizzate in 4 ml di miscela scintillante, si agita al vortex e la radioattività viene misurata in uno scintillatore liquido β-counter come colpi per minuto (cpm). I risultati vengono espressi in femtomoli (fmol) e per calcolarli viene utilizzata la seguente formula:

$$\text{fmol} = \frac{\text{cpm}_{\text{ottenuti}} \times 50}{\text{Attività specifica}}$$

dove 50 corrisponde al numero di nanomoli di ³H-RA che vengono utilizzati, mentre l'attività specifica rappresenta i colpi per minuto di ³H-RA aggiunto per prova. Le femtomoli così calcolate vengono poi riferite ad un numero di cellule pari a 8x10⁴.

2.12.2 Analisi dell'acido retinoico legato covalentemente alle proteine

Una aliquota (100 µl) delle proteine cellulari marcate e solubilizzate nella soluzione di SDS viene trattata con 0.4 mg di proteinasi K per 60 minuti a 37°C. Quindi viene aggiunta BSA (50-100 µg/ml) e le proteine vengono precipitate con TCA. Dopo aver centrifugato a 13.000 rpm per 10 minuti per allontanare le proteine denaturate, viene determinata allo scintillatore la radioattività del supernatante e del sedimento (risolubilizzato con SDS).

Alternativamente, le proteine cellulari radioattive, solubilizzate in SDS-TRIS-EDTA-NaOH, vengono trattate con idrossilammina (NH₂OH) 1 mM e 1 M, pH 10, a 50°C per 4 ore e a temperatura ambiente per 24 ore.

Quindi dopo aggiunta di BSA e TCA, come visto sopra, viene determinata la radioattività sia del supernatante che del sedimento, risolubilizzato con SDS (*Genchi & Olson, 2001*).

2.13 ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di almeno tre esperimenti indipendenti. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate usando l'analisi della varianza di ANOVA seguita dal metodo di Dunnett. Le differenze sono considerate significative per $p < 0.05$ (*) e altamente significative per $p < 0.01$ (**).

3. RISULTATI

3.1 EFFETTO DELL'ACIDO RETINOICO SULLA VITALITÀ CELLULARE

Per studiare l'effetto dell'acido tutto-*trans*-retinoico (RA) sulla vitalità delle cellule del Leydig (TM-3) in coltura è stato utilizzato il saggio dell'MTT. Questo metodo rivela la vitalità cellulare grazie alla capacità di riduzione del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) da parte delle cellule metabolicamente attive. L'MTT ridotto a sale di formazano precipita a livello intracellulare in forma di granuli blu che diventano più scuri e grandi col passare del tempo, dopodichè tali granuli migrano verso la membrana plasmatica sulla cui superficie per esocitosi si depositano sotto forma di cristalli "ad ago" colorati (*Mosmann, 1983*). L'indice dell'avvenuta riduzione dell'MTT è proprio il colore rilevato spettroscopicamente. Infatti la differenza di tonalità tra le colture sottoposte a trattamento con RA con i rispettivi controlli, cioè cellule cresciute in assenza di esso, è ben visibile ad occhio nudo e quantificata, dopo solubilizzazione dei cristalli per aggiunta di un detergente, con la misurazione dell'assorbanza a 570 nm.

Le cellule sono state incubate con RA prima a concentrazioni fisiologiche (0.1, 1, 10, 100 e 200 nM) e successivamente a concentrazioni sovra-fisiologiche (0.5, 1, 5, 10 e 20 µM) per 24 ore. Come si osserva dalla **Figura 3.1a**, l'RA a concentrazioni fisiologiche non ha effetto sulla vitalità cellulare, mentre la vitalità cellulare è ridotta in maniera significativa in

seguito al trattamento con RA a concentrazioni sovra-fisiologiche. Precisamente la vitalità cellulare è meno del 20% dopo esposizione con RA 20 μM per 24 ore (**Figura 3.1b**).

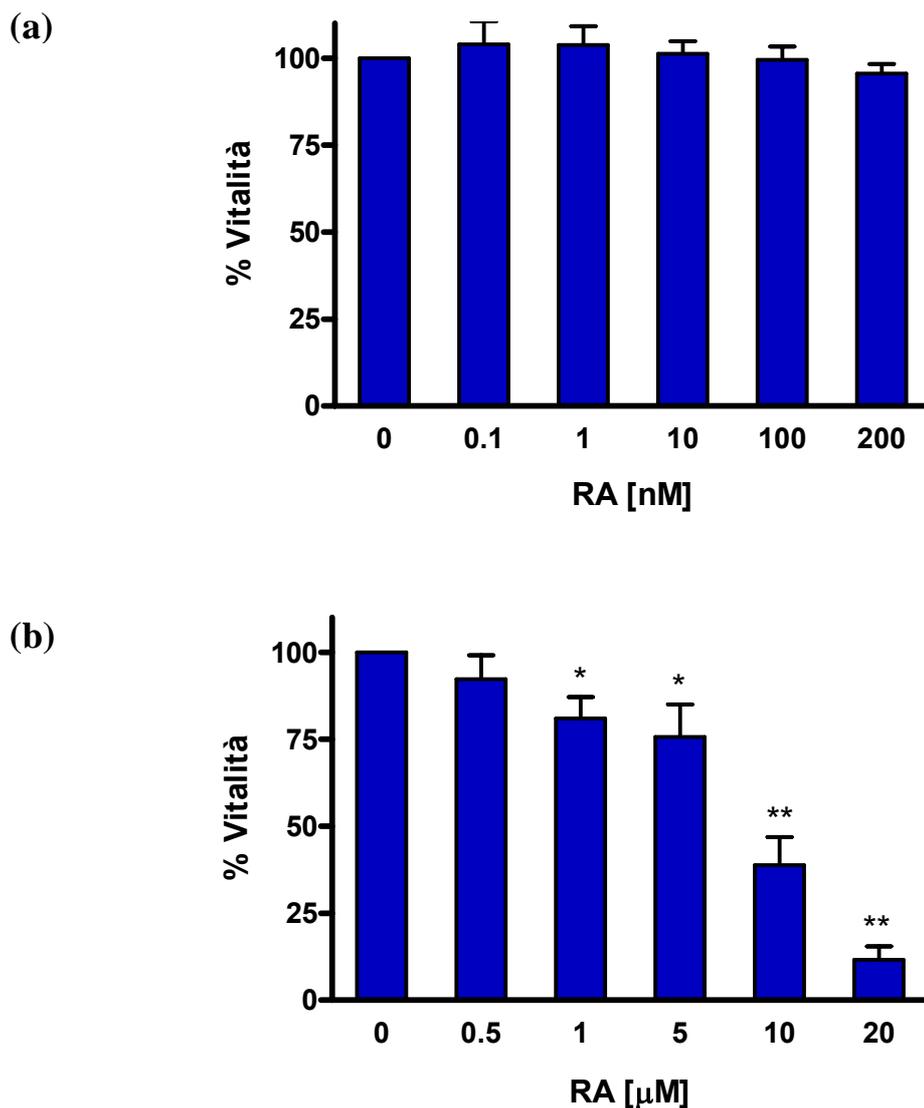


Figura 3.1 Effetto di RA a concentrazioni nM (a) e μM (b) sulla vitalità delle cellule TM-3. La vitalità è stata determinata usando il saggio dell'MTT dopo 24 ore di incubazione con RA alle concentrazioni indicate. I dati (media \pm SD di tre esperimenti indipendenti) sono espressi come % di riduzione dell'MTT delle cellule cresciute in assenza di RA. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

Inoltre i risultati in **Figura 3.2** mostrano che gli effetti di RA (range di concentrazione compreso fra 0.5 e 20 μM) sulla vitalità cellulare sono oltre che dose- anche tempo-dipendenti, poiché la sopravvivenza cellulare si riduce aumentando il tempo di incubazione da 3 a 24 ore.

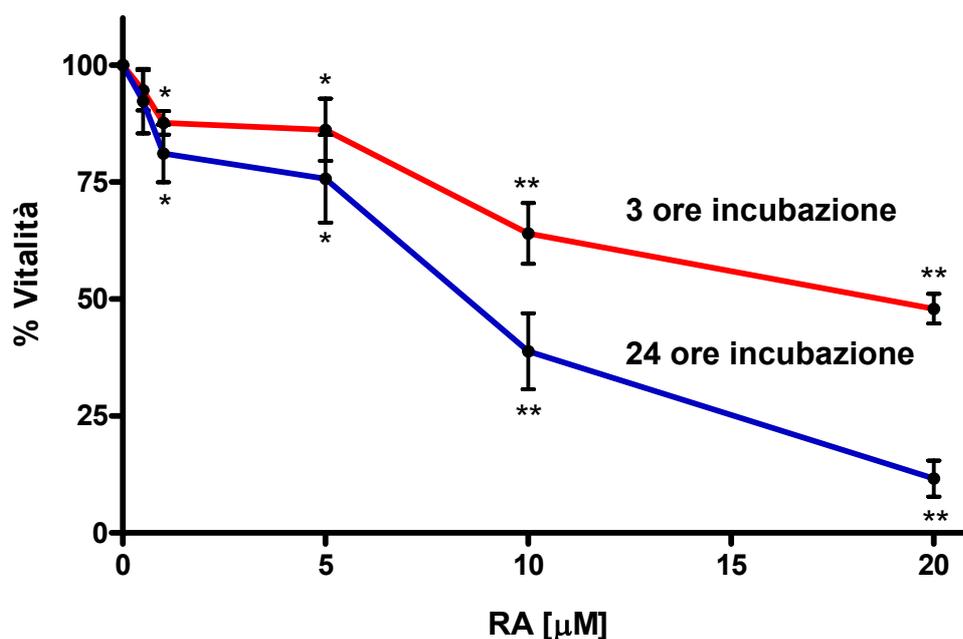


Figura 3.2 Effetto di RA a concentrazioni μM sulla vitalità delle cellule TM-3. La vitalità è stata determinata usando il saggio dell'MTT dopo 3 e 24 ore di incubazione con RA alle concentrazioni indicate. I dati (media \pm SD di tre esperimenti indipendenti) sono espressi come % di riduzione dell'MTT delle cellule cresciute in assenza di RA. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.2 EFFETTO DELL'ACIDO RETINOICO SULLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

Le cellule sono state trattate con RA e la perossidazione lipidica è valutata mediante il saggio dell'acido tiobarbiturico come descritto in Materiali e Metodi. Il substrato TBA (acido tiobarbiturico) addizionato ai campioni cellulari produce perossido d'idrogeno e aldeidi come risultato della reazione di ossidazione. Le specie reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) prodotte vengono espresse come nmoli di malondialdeide (MDA), uno dei prodotti della perossidazione lipidica, per mg di proteina. L'RA a 1, 10, 100 e 200 nM per 24 ore non aumenta il contenuto dei TBARS in maniera significativa. Al contrario le TM-3 trattate per 24 ore con concentrazioni di RA comprese fra 5 e 20 μ M presentano un aumento di MDA altamente significativo rispetto al controllo (**Figure 3.3a e 3.3b**).

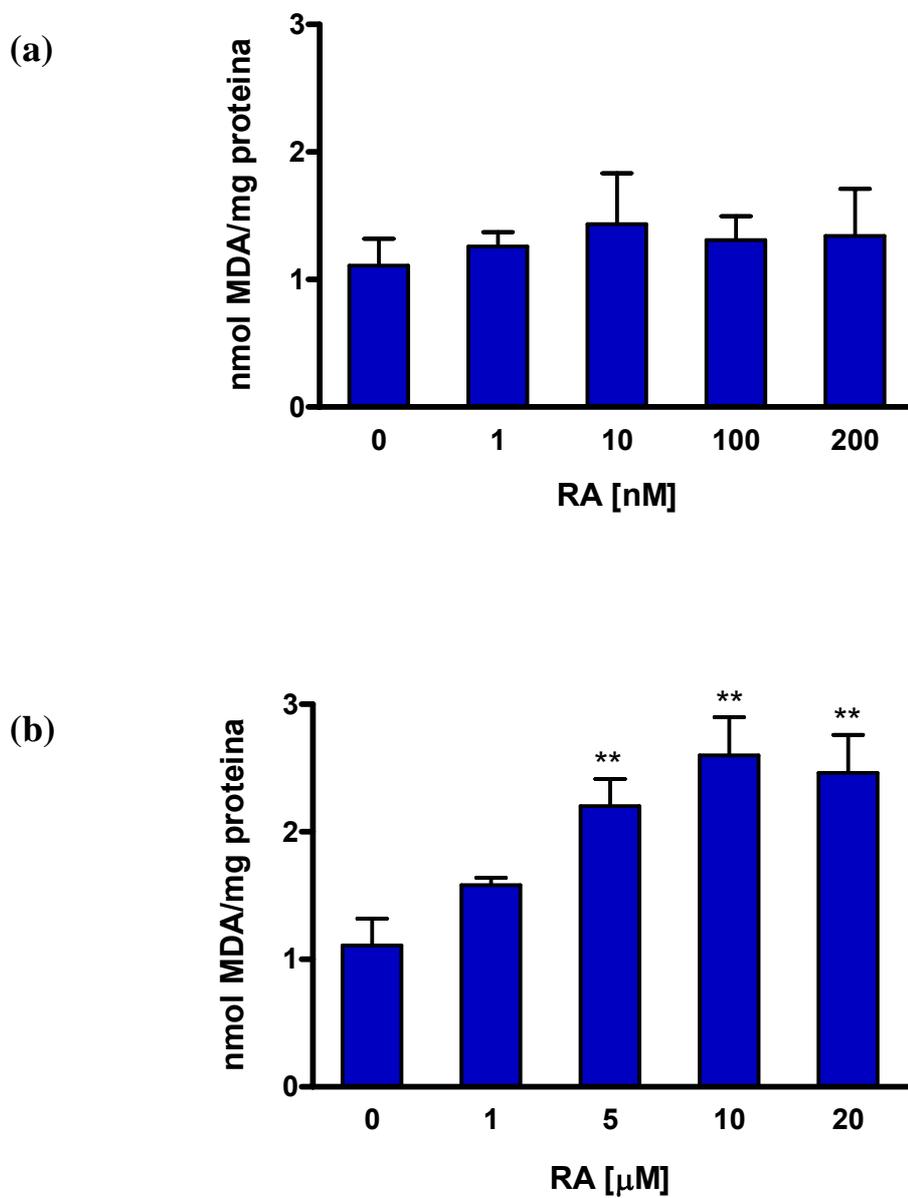


Figura 3.3 Effetto di RA a concentrazioni nM (a) e μ M (b) sulla perossidazione lipidica. I valori di MDA sono espressi in nmol/mg di proteina. I dati presentati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.3 L'ACIDO RETINOICO A CONCENTRAZIONI μM INDUCE APOPTOSI

L'apoptosi è una cascata ordinata di eventi cellulari che come esito finale portano alla morte della cellula. Per esaminare se l'inibizione della crescita cellulare sia associata all'induzione della morte cellulare programmata, le cellule TM-3 sono state incubate con concentrazioni crescenti di RA per 24 ore e sottoposte a varie analisi biochimiche per rilevare i biomarker dell'apoptosi: **(1)** rilascio di citocromo c dai mitocondri; **(2)** attivazione proteolitica della procaspasi-3; **(3)** frammentazione del DNA; **(4)** attivazione delle ceramidi. Per quantizzare la morte non-apoptotica è stato misurato il rilascio cellulare di lattato deidrogenasi.

3.3.1 RA induce il rilascio di citocromo c

Allo scopo di studiare il meccanismo apoptotico a monte della caspasi-3, abbiamo analizzato se l'incubazione con RA induce rilascio di citocromo c dai mitocondri verso il citosol. Questo evento è una caratteristica della via mitocondriale (vedere Introduzione). Le cellule sono state solubilizzate con digitonina in condizioni sperimentali tali da minimizzare il danno alla membrana mitocondriale esterna senza che si abbia il rilascio di citocromo c nelle cellule controllo. Per questo esperimento 2×10^5 cellule/ml di mezzo di coltura completo sono state piastrate e sottoposte a trattamento con RA alle concentrazioni di 0.5, 1, 5, 10 e 20 μM . Dopo 24 ore di incubazione il contenuto citoplasmatico proteico è stato sottoposto a separazione elettroforetica ed a successivo immunoblot della membrana da questa

ottenuta. Come mostrato in **Figura 3.4** si nota la presenza di citocromo c rilasciato nel citoplasma già dopo trattamento con RA 0.5 μM per 24 ore. Questo rilascio aumenta all'aumentare della concentrazione di RA fino a 10-20 μM .

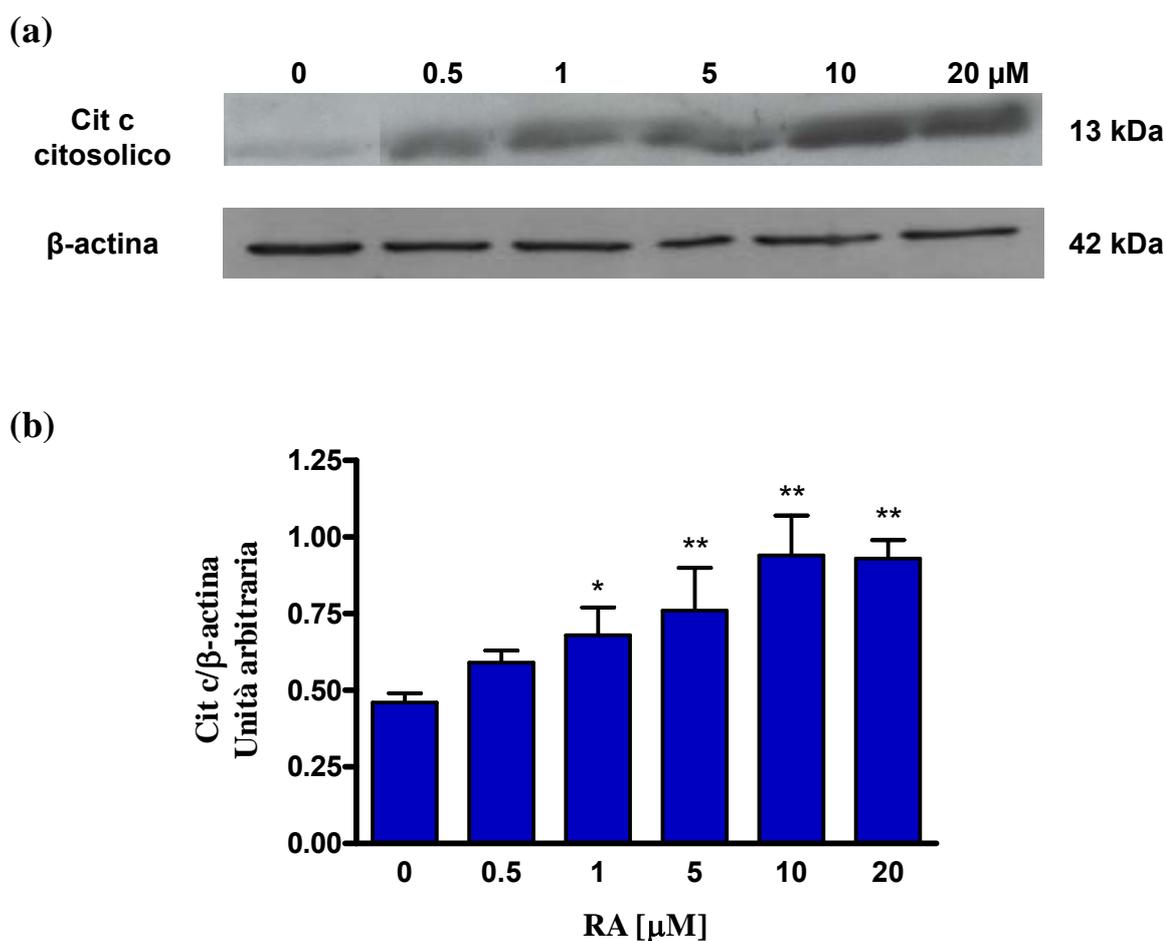


Figura 3.4 Effetto di RA alle concentrazioni indicate per 24 ore di incubazione sul rilascio di citocromo c da cellule TM-3, mediante analisi western blotting (a) e quantificazione densitometrica (b). I risultati sono stati normalizzati al segnale densitometrico della β -actina (banda a 42 kDa) ed espressi come media \pm SD in unità arbitrarie. Risultati simili sono ottenuti in tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

Abbiamo inoltre effettuato un time-course del rilascio di citocromo c dai mitocondri delle cellule TM-3. Il rilascio di citocromo c in presenza di RA 20 μ M inizia ad essere apprezzabile solo dopo 18 ore di incubazione (**Figura 3.5**).

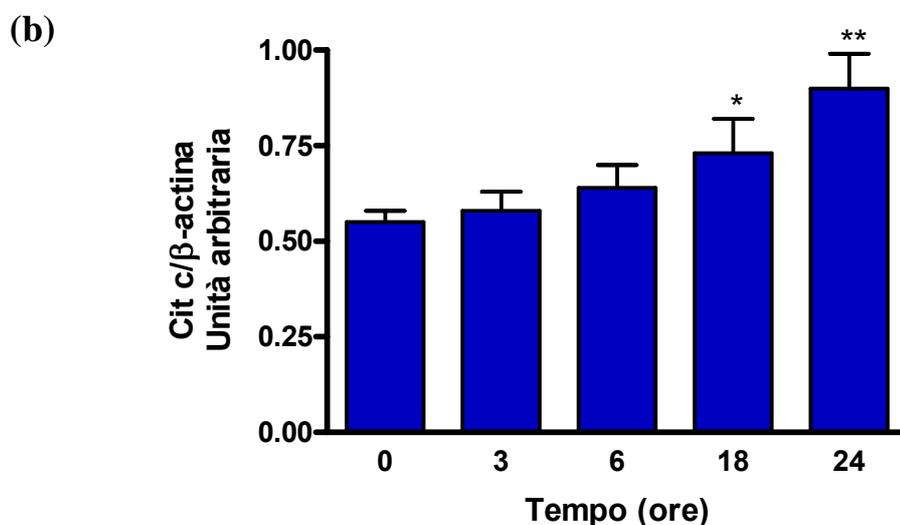
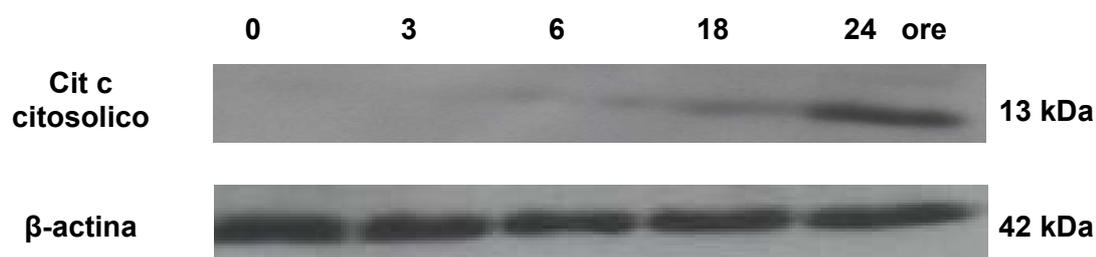


Figura 3.5 Western blotting rappresentativo di tre esperimenti indipendenti del rilascio di citocromo c da cellule TM-3 trattate con RA 20 μ M a diversi tempi di incubazione (**a**) e successiva quantificazione densitometrica (**b**). I risultati sono stati normalizzati al segnale densitometrico della β -actina (banda a 42 kDa) ed espressi come media \pm SD in unità arbitrarie. Risultati simili sono ottenuti in tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.3.2 RA produce l'idrolisi della procaspasi-3

La procaspasi-9 viene attivata via proteolisi nell'apoptosoma, composto dal citocromo c e dal fattore inducente l'apoptosi-1 (Apaf-1), in presenza di ATP (vedere Introduzione). Una volta matura, la caspasi-9 attiva la caspasi-3 e la successiva cascata di eventi apoptotici che portano a morte la cellula. Allo scopo di chiarire se RA produce attivazione di caspasi-3, le cellule sono state incubate per 24 ore e gli estratti proteici sono stati sottoposti a immunoblotting con un anticorpo contro la procaspasi-3. È stata evidenziata così la presenza di due bande proteiche, una corrispondente alla procaspasi-3, con un peso molecolare di 32 kDa, ed un'altra che migra verso la zona con pesi molecolari più bassi. Il peso molecolare apparente di questa proteina, probabilmente la forma attiva della caspasi-3, calcolato in funzione della distanza percorsa nel gel rispetto a standard di pesi molecolari noti, risulta essere di 17 kDa.

Come mostrato in **Figura 3.6**, l'analisi dell'immunoblot rivela che la banda a 32 kDa diminuisce nelle cellule trattate per 24 ore con RA da 0.5 a 20 μ M in maniera dose-dipendente, mentre va aumentando una nuova banda a 17 kDa, corrispondente alla caspasi-3 attiva.

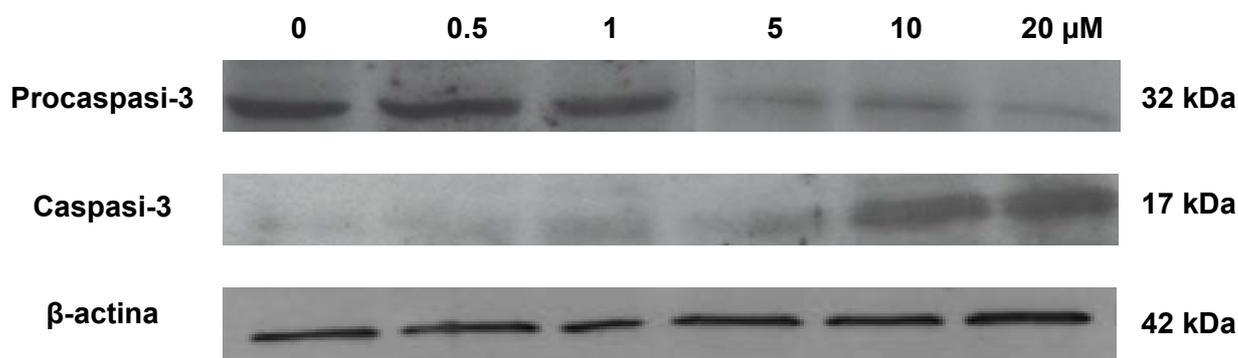


Figura 3.6 Western blotting rappresentativo di tre esperimenti indipendenti dell'attivazione della caspasi-3 da cellule TM-3 trattate con RA a diverse concentrazioni per 24 ore di incubazione. La β -actina, usata come controllo interno, è stata rilevata alla posizione corrispondente al peso molecolare di 42 kDa.

3.3.3 RA induce frammentazione del DNA

La frammentazione del DNA è un altro biomarker dell'apoptosi. Le cellule TM-3 sono state trattate con RA (0, 5, 10 e 20 μ M) per 24 ore. Il DNA genomico estratto dalle cellule è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2% e a successiva visualizzazione con etidio bromuro. Il risultato, mostrato in **Figura 3.7**, evidenzia dei frammenti di basi, tipici delle cellule apoptotiche, nelle TM-3 trattate con RA 10 e 20 μ M.

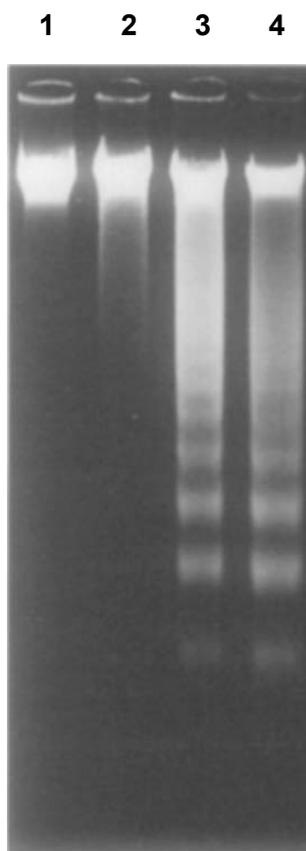


Figura 3.7 Frammentazione del DNA. Le cellule TM-3 sono state trattate per un unico tempo di incubazione di 24 ore con diverse concentrazioni di RA (0, 5, 10 e 20 μM) e sottoposte ad estrazione di DNA come descritto in Materiali e Metodi. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati simili. **Linea 1:** RA 0 μM ; **Linea 2:** RA 5 μM ; **Linea 3:** RA 10 μM ; **Linea 4:** RA 20 μM .

3.3.4 L'apoptosi RA-indotta non è mediata dalla generazioni di ceramidi

Le ceramidi sono componenti chiave degli sfingolipidi complessi e mediatori di molti eventi intracellulari come la proliferazione, il differenziamento, la senescenza e, secondo alcuni autori, la morte cellulare (Lu *et al.*, 2003). Precedenti studi effettuati su cellule TM-3 (Lu *et al.*, 2003) hanno dimostrato che le ceramidi a concentrazioni da 50 a 200 μM

riducono la vitalità cellulare in modo dose-dipendente. Abbiamo, quindi, ipotizzato che l'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico di RA potesse coinvolgere l'induzione di ceramidi. Per far questo abbiamo utilizzato un inibitore della sintesi dei ceramidi, la fumonisina-B1. Come mostrato in **Figura 3.8**, benchè la fumonisina-B1 non abbia alcun effetto sulla vitalità cellulare, questo composto utilizzato ad una concentrazione di 50 μM non ha alcun effetto sulla vitalità delle TM-3, incubate per 24 ore in presenza di concentrazioni crescenti di RA. Ciò indica che l'apoptosi indotta da RA non è mediata dai ceramidi.

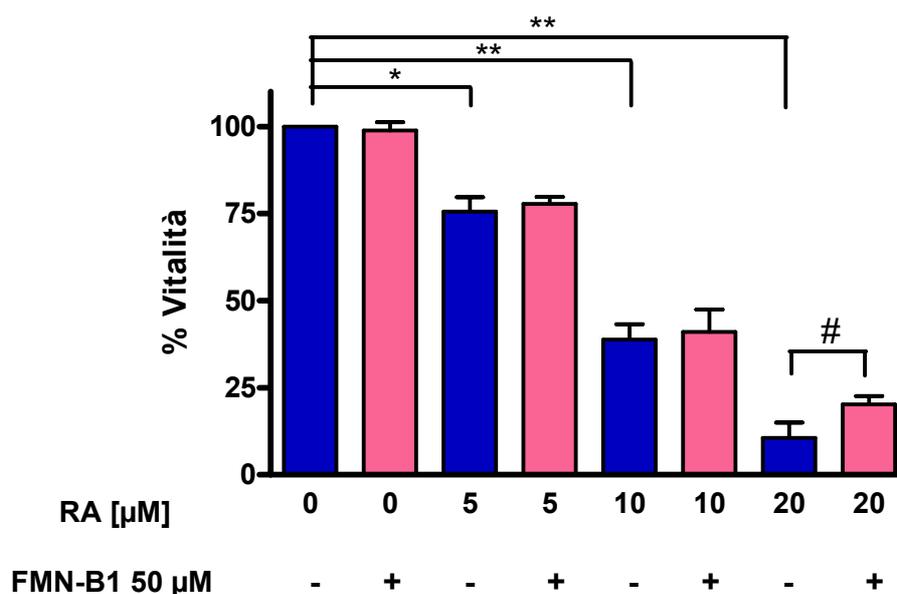


Figura 3.8 Effetto della fumonisina-B1 (FMN-B1) sulla vitalità cellulare. Le cellule erano trattate con varie concentrazioni di RA in assenza e in presenza di FMN-B1 50 μM per 24 ore di incubazione, e la vitalità cellulare era poi determinata mediante saggio dell'MTT. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo; # $p < 0.05$ vs RA 20 μM .

3.3.5 RA induce il rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi

Il rilascio dell'enzima citosolico, lattato deidrogenasi (LDH), è stato determinato come parametro di citotossicità. Il trattamento con RA a concentrazioni μM crescenti per 24 ore di incubazione comporta un rilascio dose-dipendente di LDH nel mezzo di coltura fino a raggiungere il 60% ad una concentrazione di 20 μM RA (**Figura 3.9**).

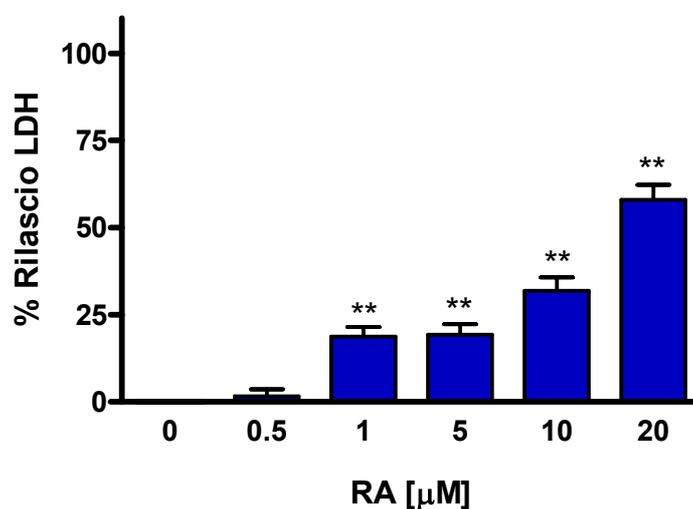


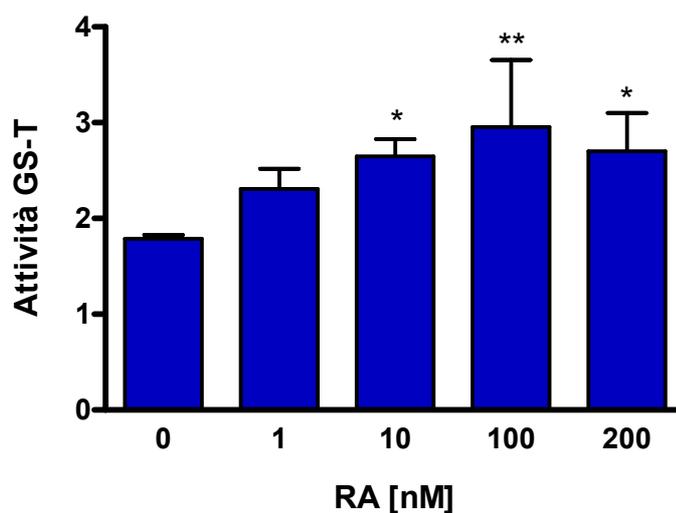
Figura 3.9 Effetto di RA sul rilascio di LDH nel mezzo di coltura. Le cellule erano trattate con varie concentrazioni di RA per 24 ore di incubazione, e la % di rilascio di LDH era poi determinata come descritto in Materiali e Metodi. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.4 L'ACIDO RETINOICO MODULA L'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

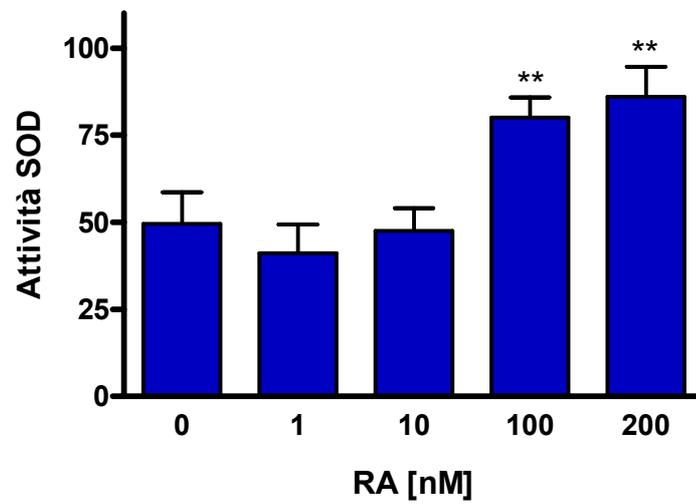
Al fine di valutare cambiamenti nelle difese antiossidanti è stata misurata l'attività degli enzimi glutatione S-transferasi (GS-T), superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT) in cellule TM-3 trattate con concentrazioni nM di RA.

La **Figura 3.10a** mostra che l'attività della GS-T risulta aumentata in maniera significativa rispetto alle cellule controllo a 10 e 200 nM di RA e altamente significativa dopo incubazione con RA 100 nM per 24 ore. L'attività della SOD e della CAT invece aumenta rispettivamente in maniera altamente significativa ($p < 0.01$) e significativa ($p < 0.05$) solo a 100 e 200 nM di RA (**Figure 3.10b e 3.10c**).

(a)



(b)



(c)

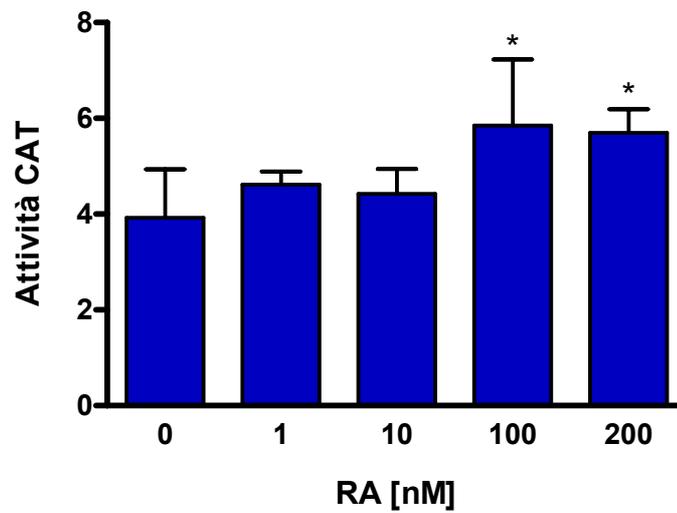


Figura 3.10 Attività degli enzimi antiossidanti GS-T (a), SOD (b) e CAT (c) in cellule TM-3 trattate con RA (0-200 nM) per 24 ore di incubazione. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.5 L'ACIDO RETINOICO È INCORPORATO NELLE PROTEINE DI CELLULE TM-3

La reazione di retinoilazione con RA è una reazione post-traduzionale non dovuta all'informazione genetica. Un possibile meccanismo di reazione prevede la formazione prima di un intermedio retinoil-CoA in presenza di ATP e CoASH e quindi il trasferimento di questo alle proteine cellulari (Takahashi & Breitman, 1994; Renstrom & DeLuca, 1996; Myhre et al, 1998; Genchi & Olson, 2001) (**Figura 3.11**).

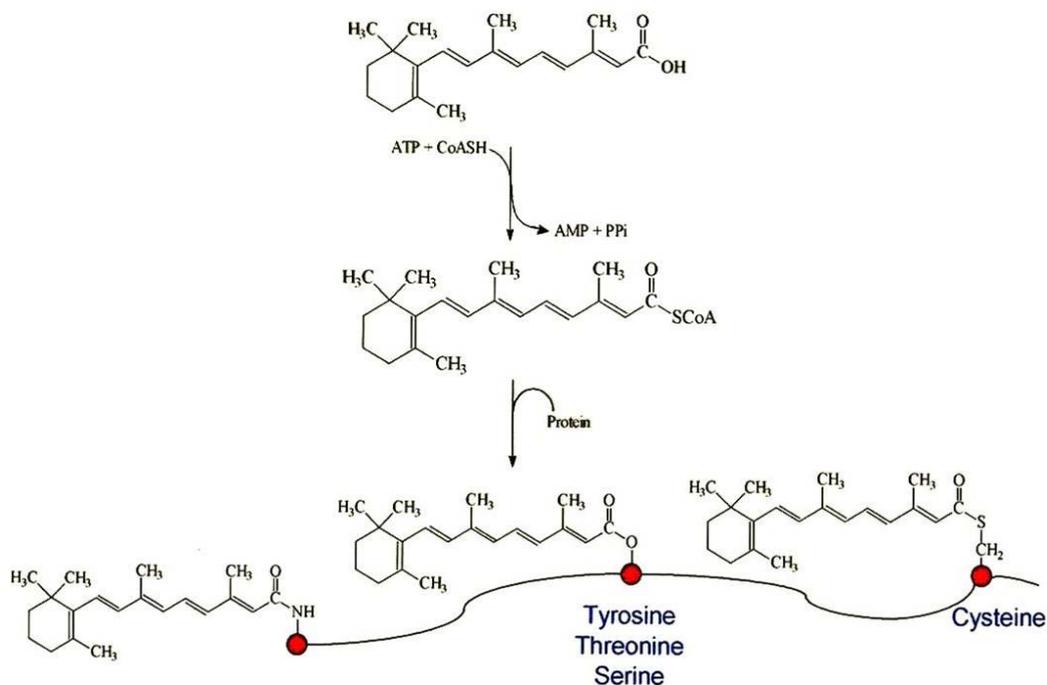
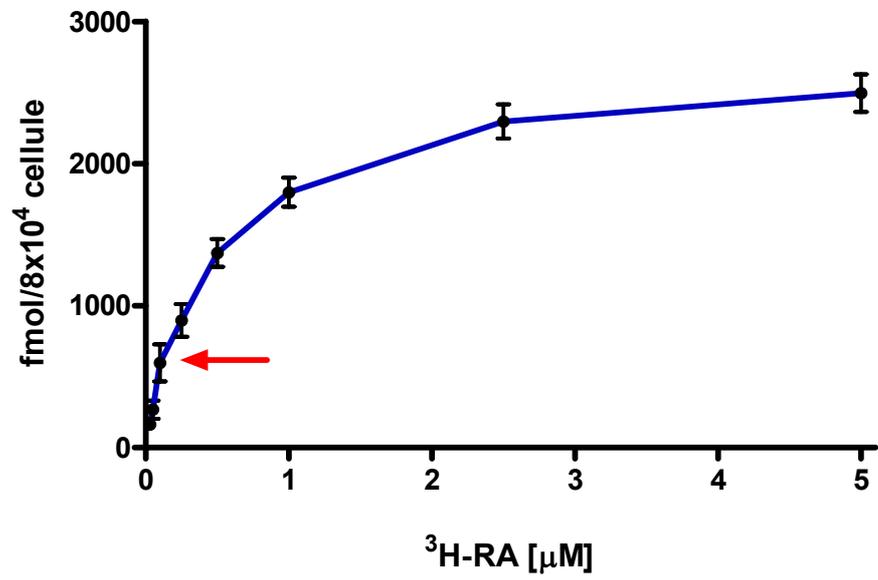


Figura 3.11 Probabile meccanismo della reazione di retinoilazione alle proteine cellulari.

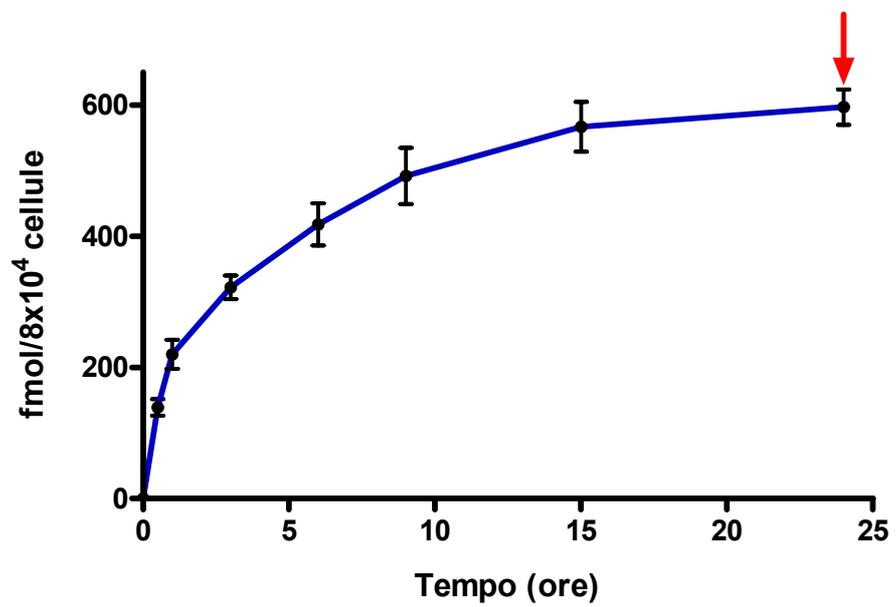
In tutti gli esperimenti eseguiti per ottenere i risultati descritti in questa tesi, non abbiamo aggiunto ATP e CoASH necessari per la reazione di retinoidazione, in quanto già presenti nel citoplasma cellulare.

Dalla **Figura 3.12a** si evince che l'incorporazione dell'acido tutto-*trans*-retinoico triziato ($^3\text{H-RA}$) alle proteine cellulari aumenta all'aumentare della concentrazione di $^3\text{H-RA}$ fino a $2.5 \mu\text{M}$, per poi mantenersi costante fino ad una concentrazione di $5 \mu\text{M}$. Si è scelti di utilizzare la concentrazione di 100 nM , in quanto fisiologica. Le **Figure 3.12b** e **3.12c** mostrano invece, rispettivamente, il time-course della reazione di retinoidazione, eseguito per valutare l'andamento della reazione in funzione del tempo, e la relazione con il numero di cellule utilizzate nei nostri esperimenti, per poter determinare, quindi, le migliori condizioni di lavoro. L'incorporazione di $^3\text{H-RA}$ 100 nM alle proteine cellulari è essenzialmente lineare per 1 ora raggiungendo in questo tempo un'attività di legame di $220 \pm 22 \text{ fmol}/8 \times 10^4$ cellule. Quindi la velocità di incorporazione aumenta con una legge diversa, fino a raggiungere un massimo di incorporazione a 24 ore pari a $597 \pm 27 \text{ fmol}/8 \times 10^4$ cellule.

(a)



(b)



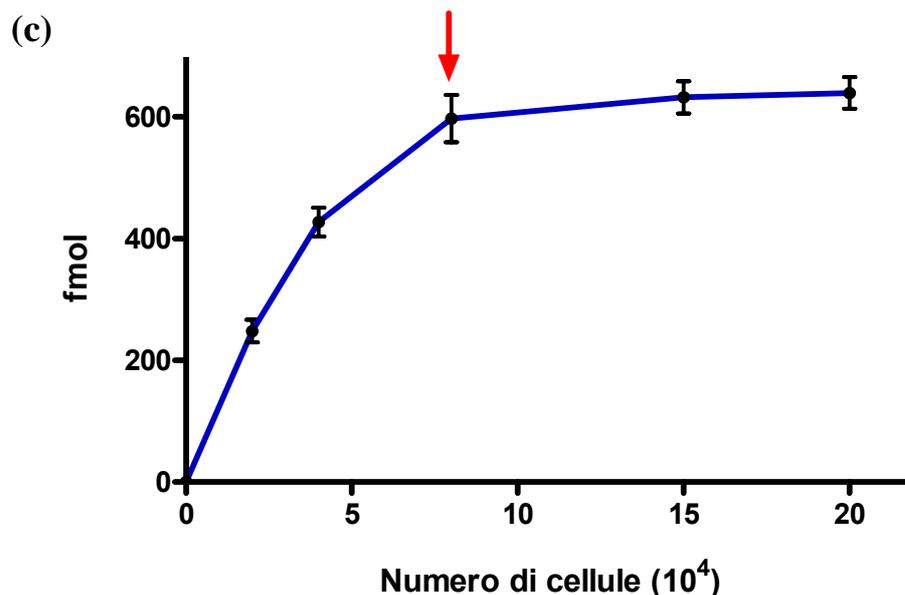


Figura 3.12 reazione di renoilazione alle proteine di cellule TM-3. **(a)** Le cellule ($8 \times 10^4/0.5$ ml di mezzo di coltura) erano trattate con varie concentrazioni di ^3H -RA (30 nM – 5 μM) per 24 ore di incubazione. **(b)** Le cellule ($8 \times 10^4/0.5$ ml di mezzo di coltura) erano incubate a diversi tempi (0-24 ore) con ^3H -RA 100 nM. **(c)** Diverso numero di cellule (2 - $20 \times 10^4/0.5$ ml di mezzo di coltura) erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Negli esperimenti di seguito discussi abbiamo quindi utilizzato, un numero di cellule pari a 8×10^4 e un tempo di incubazione per ^3H -RA 100 nM pari a 24 ore. In 45 esperimenti controllo, nelle condizioni di coltura sperimentali, cioè 24 ore di incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 , la reazione di retinoilazione alle proteine di cellule del Leydig mostrava un'attività di legame pari a 597 ± 38 fmol/ 8×10^4 cellule.

Dopo aver fatto avvenire, secondo le condizioni sperimentali, la reazione di retinoilazione alle proteine delle cellule TM-3, dopo estrazione con tampone di lisi, solubilizzazione con SDS e precipitazione per azione del TCA, le proteine radioattive vengono trattate con proteinasi K a 37°C

per 1 ora e con idrossilammina (NH_2OH) 1 mM e 1 M per 4 ore a 50°C e per 24 ore a temperatura ambiente.

Come indicato in **Tabella 3.1**, dopo il trattamento con proteinasi K a 37°C per 1 ora si è trovato nel supernatante più del 90% della radioattività legata alle proteine; mentre i vari trattamenti con NH_2OH hanno liberato dal 75 al 95% della radioattività legata alle proteine delle cellule. Questi risultati mostrano che l'RA è senza dubbio legato alle proteine cellulari mediante un legame di tipo tioestereo.

Trattamenti	Radioattività rilasciata (%)
Proteinasi K (37°C /1 h)	95 ± 2.4
NH_2OH (1 mM – 55°C /4 h)	75 ± 1.7
NH_2OH (1 M – 55°C /4 h)	95 ± 3.1
NH_2OH (1 mM – 25°C /24 h)	75 ± 1.2
NH_2OH (1 M – 25°C /24 h)	93 ± 0.9

Tabella 3.1 Rilascio di acido tutto-*trans*-retinoico triziato (^3H -RA) da proteine retinoilate di cellule TM-3. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Abbiamo dimostrato, inoltre, che la reazione di retinoilazione coinvolge proteine pre-esistenti (cioè non di nuova sintesi) nelle cellule del Leydig. Per far questo abbiamo misurato l'incorporazione di ^3H -RA alle proteine cellulari in presenza di cicloesimide, un inibitore della traduzione eucariotica. Infatti bloccando l'attività peptidiltransferasica dei ribosomi blocca il processo di sintesi proteica. Se si aggiunge alle cellule TM-3

cicloesimide 4 μM per un tempo di 45 minuti, e se si lascia incubare con ^3H -RA per 24 ore, si ha un'inibizione completa della crescita cellulare e una inibizione della sintesi delle proteine di circa il 90% (*Takahashi & Breitman, 1989, 1990a, 1990b*).

I livelli di retinoidazione misurati in presenza di cicloesimide nelle nostre condizioni sperimentali sono paragonabili a quelli misurati in assenza di cicloesimide (555 ± 17 fmol/ 8×10^4 cellule), suggerendo che la reazione di retinoidazione non interessa proteine della cellula sintetizzate de novo (**Tabella 3.2**).

Trattamenti	fmol/8×10^4 cellule
Controllo	555 ± 37
Cicloesimide 4 μM	540 ± 25

Tabella 3.2 Effetto della cicloesimide sulla reazione di retinoidazione di proteine di cellule TM-3. La cicloesimide 4 μM era aggiunta e le cellule incubate per ulteriori 45 minuti prima dell'aggiunta di ^3H -RA 100 nM.

3.5.1 Effetto di RA sulla produzione di testosterone

Per esaminare l'effetto diretto di RA sulla produzione di testosterone, le cellule TM-3 (1×10^6) sono state trattate con RA (0-200 nM) per 24 ore di incubazione. Il testosterone secreto nel mezzo di cultura è stato poi determinato mediante la metodica R.I.A. come descritto in Materiali e Metodi. Come mostrato in **Figura 3.13** il testosterone aumenta in maniera altamente significativa ($p < 0.01$) dopo trattamento con RA 100 e 200 nM, rispettivamente del 100% e del 75%.

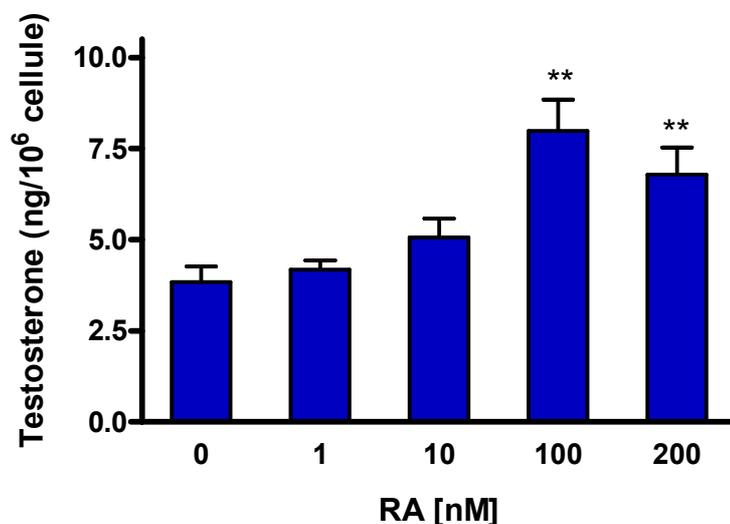


Figura 3.13 Effetto di RA alle concentrazioni indicate sulla produzione di testosterone. Le cellule TM-3 erano trattate con RA per 24 ore e la quantità di testosterone nel mezzo di coltura era poi determinata mediante metodica R.I.A. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

3.5.2 Le proteine retinoilate regolano la steroidogenesi testicolare

Dopo aver caratterizzato in linee generali la reazione di retinoilazione alle proteine cellulari, si è voluto studiare una probabile funzione della reazione di retinoilazione e delle proteine retinoilate nelle cellule del Leydig.

A tale scopo, abbiamo trattato le cellule, secondo il protocollo sperimentale descritto in Materiali e Metodi, con RA a concentrazioni crescenti per 24 ore. Dopo lavaggio con PBS, le cellule sono risospese nel mezzo di coltura privo di siero ed incubate con ³H-RA 100 nM per successive 24 ore. I risultati mostrati in **Figura 3.14** indicano un aumento, del 65% rispetto al controllo, della reazione di retinoilazione con un valore pari a 941 ± 50 fmol/ 8×10^4 cellule dopo preincubazione con RA 100 nM.

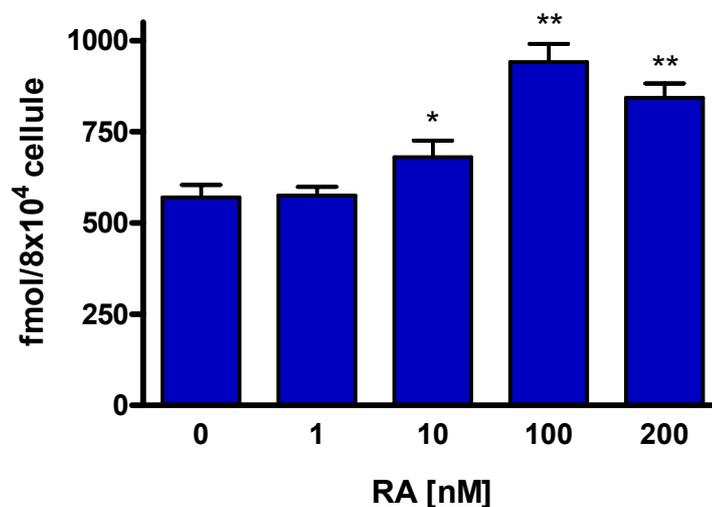


Figura 3.14 Effetto di un pretrattamento con RA alle concentrazioni indicate sulla reazione di retinoilazione di proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con RA, le cellule erano incubate con ³H-RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

L'ormone luteinizzante (LH) è capace di stimolare la produzione e la secrezione di testosterone da parte delle cellule del Leydig mediante l'attivazione di una adenilato ciclasi specifica. L'attivazione risulta in un aumento della concentrazione di AMP-ciclico (AMPC) intracellulare, che attiva una proteina chinasi A, che fosforila una o più proteine nella cellula e/o induce de novo la sintesi di proteine coinvolte nella steroidogenesi. Anche grazie allo stimolo dovuto alla gonadotropina corionica umana (hCG), che presenta azioni sovrapponibili all'LH, si verifica un aumento della produzione di testosterone (*Chaudhary et al., 1989*).

Quindi, si è voluto valutare l'effetto dell'hCG sulla reazione di retinoilazione di proteine di cellule del Leydig. L'hCG viene aggiunta alle

cellule in coltura, secondo il protocollo sperimentale, in un intervallo tra 50 ng/ml e 500 ng/ml. I risultati in **Figura 3.15** mostrano un aumento del legame dell' ^3H -RA all'aumentare della concentrazione di hCG fino a raggiungere un massimo di incorporazione a 250 ng/ml (1215 ± 53 fmol/ 8×10^4 cellule) pari ad un incremento del 115% rispetto al controllo. Se si aumenta l'hCG a 500 ng/ml, l'incorporazione del substrato radioattivo scende a 765 ± 48 fmol/ 8×10^4 cellule.

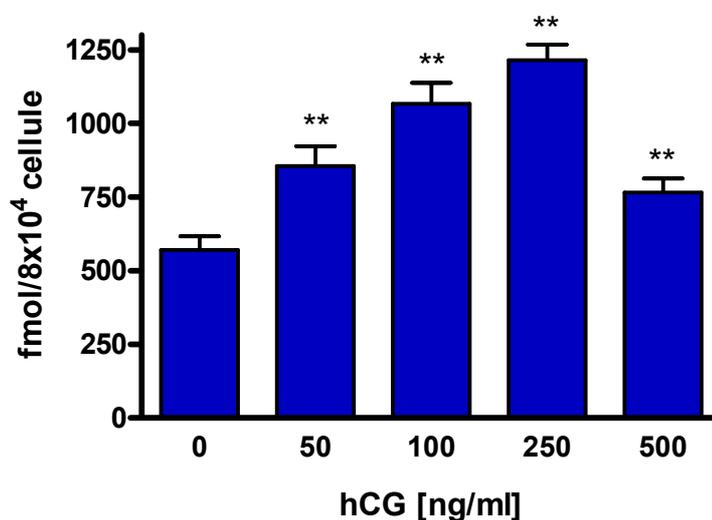


Figura 3.15 Effetto dell'hCG alle concentrazioni indicate sulla reazione di retinoidazione alle proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con hCG, le cellule erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

È stato visto che nelle cellule tumorali del Leydig (MLTC-1) il legame dell'hCG alle cellule inizialmente causa un aumento della concentrazione di AMPc intracellulare; ad alte concentrazioni, invece, la risposta all'hCG è attenuata per desensitizzazione dei recettori (*Inoue &*

Rebois, 1989). Lo stesso potrebbe verificarsi nelle cellule del Leydig normali, giustificando il valore ottenuto a 500 ng/ml. Chaudhary *et al.* (1989) hanno dimostrato che l'RA non ha alcun effetto sulla produzione di testosterone stimolata dall'LH. Dopo preincubazione con RA 100 nM, la reazione di retinoidazione era incrementata del 65% circa rispetto al controllo, mentre la preincubazione con l'ormone hCG (che presenta azioni sovrapponibili a quelle dell'LH) 100 ng/ml aumentava il legame dell' ^3H -RA di quasi il 90%. La preincubazione con RA e hCG insieme incrementava il legame dell' ^3H -RA soltanto del 2% rispetto all'azione con hCG soltanto. Ciò suggerisce che gli effetti di RA e di hCG sono indipendenti e che quindi RA non ha alcun effetto sulla reazione di retinoidazione stimolata dall'hCG (**Figura 3.16**).

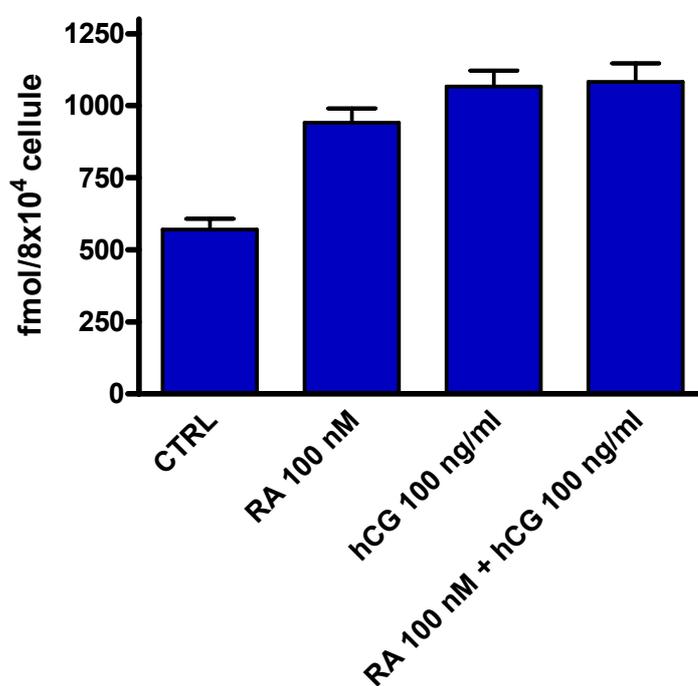


Figura 3.16 Effetto di RA 100 nM, hCG 100 ng/ml, e RA più hCG sulla reazione di retinoidazione di proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con RA, hCG ed RA più hCG, le cellule erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

L'incorporazione di ^3H -RA alle proteine delle cellule del Leydig aumenta anche aumentando i livelli di AMPc intracellulare. Questo risultato, mostrato in **Figura 3.17**, viene ottenuto eseguendo la reazione a concentrazioni crescenti di dibutilil AMP ciclico (db-cAMP), un analogo sintetico dell'AMPc. Come si può notare la reazione aumenta in funzione della concentrazione di db-cAMP raggiungendo un massimo a 250 μM (946 ± 53 fmol/ 8×10^4 cellule) e con un ulteriore anche se piccolo incremento a 500 μM (961 ± 63 fmol/ 8×10^4 cellule).

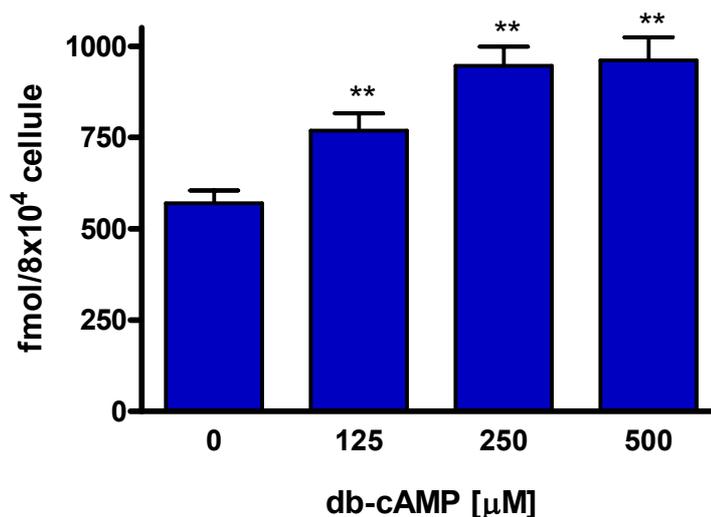


Figura 3.17 Effetto del dibutilil AMP ciclico (db-cAMP) alle concentrazioni indicate sulla reazione di retinilazione alle proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con db-cAMP, le cellule erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

Analogamente, la presenza di forskolina, che è un attivatore dell'adenilato ciclasi, ha come effetto quello di aumentare l'incorporazione di ^3H -RA alle proteine cellulari. Come è mostrato in **Figura 3.18**, l'aggiunta di forskolina 25 μM alle cellule del Leydig in coltura determina un aumento della reazione di circa il 75% con un valore dell'attività di legame pari a 991 ± 78 fmol/ 8×10^4 cellule.

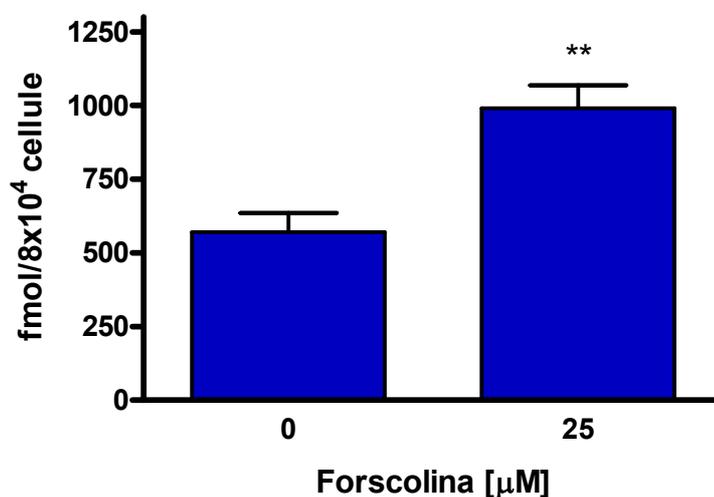


Figura 3.18 Effetto di forskolina 25 μM sulla reazione di retinoilazione alle proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con forskolina, le cellule erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs controllo.

L'effetto di questi trattamenti (hCG, db-cAMP e forskolina) sulla reazione di retinoilazione suggerisce una possibile regolazione delle proteine retinoilate nella funzione delle cellule del Leydig, in quanto ad un aumento della sintesi di testosterone all'interno delle cellule corrisponde un aumento della reazione di retinoilazione alle proteine della cellula.

Studi recenti (Cheng *et al.*, 2003) hanno mostrato che il manganese cloruro (MnCl_2), lasciato agire per 2 e 4 ore, inibisce la steroidogenesi in colture di cellule del Leydig riducendo l'espressione della proteina StAR, mentre per 24 e 48 ore causa effetti inibitori sia sulla proteina StAR sia sugli enzimi coinvolti nella steroidogenesi. La conseguenza è una riduzione dei livelli di testosterone nel mezzo di coltura. Alla luce di quanto detto e a conferma dei risultati ottenuti, abbiamo esposto le cellule TM-3 all'azione del MnCl_2 (20 e 200 μM) per 24 ore secondo protocollo sperimentale. La **Figura 3.19** mostra che la reazione di retinoidazione viene inibita in presenza di MnCl_2 rispettivamente del 28% a 20 μM e del 43% a 200 μM rispetto alla reazione controllo eseguita in assenza di trattamento.

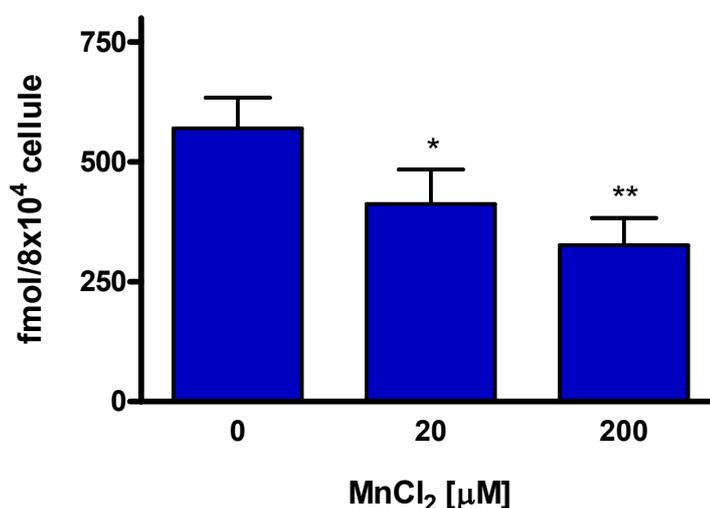


Figura 3.19 Effetto del manganese cloruro (MnCl_2) 20 e 200 μM sulla reazione di retinoidazione alle proteine di cellule TM-3. Dopo 24 ore di incubazione con MnCl_2 , le cellule erano incubate con ^3H -RA 100 nM per 24 ore. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs controllo; ** $p < 0.01$ vs controllo.

4. DISCUSSIONE

Gli antiossidanti sono agenti redox che proteggono dall'azione dei radicali liberi in alcune circostanze, ma ne promuovono la generazione in altre (*Herbert, 1996*). Molti studi hanno rivolto quindi l'attenzione al ruolo dei retinoidi come potenti antiossidanti contro il cancro e le patologie cardiovascolari (*Slaga, 1995*). Altri studi hanno invece dimostrato come i retinoidi abbiano proprietà pro-ossidanti, che porterebbero la cellula al danno ossidativo e alla carcinogenesi (*Dal-Pizzol et al., 2000; Palozza et al., 2001*).

Alla luce di queste considerazioni, scopo del presente lavoro di tesi è quello di studiare gli effetti dell'acido tutto-*trans*-retinoico (RA), a concentrazioni sia fisiologiche che sovra-fisiologiche, in cellule del Leydig (TM-3), derivate da tessuto interstiziale di testicolo di ratto.

I primi risultati ottenuti mostrano che il trattamento con RA induce perossidazione lipidica delle cellule prese in esame. Questo danno sembra essere indotto solo da concentrazioni sovra-fisiologiche (**Figura 3.3b**), poiché a concentrazioni più basse non si ha aumento dei livelli di MDA, il principale prodotto della perossidazione lipidica (**Figura 3.3a**). Il meccanismo della perossidazione lipidica mediata dall'RA non è del tutto conosciuto. Sembra esistano almeno due possibili meccanismi. L'RA potrebbe stimolare l'attività della Δ -6-desaturasi, risultando in un aumento di acidi grassi polinsaturi (PUFA), che sono facilmente ossidati (*Alam et al., 1984*). La Δ -6-desaturasi è l'enzima responsabile dell'inserimento di doppi legami durante la sintesi dei PUFA. Una perdita o una ridotta attività

di questo enzima è stata riscontrata infatti in molti tumori. L'RA potrebbe anche aumentare direttamente la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che risultano in un aumento della perossidazione lipidica (*Davis et al., 1990*).

Un danno ossidativo esteso e quindi non perfettamente tamponato dalle barriere antiossidanti comporta un aumento dei lipoperossidi che, superando un certo ancora non definito valore soglia, inducono la morte cellulare attraverso la via apoptotica.

Sono sempre più numerosi gli studi che evidenziano la capacità dei retinoidi di inibire la crescita e/o indurre la morte delle cellule attraverso la via apoptotica in un'ampia varietà di cellule sia normali sia neoplastiche. Tuttavia i meccanismi attraverso i quali si esplicano tali funzioni sono ancora incerti e talora contraddittori. Una moltitudine di modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* dimostrano infatti che l'RA esibisce effetti inibitori sia sulla crescita sia sull'induzione alla morte cellulare attraverso il meccanismo di apoptosi.

I primi risultati ottenuti mostrano che RA inibisce la crescita delle cellule prese in esame in modo proporzionale sia al suo dosaggio sia al tempo di incubazione (**Figura 3.1b e 3.2**), alle stesse dosi in cui si ha aumento della MDA.

A differenza della necrosi, che porta ad una perdita dell'integrità delle membrane degli organelli, incluso il nucleo, con conseguente rilascio del loro contenuto fino alla rottura dell'intera cellula, l'ultima fase del processo apoptotico prevede la frammentazione dell'intera cellula in complessi membranosi contenenti citosol, cromatina condensata e organelli, indicati

come *corpi apoptotici*, che verranno rapidamente rimossi dai macrofagi per evitare possibili risposte infiammatorie e processi flogistici secondari.

Il trattamento con RA a concentrazioni μM per 24 ore di incubazione risulta in un rilascio dose-dipendente dell'enzima citosolico lattato deidrogenasi (LDH) nel mezzo di coltura (**Figura 3.9**). Il rilascio di LDH nelle cellule è un indice di danno alla membrana plasmatica e, quindi, una caratteristica delle cellule necrotiche. La presenza di fagociti *in vivo* e la loro assenza *in vitro* potrebbe spiegare questo fenomeno. Nelle cellule in coltura, le cellule apoptotiche non possono essere rimosse per fagocitosi; di conseguenza le cellule seguono uno stato post-apoptotico in cui il danno alla membrana plasmatica diventa evidente. Questo risulta in una stato di "necrosi secondaria" che può essere osservato particolarmente nelle cellule in coltura e che differisce dalla necrosi *in vivo* (Savill & Fadok, 2000).

Per esaminare se la tossicità indotta da RA sia dovuta all'induzione di apoptosi nelle cellule TM-3, il DNA genomico è stato estratto dalle cellule e sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2% contenente etidio bromuro. Il risultato ha evidenziato dei frammenti di paia di basi, tipici delle cellule apoptotiche, nelle TM-3 trattate con RA 10 e 20 μM (**Figura 3.7**).

RA è in grado di attraversare le membrane plasmatiche della cellula per diffusione semplice; questo dato ha suggerito che il meccanismo di azione coinvolto potrebbe essere un meccanismo intrinseco, e non legato a recettori di morte. La via intrinseca è caratterizzata dal coinvolgimento del mitocondrio ed in particolare dal rilascio di specifiche proteine e fattori dallo spazio intermembrana al citoplasma. Alcuni di questi sono il citocromo c, AIF e Smac/Diablo. In particolare, il rilascio del citocromo c

porta alla formazione dell'apoptosoma, un complesso formato da citocromo c, Apaf-1, ATP e procaspasi-9, che porta all'attivazione della caspasi-9 la quale, una volta attivata, è in grado di agire sulla procaspasi-3, attivandola. Allo scopo di indagare il coinvolgimento di RA nella via mitocondriale, abbiamo analizzato se il citocromo c venga rilasciato dai mitocondri e se venga attivata la caspasi-3. Grazie alla tecnica del western blotting è stato messo in evidenza che la quantità di citocromo c, rilasciato dopo incubazione di 24 ore con RA a concentrazioni da 0.5 a 20 μM , aumenta in maniera dose-dipendente con un massimo del rilascio alle concentrazioni di 10-20 μM (**Figura 3.4**) e inizia ad essere apprezzabile solo dopo 18 ore di incubazione (**Figura 3.5**).

Tra le caspasi, la caspasi-3 è la proteasi più frequentemente attivata indispensabile per la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA. Il passo successivo, per ottenere la conferma dell'attivazione della via mitocondriale, è stato quello di testare la presenza della caspasi-3 attiva. Anche in questo caso ci siamo avvalsi della tecnica del western blotting ed è stata rilevata la presenza di una banda a 32 kDa, corrispondente alla procaspasi-3, che diminuiva nelle cellule trattate per 24 ore con RA da 0.5 a 20 μM in maniera dose-dipendente, e una nuova banda di 17 kDa, corrispondente alla caspasi-3 attiva, che aumentava (**Figura 3.6**).

Per identificare un possibile meccanismo di RA capace di mediare l'apoptosi nelle cellule TM-3, abbiamo misurato la citotossicità delle cellule in coltura in presenza di fumonisina B1, inibitore della sintesi dei ceramidi. I risultati ottenuti indicano che l'apoptosi indotta da RA non è mediata dalla sintesi di ceramidi (**Figura 3.8**).

Poiché dosi più alte (μM) inducono perossidazione lipidica e morte cellulare, abbiamo deciso di investigare gli effetti di un trattamento fisiologico dell'RA nelle cellule TM-3. L'assenza di fenomeni di perossidazione lipidica all'interno della cellula, in seguito al trattamento con concentrazioni nM di RA, non dà situazione di stress (**Figura 3.3a**) per cui la quantità di specie pro-ossidanti è esattamente bilanciata da quelle anti-ossidanti e come risultato si ottiene la sopravvivenza cellulare (**Figura 3.1a**). Una dose relativamente bassa di lipoperossidi potrebbe incrementare la risposta citoprotettiva da parte della cellula con aumento delle difese antiossidanti (GSH, α -tocoferolo, acido ascorbico, attivazione CAT, SOD, GST) che fanno fronte allo stress assicurando vitalità cellulare. Nel nostro caso, però l'aumento significativo dell'attività della GS-T (**Figura 3.10a**), della SOD (**Figura 3.10b**) e della CAT (**Figura 3.10c**) non si accompagna ad un corrispondente aumento nella produzione di lipoperossidi (**Figura 3.3a**).

In condizioni fisiologiche normali, le cellule del Leydig sono capaci di generare specie reattive dell'ossigeno (*Georgellis et al., 1988*). Gli enzimi del citocromo P450 del pathway steroidogenico usano ossigeno molecolare e trasferiscono gli elettroni dal NADPH a substrati idrossilati (*Hall, 1994*). In questo processo, l'anione superossido e altri radicali liberi dell'ossigeno possono essere prodotti in seguito a perdita di elettroni (*see Hornsby & Crivello, 1983; Hanukoglu et al., 1993; Hall, 1994*). Le membrane dei mitocondri di testicolo sono ricche in acidi grassi polinsaturi e facilmente reagiscono con i radicali liberi (*Georgellis et al., 1988*).

La sintesi e il metabolismo degli ormoni steroidei rilasciano radicali liberi (*Rapaport et al., 1995*) che potrebbero dunque stimolare

l'espressione della GS-T (*Poli et al., 1985*), della SOD e della CAT. Recenti studi hanno dimostrato infatti che alti livelli di GS-T sono localizzati in cellule steroidogenicamente attive (*Rabahi et al., 1999*). Il ruolo biologico specifico della GS-T potrebbe essere collegato allo stress ossidativo indotto dai ROS generati durante la steroidogenesi. Altri studi hanno dimostrato che il testosterone aumenta i livelli di espressione di GS-T in maniera sia dose che tempo dipendenti (*Benbrahim-Tallaa et al., 2002*). Per questo ci siamo chiesti se l'RA non avesse un qualche effetto sulla funzione delle cellule del Leydig. Infatti, i risultati in **Figura 3.13** mostrano che l'RA, alle concentrazioni in cui si ha aumento dell'attività della GS-T, ha un effetto diretto sulla steroidogenesi testicolare aumentando la sintesi di testosterone.

I risultati in questa tesi suggeriscono l'importanza di mantenere uno stato vitaminico in un range fisiologico. L'RA è presente costitutivamente nel plasma a concentrazioni nM (*De Leenheer et al., 1982*); dosi di RA farmacologiche rientrano in un range di concentrazione μM , le stesse dosi a cui si è osservato formazione di MDA e riduzione della vitalità cellulare.

Recentemente sono stati identificati tre tipi di recettori per l'RA (α , β , γ) che appartengono alla famiglia dei recettori per gli ormoni tiroidei/steroidi e che presentano un sito di legame ad alta affinità per l'RA (*Mangelsdorf et al., 1994; Chambon, 1996*). L'RA, oltre a legarsi a questi recettori nucleari, è in grado di legare una o più proteine cellulari effettuando una reazione nota come reazione di retinoidilazione. Tale reazione fa parte di un gran numero di differenti reazioni post-traduzionali di modificazione che avvengono su molte proteine. Alcuni esempi sono le reazioni di palmitoilazione, miristoilazione, fosforilazione, etc. (*Dunphy &*

Linder, 1998). Questi processi fanno sì che le proteine modificate covalentemente svolgano importanti funzioni fisiologiche nella cellula. Anche l'RA, ad esempio, svolge funzioni importanti all'interno delle cellule del Leydig (Chaudhary et al., 1989) ma non è ancora chiaro come agisca.

I risultati mostrati in questa tesi inducono a pensare che le proteine retinoilate delle cellule del Leydig (TM-3) possano essere coinvolte nelle azioni dell'RA all'interno della cellula e spiegarne in qualche modo il meccanismo d'azione.

Un possibile meccanismo della reazione prevede inizialmente la formazione di un intermedio retinoil-CoA in presenza di CoA, di ATP e di Mg^{++} e quindi il trasferimento di quest'ultimo su gruppi -SH delle cisteine con formazione di un legame tioestereo, oppure sui gruppi -OH delle tirosine, treonine e serine con formazione di un legame estereo, oppure ancora sui gruppi -NH₂ degli amminoacidi NH₂-terminali con formazione di un legame ammidico. Nel nostro caso il legame che si forma è di tipo tioestereo. Questa conclusione è basata sul rilascio della radioattività legata alle proteine retinoilate per azione dell'idrossilammina (~75-90%) ma ancor di più per azione della proteinasi K (90%), come si vede in **Tabella 3.1**.

Abbiamo mostrato inoltre che il legame interessa proteine pre-esistenti nella cellula e non proteine di nuova sintesi (**Tabella 3.2**).

L'RA è necessario per lo sviluppo e la funzione delle cellule del Leydig, in particolare ha un effetto diretto sulla steroidogenesi nelle cellule del Leydig (TM-3), stimolando la sintesi di testosterone. Come

mostrato in **Figura 3.13** infatti il testosterone aumenta in maniera altamente significativa ($p < 0.01$) dopo trattamento con RA 100 e 200 nM,

Altri studi hanno dimostrato come l'LH/hCG, i principali ormoni regolatori della steroidogenesi nelle cellule del Leydig, il db-cAMP, che mima gli effetti dell'AMPC, e la forskolina, che è un attivatore dell'adenilato ciclasi, aumentano la produzione di testosterone, che viene secreto nel mezzo di coltura, in misura maggiore rispetto a quello secreto in seguito a trattamento con RA (*Chaudhary et al., 1989*). Inoltre è stato dimostrato che l'RA non ha effetti diretti sulla steroidogenesi stimolata dall'LH (*Chaudhary et al., 1989*). L'MnCl₂, al contrario, ha effetti di inibizione sulla steroidogenesi in cellule del Leydig in coltura, riducendo l'espressione della proteina StAR (*Cheng et al., 2003*). Quindi, i risultati discussi nel presente lavoro dimostrano che la produzione di testosterone indotta da questi stimoli (RA, hCG, db-cAMP e forskolina) porta ad un aumento dell'incorporazione di acido tutto-*trans*-retinoico triziato (³H-RA) alle proteine di cellule del Leydig (**Figure 3.15, 3.17, 3.18**) e che l'RA non ha effetti sulla reazione di retinoilazione indotta dall'hCG (**Figura 3.16**). Inoltre l'MnCl₂ aggiunto alle cellule determina una riduzione della reazione di retinoilazione (**Figura 3.19**).

Queste osservazioni, insieme con i risultati del presente lavoro, suggeriscono che la reazione di retinoilazione alle proteine cellulari abbia un ruolo importante nelle funzioni biologiche dell'RA nelle cellule del Leydig. Probabilmente le proteine retinoilate agiscono sulla funzione delle cellule come regolatori locali della steroidogenesi testicolare.

Gli studi futuri saranno indirizzati ad identificare prima e ad isolare poi la proteina o le proteine cellulari retinoilate e a chiarire meglio il ruolo

che la reazione di retinoidazione gioca nei processi fisiologici delle cellule del Leydig.

5. BIBLIOGRAFIA

- ABE, K. & MATSUKI, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Res.*, **38**, 325-329.
- ADAMS, J.M. & CORY., S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- AEBI, H. (1974). Catalase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Ed. Bergmeyer, H.U., **2**, pp. 673-678. New York. Academic Press.
- ALAM, S.Q., ALAM, B.S. & CHEN, T.W. (1984). Activities of fatty acid desaturases and fatty acid composition of liver microsomes in rats fed β -carotene and 13-*cis*-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*, **792**, 110-117.
- ALTUCCI, L. & GRONEMEYER, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Review*, **1**, 181-193.
- ANTONSSON, B., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., ESKEES, R. & MARTINOU, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.*, **345**, 271-8.
- BENBRAHIM-TALLAA, L., TABONE, E., TOSSER-KLOPP, G., HATEY, F. & BENAHMED, M. (2002). Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells is under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biology of Reproduction*, **66**, 1734-1742.

- BERNARDI, P., SCORRANO, L., COLONNA, R., PETRONILLI, V. & DI LISA, F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issue. *Eur J Biochem.*, **264**, 687-701.
- BERTRAND, R., SOLARY, E., O'CONNOR, P., KOHN, K.W. & POMMIER, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.*, **211**, 314-321.
- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B. & BRDICZKA, D. (1998). Complexes between porin, hexokinases, mitochondrial creatine kinase and adenylate traslocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1368**, 7-18.
- BREITMAN, T.R. & TAKAHASHI, N. (1996). Retinoylation of proteins in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.*, **24**, 723-727.
- CHAMBON, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoid receptors. *FASEB J.*, **10**, 940-954.
- CHAUDHARY, L.R., HUTSON, J.C. & STOCCO, D.M. (1989). Effect of retinol and retinoic acid on testosterone production by rat Leydig cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.*, **158**, 400-406.
- CHENG, J., FU, J.L. & ZHOU, Z.C. (2003). The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by distrupting StAR protein expression. *Toxicol.*, **187**, 139-148.
- COHEN, J.J., DUKE, R.C, FADOK, V.A. & SELLINS, K.S. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.*, **10**, 267-293.

- CORY, S. & ADAMS, J.M. (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., FROTA, M.L.C., MORAES, L.F., MOREIRA, J.C.F. & BENFATTO, M.S. (2000). Retinol supplementation induced DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. *Free Rad Res.*, **33**, 677-687.
- DAS, K., SAMANTA, L. & CHAINY, G.B.N. (2000). A modified spectrophotometric assay for superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. *IJBB*, **37**, 201-204.
- DAVIS, W.L., CRAWFORD, L.A., COOPER, O.J., FARMER, G.R., THOMAS, D. & FREEMAN, B.L. (1990). Generation of radical oxygen species by neural crest cells treated *in vitro* with isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin. *J Craniofac Genet Dev Biol.*, **10**, 295-310.
- DE LEENHEER, A.P., LAMBERT, W.E. & CLAEYS, I. (1982). All-*trans*-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res.*, **23**, 1362-1367.
- DE LUCA, L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, **5**, 2924-2933.
- DENAULT, J.B. & SALVESEN, G.S. (2002). Caspase: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.*, **102**, 4489-4500.
- DRAPER, H.H. & HADLEY, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431.

- DUESTER, G., MIC, F.A. & MOLOTKOV, A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenase govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.*, **143-144**, 201-210.
- DUNPHY, J.T. & LINDER, M.E. (1998). Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 245-261.
- GENCHI, G. & OLSON, J.A. (2001). Retinoylation of protein in cell-free fractions of rat tissue in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **1530**, 146-154.
- GEORGELLIS, A., TSIRIGOTIS, M. & RYDSTROM, J. (1988). Generation of superoxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **94**, 362-373.
- GIANNECCHINI, M., D'INNOCENZO, B., PESI, R., SGARRELLA, F., IORIO, M., COLLECCHI, P., TOZZI, M.G. & CAMICI, M. (2003). 2'-deoxyadenosine causes apoptotic cell death in a human colon carcinoma cell line. *J Biochem Mol Tox.*, **17**, 329-337.
- GOLSTEIN, P., OJCIUS, D.M. & YOUNG, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*, **121**, 29-65.
- GREEN, D.R. & REED, N.K. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- HABIG, W.H., PABST, M.J. & JAKOBY, W.B. (1973). Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, **249**, 7130-7139.
- HALESTRAP, A. P. & BRENNERB, C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability

- transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.*, **10**, 1507-1525.
- HALL, P.F. (1994). Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D., **vol. 1**, pp. 1335-1362. New York. Raven Press.
- HALLIWELL, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.*, **31**, 261-272.
- HANUKOGLU, I., RAPOPORT, R., WEINER, L. & SKLAN, D. (1993). Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch Biochem Biophys.*, **305**, 489-498.
- HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. & GOODMAN GILMAN A. (1996). In: *The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. **IX**, pp. 1527-1531. United States of America. The Mac Graw-Hill Companies.
- HAYES, J.D. & PULFORD, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **30**, 445- 600.
- HERBERT, V. (1996). Pro-oxidants effects of antioxidants vitamins. *J Nutr.*, **126**, 1197-1200.
- HORNSBY, P.J. & CRIVELLO, J.F. (1983). The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part I: a background review. *Mol Cell Endocrinol.*, **30**, 1-20.

- INOUE, Y. & REBOIS, R.V. (1989). Protein kinase C activity can desensitize the gonadotropin responsive adenylate cyclase in Leydig tumor cells but hCG desensitization does not involve PK C activation. *J Biol Chem.*, **264**, 8504-8508.
- KASTNER, P., KRUST, A., MENDELSON, C., GARNER, J. M., SELENT, A., LEROY, P., STAUB, A. & CHAMBON, P. (1990). Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 2700-2704.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H. & CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue Kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- KIM, J.M., LUO, L. & ZIRKIN, B.R. (2000). Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology*, **141**, 1846-1853.
- KROEMER, G. & REED, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**, 513-519.
- KROEMER, G., ZAMZAMI, N. & SUSIN, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **18**, 44-51.
- KUBO, Y., WADA, M., OHBA, T. & TAKAHASHI, N. (2005). Formation of retinoylated proteins from retinoyl-CoA in rat tissue. *J Biochem.*, **138**, 493-500.
- KWON, T. & WATTS, B. (1964). Malonaldehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation in foods. *Journal of Food Science*, **29**, 294-302.

- KYPRIANOU, N., ENGLISH, H.F. & ISAACS, J.T. (1988). Activation of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate*, **13**, 103-117.
- LEFEVRE, G., BELJEAN-LEYMARIE, M., BEYERLE, F., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., CRISTOL, J.P., THEROND, P. & TORREILLES, J. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*, **56**, 305-319.
- LEIST, M., SINGLE, B., CASTOLDI, A.F., KUHNLE, S. & NICOTERA, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.*, **185**, 1481-1486.
- LEROY, P., KRUST, A., ZELENT, A., MENDELSON, C., GARNIER, J.M., KASTNER, P., DIERICH, A. & CHAMBON, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor α are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.*, **10**, 59-69.
- LI, L.Y., LUO X. & WANG, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
- LOEFFLER, M. & KROEMER, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.*, **256**, 19-26.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, **193**, 265-275.
- LU, Z.H., MU, Y.M., WANG, B.A., LU, J.M., LI, J.Y., PAN, C.Y., YANASE, T. & NAWATA, H. (2003). Saturated free fatty acids,

- palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochem Biophys Res Commun.*, **303**, 1002-1007.
- LYNCH, M.P., NAWAZ, S. & GERSCHENSON, L.E. (1986). Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **83**, 4784-4788.
- MAJNO, G. & JORIS, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol.*, **146**, 3-15.
- MANGELSDORF, D.J. & EVANS, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-850.
- MANGELSDORF, D.J., UMESONO, K. & EVANS, R.M. (1994). The retinoid receptors. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Eds. Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S. pp. 319-349. New York. Raven Press.
- MARCHETTI, P., DECAUDIN, D., MACHO, A., ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., SUSIN, S.A. & KROEMER, G. (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status of mitochondrial function. *Eur J Immunol.*, **27**, 289-296.
- MEIER, P., FINCH, A. & EVAN, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
- MENDELSON, C., LOHNES, D., DECIMO D., LUFKIN, T., LEMEURE, M., CHAMBON, P. & MARK, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, **120**, 2749-2771.

- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **16**, 55-63.
- MYHRE, M., HAGEN, E., BLOMHOFF, R. & NORUM, K.R. (1998). Retinoylation of proteins in a macrophage tumor cell line J774, following uptake of chylomicron remnant retinyl ester. *J Nutr Biochem.*, **9**, 705-711.
- MYHRE, M., TAKAHASHI, N., BLOMHOFF, R., BEITMAN, T.R. & NORUM, K.R. (1996). Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *J Lipid Res.*, **37**, 1971-1977.
- NAGATA, K. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol.*, **406**, 119-124.
- NAISMITH, J.H. & SPRANG, S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.*, **23**, 74-79.
- NARUSE, I. & KEINO, H. (1995). Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol.*, **47**, 135-155.
- OLSON, E. N., TOWLER, D.A. & GLASER, L. (1985). Specificity of fatty acid acylation of cellular proteins. *J Biol Chem.*, **260**, 3784-3790.
- PALOZZA, P., CALVIELLO, G., SERINI, S., MAGGIANO, N., LANZA, P., RANELLETTI, F.O. & BARTOLI, G.M. (2001). β -carotene at high concentration induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radic Biol Med.*, **30**, 1000-1007.
- POLI, G., DIANZANI, M.U., CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F., LANG, J. & ESTERBAUER, H. (1985). Separation and

- characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron isolated hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem J.*, **227**, 629-638.
- RABAHI, F., BRULÈ, S., SIROIS, J., BECKERS, J.F., SILVERSIDES, D.W. & LUSSIER, J.G. (1999). High expression of bovine a glutathione S-transferase (GSTA1, GSTA2) subunits is mainly associated with steroidogenically active cells and regulated by gonadotropins in bovine ovarian follicles. *Endocrinology*, **140**, 3507-3517.
- RAPOPORT, R., SKLAN, D. & HANUKOGLU, I. (1995). Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys.*, **317**, 412-416.
- RENSTROM, B. & DELUCA, H.F. (1996). Incorporation of retinoic acid into proteins via retinoyl-CoA. *Biochim Biophys Acta*, **998**, 69-74.
- RICHTER, C. & KASS, G.E. (1991). Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem Biol Interact.*, **77**, 1-23.
- ROSS, S. A., MCCAFFERY, P. J., DRAGER, U. C. & DE LUCA, L. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.*, **80**, 1021-1054.
- SALINAS, A.E. & WONG, M.G. (1999). Glutathione S-transferase - a review. *Curr Med Chem.*, **6**, 279-309.
- SALVESEN, G.S. & RENATUS, M. (2002). Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell.*, **45**, 528-537.

- SAVILL, J. & FADOK, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, **407**, 784-788.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K.J., DEBATIN, K.M., KRAMMER, P.H. & PETER, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J*, **17**, 1675-1687.
- SCHALLREUTER, K.U. & WOOD, J.M. (1989). The stereospecific suicide inhibition of human melanoma thioredoxin reductase by 13-*cis*-retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun.*, **160**, 573-579.
- SLAGA, T.J. (1995). Nutrition and Bio/Technology in heart disease and cancer. Eds. Longenecker, J.B., Kritchevsky, D., Drezner, M.K., pp. 167-174. New York. Plenum Publishing Corp.
- STRASSER, A., O'CONNOR, L. & DIXIT, V.M. (2000a). Apoptosis signalling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-245.
- STRASSER, A., PUTHALAKATH, H., BOUILLET, P., HUANG, D.C., O'CONNOR, L., O'REILLY, L.A., CULLEN, L., CORY, S. & ADAMS, J.M. (2000b). The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci.*, **917**, 541-548.
- SUSIN, S.A., LORENZO, H.Z., ZAMPAMI, N., MARZO, I., SNOW B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M. & KROEMER, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-6.

- TAKAHASHI, N. & BREITMAN, T.R. (1989). Retinoic acid acylation (retinoylation) of a nuclear protein in the human acute myeloid leukemia cell line HL60. *J Biol Chem.*, **264**, 5159-5163.
- TAKAHASHI, N. & BREITMAN, T.R. (1990a). Retinoylation of HL60 proteins. Comparison to labeling by palmitic and myristic acids. *J Biol Chem.*, **265**, 19158-19162.
- TAKAHASHI, N. & BREITMAN, T.R. (1990b). Retinoic acid acylation: retinoylation. *Methods Enzymol.*, **189**, 233-238.
- TAKAHASHI, N. & BREITMAN, T.R. (1994). Retinoylation of vimentin in the human myeloid leukemia cell line HL60. *J Biol Chem.*, **269**, 5913-5917.
- TAKAHASHI, N., JETTEN, A.M. & BREITMAN, T.R. (1991a). Retinoylation of cytokeratins in normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, **180**, 393-400.
- TAKAHASHI, N., LIAPI, C., ANDERSON, W.B. & BREITMAN, T.R. (1991b). Retinoylation of the cAMP-binding regulatory subunits of type I and type II cAMP-dependent protein kinases in HL60 cells. *Arch Biochem Biophys.*, **290**, 293-302.
- TOURNIER, S., RAYNAUD, F., GERBAUD, P., LOHMANN, S.M., ANDERSON, W.B. & EVAÏN-BRION, D. (1996). Retinoylation of the type II cAMP-binding regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase is increased in psoriatic human fibroblasts. *J Cell Physiol.*, **167**, 196-203.
- TSUJIIMOTO, Y. & SHIMIZU, S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family proteins. *Cell Death Differ.*, **7**, 1174-1181.

- VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J., & TELSNER, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.*, **266**, 37-56.
- VERHAGEN, A.M., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L.M., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J. & VAUX, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- WANG, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F. & CURRIE, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.*, **68**, 251-306.
- YAGI, K. (1998). Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, **108**, 101-106.
- YANG, E. & KORSMEYER, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, **88**, 386-401.
- ZELEN, A., MENDELSON, C., KASTNER, P., DRUST, A., GARNIER, J. M., RUFFENACH, F., LEROY, P. & CHAMBON, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.*, **10**, 71-81.
- ZHANG, X.K. & PFAHL, M. (1993). Hetero- and homodimeric receptors in thyroid hormone and vitamin A action. *Receptor*, **3**, 183-91.

6. ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI E DELLE COMUNICAZIONI A CONGRESSI

6.1 PUBBLICAZIONI

CIONE, E., **TUCCI, P.**, CHIMENTO, A., PEZZI, V. & GENCHI, G. (2005). Retinoylation reaction of proteins in Leydig (TM-3) cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **37**, 43-48.

CIONE, E., **TUCCI, P.**, SENATORE, V., IOELE, G. & GENCHI, G. (2005). Binding of all-*trans*-retinoic acid to MLTC-1 proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **276**, 55-60.

CIONE, E., SENATORE, V., **TUCCI, P.**, GIUDETTI, A.M., GENCHI, F., GNONI, G.V. & GENCHI, G. (2007). Dietary fatty acid composition differently influences retinoylation reaction in rat testes mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **39**, 203-209.

CIONE, E.* , **TUCCI, P.*** , SENATORE, V., PERRI, M., TROMBINO, S., IEMMA, F., PICCI, N. & GENCHI, G. (2007). Synthetised esters of ferulic acid induce release of cytochrome c from rat testes mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, (Epub ahead-of print).

TUCCI, P.* , CIONE, E.* & GENCHI, G. (2007). Retinoic acid-induced testosterone production and retinoylation reaction are concomitant and exhibit a positive correlations in Leydig (TM-3) cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, (Submitted).

*Equally contributed

6.2 COMUNICAZIONI A CONGRESSI

CIONE, E., **TUCCI, P.**, CHIMENTO, A., PEZZI, V. & GENCHI, G. (2004). Incorporation of retinoic acid into proteins of Leydig (TM-3) cell. In “49° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **53** n. 3, September, 2004.

TROMBINO, S., CIONE, E., **TUCCI, P.**, GRECO, A., SENATORE, V. & GENCHI, G. (2004). Antioxidant synergistic effect of ferulic acid with all-trans-retinoic acid and δ -tocopherol in rat liver mitochondria. In “49° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **53** n. 3, September, 2004.

TUCCI, P., SENATORE, V., TROMBINO, S., CIONE, E. & GENCHI, G. (2005). Ferulic acid: antioxidant effect and release of cytochrome c in rat liver mitochondria. In “VIII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine: Plasticity in Pain and Death”. Parghelia (VV), May, 25-26, 2005.

TUCCI, P., CIONE, E., SENATORE, V. & GENCHI, G. (2005). Incorporation of retinoic acid into proteins of tumoral leydig (MLTC-1) cells. In “50° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **54** n. 1-2, March-June, 2005.

SENATORE, V., CIONE, E., **TUCCI, P.** & GENCHI, G. (2005). Retinoylation reaction of rat testes mitochondria in the presence of different inhibitors of carriers and respiratory chain and Krebs cycle substrates. In “50° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **54** n. 1-2, March-June, 2005.

TUCCL, P., CIONE, E., SENATORE, V. & GENCHI, G. (2006). All-trans-retinoic acid (RA) induces apoptosis in Leydig (TM-3) cells. In “IX Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine: Neuroinflammation in Neuronal Death and Repair”. Parghelia (VV), September, 13-16, 2006.

TUCCL, P., CIONE, E., SENATORE, V. & GENCHI, G. (2006). Release of cytochrome c is required for Leydig (TM-3) cells apoptosis induced by all-trans-retinoic acid (RA) . In “51° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **55** n. 1-2, March-June, 2006.

SENATORE, V., CIONE, E., **TUCCL, P.** & GENCHI, G. (2006). Localization of retinoylating system of rat testes mitochondria and cardiolipin. Effect on retinoylation reaction. In “51° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **55** n. 1-2, March-June, 2006.

TUCCL, P., CIONE, E., SENATORE, V., PERRI, M., PINGITORE, A. & GENCHI, G. (2007). Retinoic acid (RA) induces free radical generation and modulates enzymes antioxidant activity in Leydig (TM-3) cells. In “52° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **56** n. 3, September, 2007.

SENATORE, V., CIONE, E., **TUCCL, P.**, PINGITORE, A., PERRI, M., GNONI, G.V. & GENCHI, G. (2007). Retinoylation reaction in hypothyroid rat testes mitochondria. In “52° Congresso Nazionale SIB”. *The Italian Journal of Biochemistry*, Vol. **56** n. 3, September, 2007.