



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CALABRIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

"FARMACOLOGIA E BIOCHIMICA DELLA MORTE CELLULARE"

XXII Ciclo

Effetti dell'attività basale della NO sintasi endoteliale sul
signalling e sulla migrazione chemiotattica.

Settore Scientifico Disciplinare: BIO\13 Biologia Applicata

Coordinatore

Chiar.mo Prof.
Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.ma Prof. ssa

Dominica Borgese

Dottoranda

Dott.ssa Maria Vincenza Ierardi

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

RIASSUNTO

ABBREVIAZIONI

1. INTRODUZIONE

<i>1.1. Il nitrossido (NO)</i>	14
<i>1.2. Enzimi che sintetizzano il NO: nitrossido sintasi (NOS)</i>	21
<i>1.2.1. Struttura e meccanismo catalitico della NOS</i>	23
<i>1.3. La NOS endoteliale (eNOS)</i>	29
<i>1.3.1. Generalità</i>	29
<i>1.3.2. Gene della eNOS: regolazione trascrizionale e post-trascrizionale</i>	30
<i>1.3.3. Regolazione dell'attività della eNOS</i>	32
<i>1.3.3.1. Miristoilazione e palmitoilazione</i>	32
<i>1.3.3.2. Fosforilazione</i>	35
<i>1.3.3.3. S-Nitrosilazione</i>	41
<i>1.3.3.4. Acetilazione</i>	44
<i>1.3.3.5. Interazioni proteine-proteine</i>	45
<i>1.3.4. Localizzazione della eNOS</i>	57
<i>1.3.4.1. Localizzazione della eNOS nelle caveolae</i>	59
<i>1.3.4.2. Significato della eNOS golgiana</i>	61
<i>1.3.4.3. Interazioni con il citoscheletro</i>	62
<i>1.4. Ruoli fisiologici della eNOS</i>	65
<i>1.4.1. eNOS e vasodilatazione</i>	65
<i>1.4.2. Protezione dall'apoptosi</i>	69
<i>1.4.2.1. Caratteristiche generali dell'apoptosi</i>	69
<i>1.4.2.2. NO, eNOS ed apoptosi</i>	70
<i>1.4.3. Angiogenesi e migrazione</i>	74
<i>1.4.3.1. Generalità</i>	74

1.4.3.2. Ruolo della eNOS e del NO da esso prodotto nella migrazione delle cellule endoteliali.....	76
1.5. Scopo della tesi.....	83
2. MATERIALE E METODI	
2.1. Colture cellulari.....	86
2.2. Lisi cellulare – quantificazione delle proteine e del DNA.....	87
2.3. Immunoblot.....	88
2.4. Saggio di proliferazione.....	90
2.5. Saggio di adesione.....	91
2.6. Saggio di migrazione di Boyden.....	92
2.7. Trattamento con i farmaci.....	96
2.8. Immunofluorescenza.....	97
2.9. Misura del potenziale di membrana mitocondriale.....	98
2.10. Proteomica.....	100
2.10.1. Preparazione dei campioni e separazione in 2-D.....	100
2.10.2. Acquisizione ed analisi delle immagini.....	103
2.11. Analisi statistica.....	103
3. RISULTATI	
3.1. Linee eNOS-HeLa-TetOff.....	106
3.2. L'espressione cronica della eNOS diminuisce la migrazione di cellule HeLa-TetOff.....	108
3.3. Inibizione della capacità migratoria delle cellule HeLa dopo trattamento cronico con concentrazioni nanomolari di donatori di NO.....	113
3.4. Aumento della migrazione delle cellule HUVEC dopo trattamento cronico con L-NAME.....	119

<i>3.5. Possibili meccanismi d'azione del NO basale sulla migrazione.....</i>	<i>124</i>
<i>3.5.1. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sulla adesione.....</i>	<i>124</i>
<i>3.5.2. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS su Hypoxia Inducibile Factor 1α (HIF-1α).....</i>	<i>126</i>
<i>3.5.3. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sull'organizzazione della rete mitocondriale.....</i>	<i>128</i>
<i>3.5.4. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sulla funzionalità energetica dei mitocondri.....</i>	<i>128</i>
<i>3.5.5. L'espressione prolungata della eNOS diminuisce la fosforilazione di Akt in risposta al siero.....</i>	<i>131</i>
<i>3.5.6. Effetto di concentrazioni nanomolari di DETA-NO sulla fosforilazione di Akt in risposta al siero.....</i>	<i>134</i>
<i>3.6. Analisi proteomica delle cellule esposte a NO basale</i>	<i>137</i>
4. DISCUSSIONE	
<i>4.1. L'esposizione cronica a basse concentrazioni di NO attenua la capacità migratoria di cellule HeLa ed endoteliali.....</i>	<i>146</i>
<i>4.2. Possibili meccanismi alla base dell'effetto del NO basale sulla migrazione.....</i>	<i>149</i>
<i>4.3 L'effetto bifasico del NO.....</i>	<i>152</i>
<i>4.4. Analisi del proteoma di cellule esposte cronicamente a NO basale.....</i>	<i>153</i>
<i>4.5. CONCLUSIONI.....</i>	<i>154</i>
PRODUZIONE SCIENTIFICA DEL LAVORO DI TESI	
BIBLIOGRAFIA	

RIASSUNTO

Il nitrossido (NO), prodotto nelle cellule endoteliali dall'enzima NO sintasi endoteliale (eNOS) è di fondamentale importanza nella fisiologia del sistema cardiovascolare non soltanto perché causa il rilassamento della muscolatura liscia vasale ma anche per i suoi effetti sulle cellule endoteliali stesse. In particolare, è ben conosciuto che la generazione di NO è richiesto per la risposta migratoria delle cellule endoteliali al *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e ad altri fattori motogeni; la chemiotassi delle cellule endoteliali verso questi fattori costituisce una componente essenziale del processo dell'angiogenesi. Tuttavia, il NO non è prodotto esclusivamente in risposta a un dato stimolo, ma vi è anche una produzione cronica di bassi livelli del gas, dovuta all'attività basale della eNOS. Mentre moltissimi studi sono stati eseguiti con lo scopo di comprendere gli effetti del NO prodotto acutamente in risposta a svariati stimoli, molto meno studiati sono gli effetti della produzione cronica basale di basse concentrazioni del gas sul fenotipo cellulare.

Lo scopo della mia tesi è stato di valutare gli effetti della esposizione cronica a bassi livelli di NO sulla migrazione chemiotattica e sul *signaling* che genera la risposta migratoria. A questo scopo, ho utilizzato come modello cellulare cloni HeLa-TetOff con espressione inducibile dell'enzima eNOS. A complemento di questi studi, ho condotto esperimenti su cellule HeLa non transfettate, che non esprimono eNOS endogena, trattate cronicamente con basse concentrazioni di un donatore lento di NO (DETA-NO) e su cellule endoteliali (HUVEC) trattate cronicamente con l'inibitore competitivo della eNOS L-NAME.

La migrazione delle cellule HeLa è stata analizzata in camerette di Boyden, utilizzando il siero bovino come sorgente di fattori motogeni. Inaspettamente, ho osservato che l'espressione della eNOS inibisce potentemente (>80%) la migrazione chemiotattica; l'effetto viene parzialmente bloccato dal trattamento cronico con l'L-NAME, e anche da un inibitore specifico (ODQ) dell'enzima guanilato ciclasi, effettore del NO. Coerentemente con l'effetto ottenuto con la espressione della eNOS, il pretrattamento cronico di cellule HeLa non transfettate con basse concentrazioni (10-100 nM) di DETA-NO ha inibito la migrazione eseguita in assenza del donatore. Un effetto simile è stato ottenuto mediante trattamento con un analogo del ciclico-GMP, mentre l'effetto del DETA-NO è stato bloccato dal trattamento con l'ODQ. Infine, cellule HUVEC, trattate cronicamente con L-NAME per 48 h e poi soggette a saggio di migrazione in assenza dell'inibitore, mostravano una capacità migratoria aumentata rispetto ai controlli non trattati, sia verso siero che verso VEGF. Così, in tre sistemi diversi ho dimostrato che il NO basale, a differenza di quello prodotto acutamente, abbassa la capacità migratoria delle cellule esposte al gas.

Per chiarire il meccanismo tramite il quale la esposizione cronica a bassi livelli di NO diminuisce la capacità migratoria delle cellule ho indagato l'effetto dell'espressione della eNOS: sulla adesione; su *Hypoxia inducible Factor 1 α* (HIF-1 α); sull'organizzazione della rete mitocondriale; sulla funzionalità energetica dei mitocondri; sulla attivazione della via PI3K/Akt in risposta al siero. Tra queste indagini solo l'ultima ha dato un risultato positivo.

Per valutare la responsività della via PI3K/Akt, ho mantenuto le cellule senza siero per tutta la notte, e ho poi esposto le cellule a siero per 15 minuti. Il rapporto tra Akt fosforilato (pAkt) e Akt totale è stato determinato prima e dopo l'aggiunta di siero ed è una misura della capacità delle cellule di attivare questa via di *signalling*. Ho osservato che le cellule indotte ad esprimere eNOS hanno una risposta Akt attenuata in confronto alle cellule che non sono indotte a esprimere l'enzima. Un risultato simile è stato osservato con cellule HeLa non transfettate esposte cronicamente a 0,1 μ M DETA-NO. Questi risultati suggeriscono che il NO basale porti a una desensitizzazione della via PI3K/Akt; poiché questa via è di fondamentale importanza per la risposta chemiotattica, la sua attenuazione potrebbe essere la causa della diminuita migrazione da me osservata in cellule che producono o che sono esposte cronicamente a basse concentrazioni di NO.

Per generare un quadro globale degli effetti della NO basale sul fenotipo cellulare, mi sono avvalsa di tecniche proteomiche. Ho analizzato mediante elettroforesi bi-dimensionale estratti ottenuti da cellule indotte o non-indotte ad esprimere la eNOS, e da cellule non transfettate, trattate o non trattate con DETA-NO. Ho identificato alcuni cambiamenti comuni alle cellule trattate con DETA-NO e a quelle che esprimono la eNOS ma al momento della stesura di questa tesi, gli *spot* individuati devono essere ancora identificati mediante spettrometria di massa.

In conclusione, i miei risultati hanno evidenziato un inatteso effetto inibitorio del NO basale sul fenotipo migratorio e sul PI3K/Akt *signalling* di cellule HeLa ed endoteliali, e illustrano come la quantità

e le modalità di rilascio del gas possano influenzare in modo drammatico la risposta della cellula.

ABBREVIAZIONI

ACh, acetilcolina
Akt, protein chinasi B
AMPK, proteina chinasi AMP-dipendente
ATP, adenosina-trifosfato
BAECs cellule endoteliali di aorta bovina
BH₄, la tetraidrobiopterina
Ca²⁺, calcio
Ca²⁺/CaM, complesso calcio/calmodulina
CaMKII, protein chinasi Ca²⁺/CaM-dipendente
cav-1, caveolina-1
cav-2, caveolina-2
cav-3, caveolina-3
CcO, citocromo c ossidasi
cellule eNOS-HeLa-TetOff, cellule HeLa-TetOff stabilmente transfette con eNOS bovina
cGMP, guanosin-monofosfato ciclico
CoCl₂, cloruro di cobalto
CsH, ciclosporina H
CTGF, *connective tissue growth factor*
Cys, cisteina
DETA-NO, 2,2'-(Hydroxynitrosohydrazino)bis-ethanamine
DETA-NO, donatore lento di NO
+dox, cellule eNOS-HeLa-TetOff non indotte ad esprimere la eNOS
-dox o +dox 0,05 ng/ml, cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte ad esprimere la eNOS
dox, doxiciclina
EDHF, *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*
eNOS, NO sintasi endoteliale
FAD, flavin adenina dinucleotide
FCCP, idrazone fenilico del cianuro di carbonile di p-trifluoromethossile
FGF, *fibroblast growth factor*
FMN, flavin mononucleotide
HDL, lipoproteine ad alta densità
HeLa-TetOff NT, HeLa-TetOff non transfettate
HGF, *Hepatocyte growth factor*
HIF, *Hypoxia Induced Factors*
Hsp90, *Heat shock protein 90*

HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
 IGF-1, fattore di crescita insulino-simile 1
 IL-8, interleuchina-8
 iNOS, NOS inducibile
 K⁺, potassio
 LDL, lipoproteine a bassa densità
 L-NAME, *N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester*
 Met, metionina
 MMP-13, metalloproteinasi
 mtNOS, NOS mitocondriale
 NADPH, nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto
 NF-κB, *Nuclear Factor-Kappa B*
 NMT, N-miristoil transferasi
 nNOS, NOS neuronale
 NO, nitrossido
 NO₂, diossido di azoto
 NOS, ossido nitrico sintasi
 NOSIP, *eNOS-Interacting Protein*
 NOSTRIN, *eNOS TRafficking INducer*
 N-WASP, *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*
 O₂⁻, anione superossido
 O₂, ossigeno
 ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one
 ONOO⁻, perossinitrito
 PAEC, *pulmonary artery endothelial cells*
 PDGF, *platelet derived-growth factor*
 PEDF, *pigment epithelium-derived growth factor*
 PI3K, *Phosphatidylinositol 3'-kinase*
 PKA, proteina chinasi A
 PKC, proteina chinasi C
 PKG, proteina-chinasi G
 PP1, proteina fosfatasi 1
 PP2A, fosfatasi 2
 PP2A, proteina fosfatasi 2
 PP2B, calcineurina
 RNS, specie reattive dell'ossido nitrico
 ROS, specie reattive dell'ossigeno
 S1P, sfingosina 1-fosfato
 Ser, serina
 sGC, guanilato ciclasi solubile

siRNA, short interfering RNA
TGF- β 1, fattore di crescita trasformante- β 1
TGF- α , *transforming growth factor alpha*
TMRM, *TetraMethyl Rhodamine Methylester*
TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*
TSP-1, la trombospodina
Tyr, tirosina
VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR1 o FLT1, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*
VEGFR2 o KDR *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*
Zn²⁺, ione zinco
PLC γ , fosfolipasi C γ
FAK, *Focal adhesion kinase*

1. INTRODUZIONE

1.1. IL NITROSSIDO (NO)

Il NO è una molecola ad elevata reattività che, pur essendo potenzialmente tossica, è implicata in una vasta gamma di processi fisiologici. Scoperto inizialmente per la sua proprietà di potente vasodilatatore, è stato successivamente implicato in un grande numero di fenomeni fisiologici e patologici (Moncada et al., 1991).

Il NO ha una funzione importante già all'inizio della vita, quando la sua produzione nei gameti maschili è richiesta per l'attivazione delle uova immediatamente dopo la fecondazione (Kuo et al., 2000). Nell'adulto le funzioni del NO sono molteplici e dipendono dall'organismo considerato e dal tipo di cellula in cui viene prodotto. Esso è il più importante vasodilatatore endogeno. Quando la pressione arteriosa aumenta eccessivamente, l'organismo si difende sintetizzando NO che, dilatando le pareti dei vasi, contribuisce all'abbassamento della pressione. Al contrario, l'inibizione della sintesi del NO determina un aumento delle resistenze periferiche ed un conseguente innalzamento della pressione arteriosa. Esso è anche responsabile della permeabilità vasale; inoltre protegge l'endotelio da fattori aterogeni inibendo l'aggregazione piastrinica e l'adesione delle piastrine e dei monociti circolanti. Il NO gioca importanti ruoli anche all'interno delle cellule endoteliali stesse, regolando l'apoptosi, la crescita cellulare, l'angiogenesi e in particolar modo la migrazione (Murohara et al., 1998; Dimmeler et al., 2000).

Oltre ai suoi molteplici ruoli nel sistema circolatorio, il NO è parte integrante della risposta infiammatoria e nel sistema nervoso centrale ha un ruolo fondamentale come neuromodulatore (Moncada et al., 1991; Duda et al., 2004; Belvisi et al., 1991; Gibbs, 2003).

La poliedricità del NO nella modulazione di diversi processi fisiologici e patologici deriva fundamentalmente dalla sua complessa chimica. Il NO è una molecola che presenta un elettrone spaiato nel suo orbitale $2p-\pi$ (NO^\cdot) (Marletta et al., 1990) e può quindi trasformarsi, attraverso la rimozione o l'aggiunta di un elettrone in: NO^+ (catione nitroso), NO^- (anione nitrossido).

Molte delle azioni biologiche attivate dal NO dipendono dalla sua capacità di reagire con metalli di transizione o di modificare residui amminoacidici delle proteine. Alcune di queste modificazioni (nitrazione della tirosina (Tyr), ossidazione della metionina (Met)) sono irreversibili e potenzialmente dannose; altre invece, come la S-nitrosilazione di residui cisteinici (Cys) o la nitrosilazione del gruppo eme, sono reversibili e possono regolare finemente l'attività delle proteine.

I meccanismi molecolari attraverso cui il NO esercita le sue funzioni possono essere così riassunti (Fig. 1):

Attivazione della guanilato ciclasi: Il NO attraverso la nitrosilazione del gruppo eme della guanilato ciclasi solubile (sGC) ne stimola l'attività, regolando così una varietà di importanti risposte fisiologiche, tra cui la proliferazione e il differenziamento di numerosi tipi cellulari e il rilassamento della muscolatura vasale. La sGC è una proteina eterodimerica costituita da una subunità α e una β , contenente un gruppo eme in grado di legarsi al NO, formando un complesso Fe-NO (Fig. 2). La formazione di tale complesso induce un cambiamento conformazionale dell'enzima tale da attivarlo e portare all'accumulo del guanosin-monofosfato ciclico (cGMP), un noto secondo messaggero in grado di stimolare la protein-chinasi G (PKG) ed i

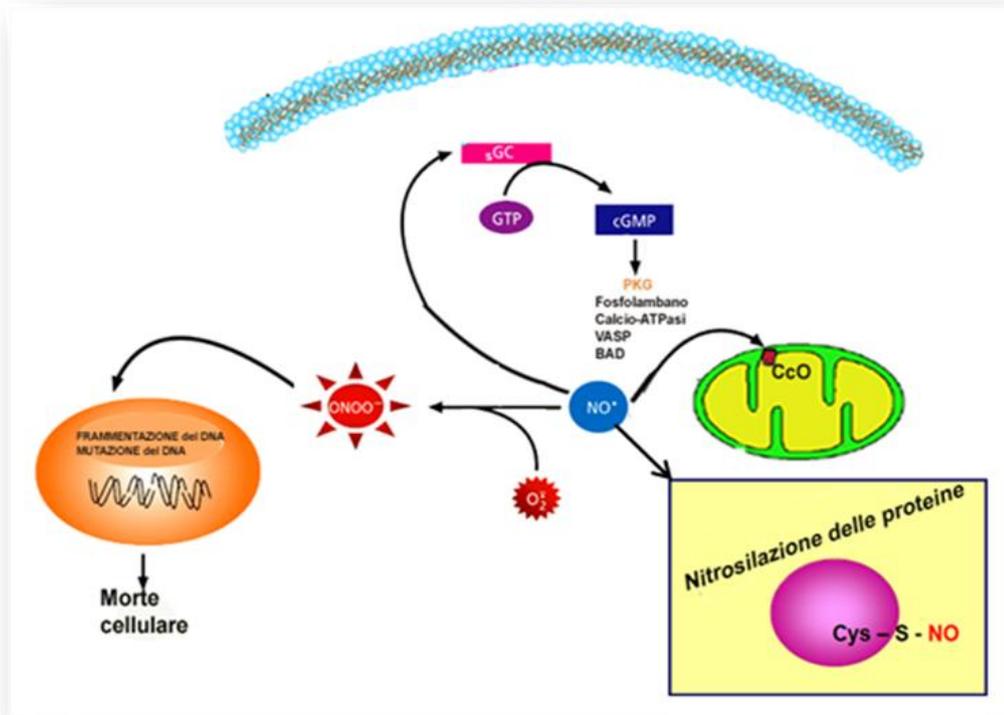


Figura 1. Meccanismi molecolari di segnalazione del NO. Il NO regola l'attività di alcune emoproteine come la guanilato ciclasti solubile (sGC) e la citocromo c ossidasi (CcO). Interagisce con l'anione superossido (O_2^-) generando perossinitriti ($ONOO^-$), reazione molto importante nell'induzione del danno e della morte cellulare. Nitrosila i residui di cisteina di varie proteine bersaglio regolandone l'attività.

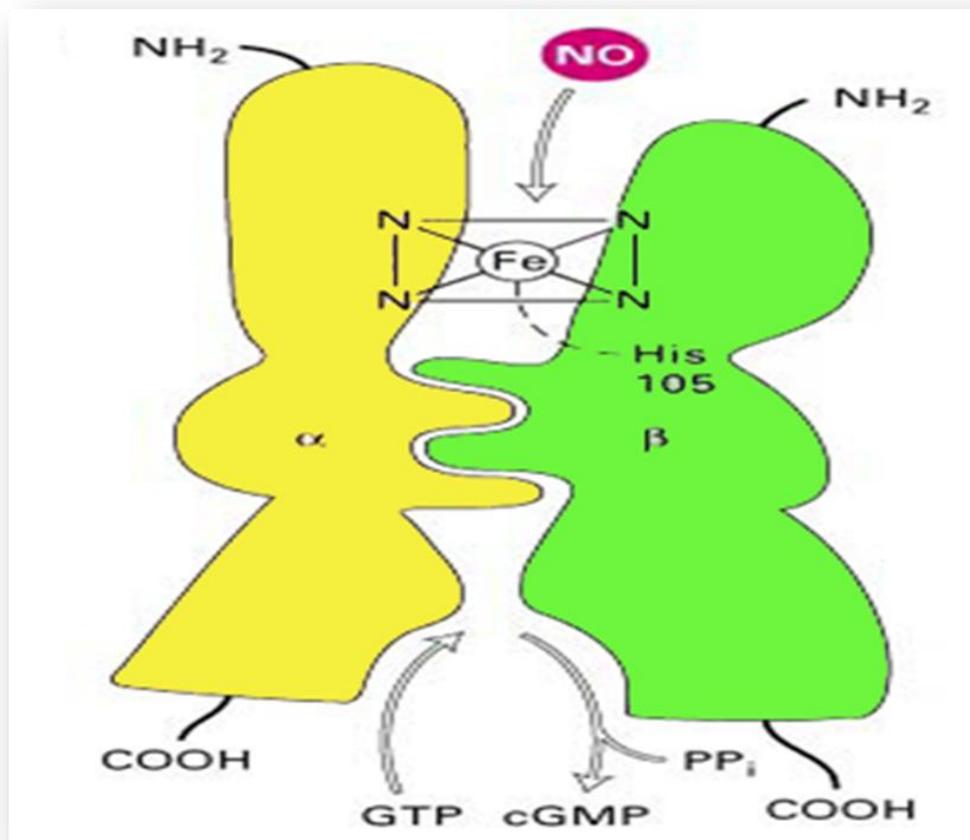


Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura della guanilato ciclasi solubile. Il legame del NO con lo ione Fe^{2+} dell'eme determina una modificazione conformazionale dell'enzima che in tal modo si attiva e catalizza la sintesi di cGMP.

canali ionici cGMP-dipendenti, coinvolti nel rilassamento muscolare (Lincoln et al., 1994).

La modulazione dell'attività della sGC ha una importante ripercussione sul consumo di ossigeno (O_2) a livello dei mitocondri. La citocromo c ossidasi (CcO o complesso IV nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale) è il sito primario di consumo di O_2 cellulare e, come tale, è fondamentale per la fosforilazione ossidativa e per la produzione di adenosina-trifosfato (ATP). Il NO modula l'attività della CcO in funzione della concentrazione intracellulare di O_2 e del conseguente stato redox dell'enzima (Fig. 3). Quando le concentrazioni di O_2 sono elevate, la CcO è prevalentemente in uno stato ossidato, consuma O_2 e metabolizza il NO convertendolo in nitriti. Quando le concentrazioni di O_2 diminuiscono, la CcO è in uno stato ridotto, il NO non viene metabolizzato, quindi la sua concentrazione aumenta ed aumentano le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Studi recenti hanno mostrato che, quando la concentrazione di O_2 è molto bassa, il NO attiva la guanilato ciclasi, la quale una volta attiva induce vasodilatazione con conseguente apporto di O_2 (Palacios et al., 2007) (Fig. 3). Quindi il NO agisce come un regolatore della respirazione e in condizione di ipossia attiva meccanismi di protezione (Taylor and Moncada 2010).

-Modulazione dell'attività della citocromo ossidasi: Come appena descritto, la CcO è in grado di modulare le concentrazioni intracellulari di NO. Viceversa, il NO è in grado di modulare l'attività della CcO. Infatti il messaggero gassoso lega questo enzima in modo reversibile, occupando lo stesso sito di legame riconosciuto dall'ossigeno. Tale legame inibisce la funzionalità della CcO

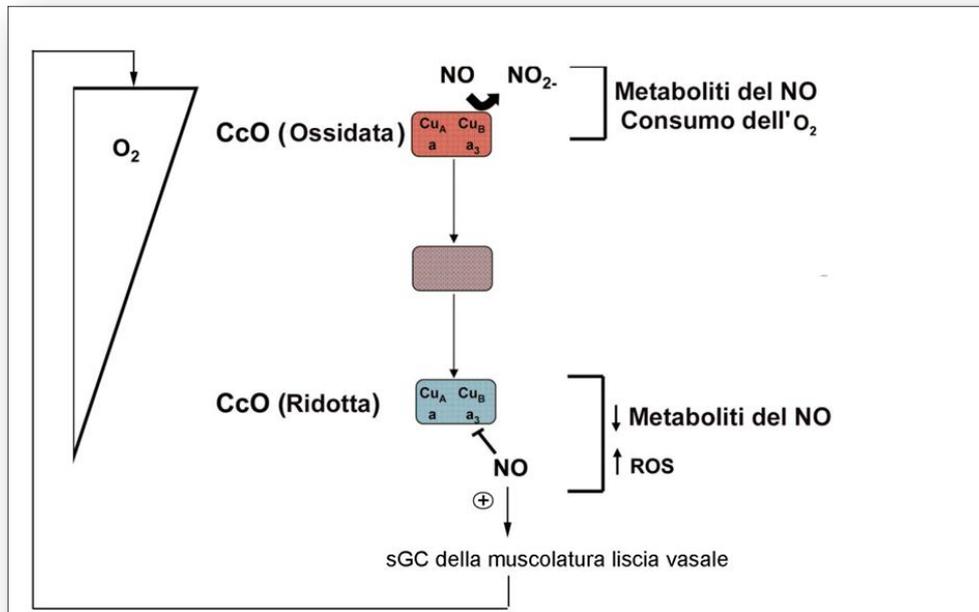


Figura 3. Modulazione dell'attività della citocromo c ossidasi. In presenza di elevate $[O_2]$ la CcO, è prevalentemente in uno stato ossidato, consuma O_2 e metabolizza il NO convertendolo in nitriti. Quando, la $[O_2]$ diminuisce, la CcO è in uno stato ridotto, il NO non viene metabolizzato, quindi la sua concentrazione aumenta ed aumentano le ROS. Si veda il testo per ulteriori dettagli. (Modificata da Taylor and Moncada 2010).

determinando un rallentamento della respirazione (Clementi et al., 1999).

-Nitrazione ed S-Nitrosilazione: La nitrazione della tirosina è una modificazione irreversibile e spesso dannosa riscontrata in alcune malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, di Parkinson (Ebadi et al., 2005) ed in patologie cardiovascolari (Turko and Murad, 2002). In due studi interessanti è stata dimostrata un'azione fisiologica della nitrazione a livello della matrice extracellulare: la nitrazione della Tyr 388 della metalloproteinasi MMP-13 causa l'attivazione di questa proteasi, con conseguente degradazione di proteine della matrice extracellulare ed aumento della migrazione di cellule endoteliali e della guarigione da ferite (Lopez Rivera et al., 2005; Lizarbe et al., 2008).

Come già accennato, a differenza della nitrazione la nitrosilazione è una modifica reversibile, e notevole importanza è attribuita alla capacità del NO di nitrosilare il gruppo eme di svariate proteine; l'esempio meglio caratterizzato è quello della guanilato ciclasi che comporta l'attivazione enzimatica con conseguente aumento del cGMP. La regolazione dei livelli del cGMP è responsabile di molte delle risposte NO-dipendenti, tuttavia molti studi hanno focalizzato l'attenzione anche sulle modifiche post-traduzionali indotte dal NO mediante nitrosilazione dei residui cisteinici (S-nitrosilazione). Tramite tale reazione il NO regola l'attività di moltissime molecole: enzimi metabolici, proteine chinasi e fosfatasi, recettori e canali ionici di membrana, proteine del citoscheletro, fattori di trascrizione e molti altri (Hess et al., 2005).

-Azioni tossiche per interazione del NO con l'anione superossido (O_2^-): a causa dell'alta reattività del NO, molte delle reazioni in cui esso è coinvolto dipendono dalla sua concentrazione locale, dallo stato ossidativo cellulare e dalla disponibilità delle molecole bersaglio. Il NO può reagire rapidamente con l' O_2^- formando specie reattive dell'ossido nitrico (RNS), fra i quali il perossinitrito ($ONOO^-$) (Moreno and Pryor, 1992; Pacher et al., 2007) ed il diossido di azoto (NO_2). Le RNS, allo stesso modo delle ROS, possono reagire con tutte le biomolecole: il DNA, i gruppi tiolici degli aminoacidi ed i metalli portando all'ossidazione e alla nitrificazione. Se prodotto ad elevate concentrazioni (dell'ordine di 1-3 μM) il NO, con i suoi derivati, può avere effetti deleteri per tutte le funzioni cellulari portando, per esempio, alla perdita di funzioni enzimatiche, all'alterazione dell'integrità di membrana ed a mutazioni del DNA (Fabbri et al., 2005).

1.2. Enzimi che sintetizzano il NO: nitrossido sintasi (NOS)

La famiglia delle ossido nitrico sintasi (NOS) è costituita da tre isoforme, clonate e purificate tra il 1991 e il 1994.

Le tre isoforme umane della NOS sono prodotte da tre geni distinti (Tabella 1); si distinguono sia per localizzazione intracellulare che per regolazione; inoltre presentano diverse proprietà catalitiche e diversa sensibilità agli inibitori. Sono comunemente chiamate (Alderton, 2001):

- 1) NOS neuronale (nNOS, nota anche come NOS-I o NOS-

- 1), identificata per prima ed espressa nelle cellule del sistema nervoso centrale e periferico;
- 2) NOS inducibile (iNOS, nota anche come NOS-II o NOS-2), è l'isoforma la cui espressione è inducibile in una vasta gamma di cellule e tessuti;
- 3) NOS endoteliale (eNOS, nota anche NOS-III o NOS-3), identificata per la prima volta nelle cellule dell'endotelio vascolare, ma presente anche in molti altri tipi cellulari.

<i>Isoforme umane della NOS</i>	<i>Dimensione e struttura gene</i>	<i>Localizzazione cromosomiale</i>	<i>Numero di amminoacidi e dimensioni</i>
nNOS (NOS-1)	29 esoni, 28 introni, 200 kpb	12q24.2-12q24.3 del cromosoma 12	1434 aa, 161 kDa
iNOS (NOS-2)	26 esoni, 25 introni, 37 kpb	17cen-q11.2 del cromosoma 17	1153 aa, 131 kDa
eNOS (NOS-3)	26 esoni, 25 introni, 21-22 kpb	17cen-q11.2 del cromosoma 7	1203 aa, 133 kDa

Tabella 1 (Alderton, 2001).

In passato queste isoforme sono state anche distinte sulla base della loro espressione costitutiva (nNOS, eNOS) o inducibile (iNOS) e della loro calcio (Ca^{2+})-dipendenza (eNOS, nNOS) o (Ca^{2+})-indipendenza (iNOS). Inoltre per ciascuna isoforma, sono state identificate anche delle varianti di *splicing* e non si può escludere che in futuro potranno essere identificati altri prodotti genici che estenderanno ulteriormente questa famiglia di proteine.

Oltre alle tre canoniche forme di NOS, esiste anche un'altra isoforma dell'enzima denominata NOS mitocondriale (mtNOS), presente all'interno dei mitocondri ed espressa costitutivamente (Ghafourifar and Richter, 1997; Ghafourifar and Cadenas, 2005; Kanai et al., 2001; Carreras and Poderoso, 2007). Recenti studi hanno

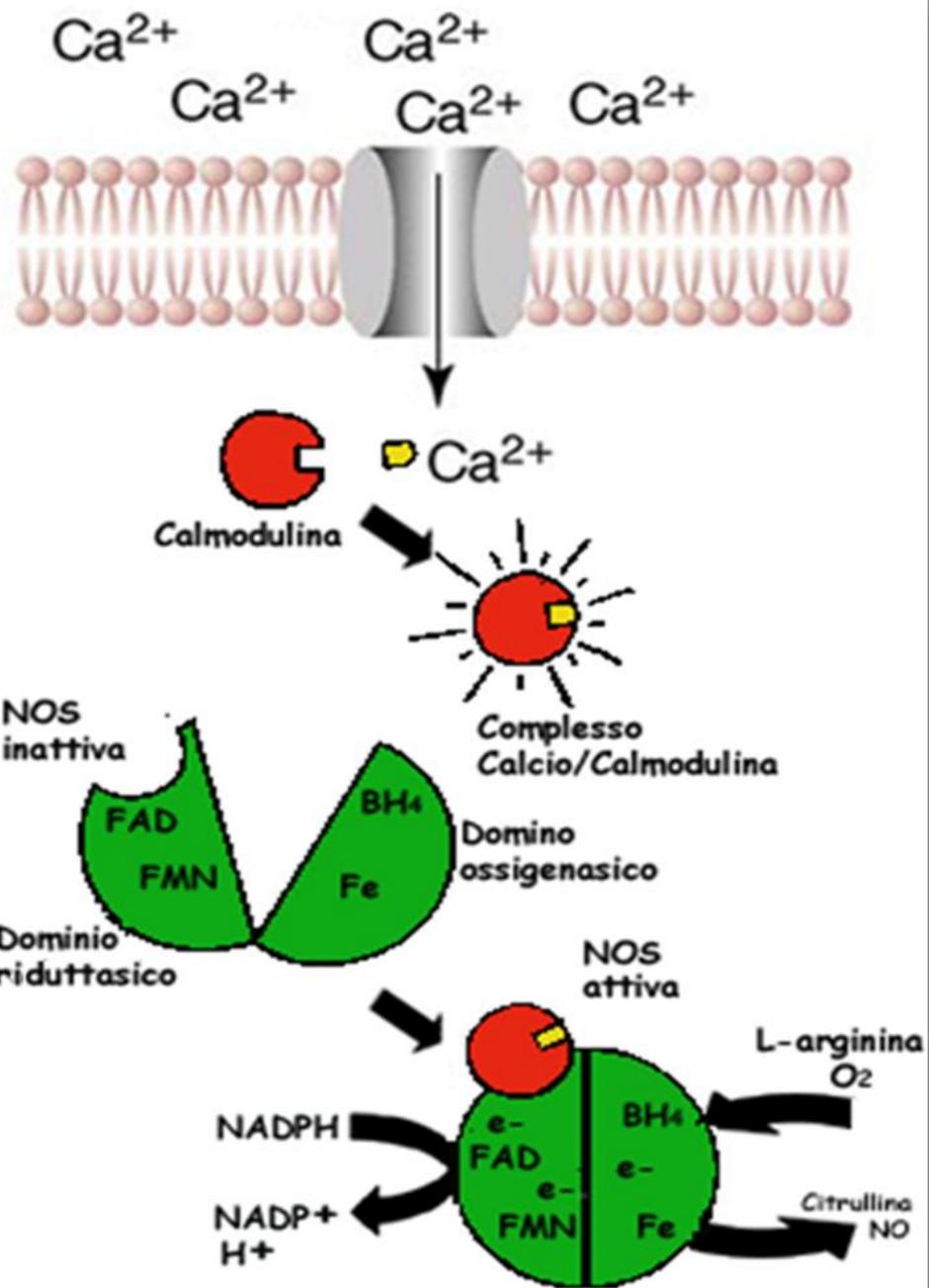
dimostrato che la mtNOS è l'isoforma nNOS che ha subito alcune modificazioni post-traduzionali quali la fosforilazione nel residuo di serina in posizione 1412 (Ser1412) e una miristoilazione insolita su un residuo interno della proteina (Carreras et al., 2007).

1.2.1. Struttura e meccanismo catalitico della NOS

Tutte le isoforme della NOS presentano una struttura costituita da due domini. Il dominio ossigenasico all'NH₂-terminale contiene i siti di legame per l'eme, la tetraidrobiopterina (BH₄) e l'L-arginina, ed è connesso al dominio riduttasico, COOH-terminale, dalla regione deputata al riconoscimento del complesso calcio/calmodulina (Ca²⁺/CaM). Il dominio riduttasico contiene i siti di legame per il flavin adenina dinucleotide (FAD), il flavin mononucleotide (FMN) ed il nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH). Quando le concentrazioni di Ca²⁺ intracellulari aumentano, il Ca²⁺ si lega alla CaM formando il complesso Ca²⁺/CaM che interagisce con il dominio riduttasico della NOS. In seguito a tale legame, i due domini dell'enzima interagiscono e si allineano. Quindi gli elettroni, donati dal NADPH al dominio riduttasico mediante la via FAD-FMN, passano al dominio ossigenasico ed interagiscono con l'eme e il cofattore BH₄ per catalizzare la reazione che genera citrullina e NO a partire dalla L-arginina (Fig. 4 e 5).

Le NOS sono enzimi comunemente considerati dimerici ma non è ben chiaro se la dimerizzazione oltre a rendere stabile la struttura sia necessaria per la loro attività (Xie et al., 1996; Li et al., 1999;

Figura 4. Rappresentazione della regolazione della NOS mediante il complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Quando le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulari aumentano, il Ca^{2+} si lega alla CaM formando il complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ che interagisce con il dominio riduttasico della NOS. In seguito a tale legame, i due domini dell'enzima interagiscono e si allineano. Quindi gli elettroni, donati dal NADPH al dominio riduttasico, mediante la via FAD-FMN passano al dominio ossigenasico ed interagiscono con l'eme e il cofattore BH_4 per catalizzare la reazione che genera citrullina e NO a partire dalla L-arginina.



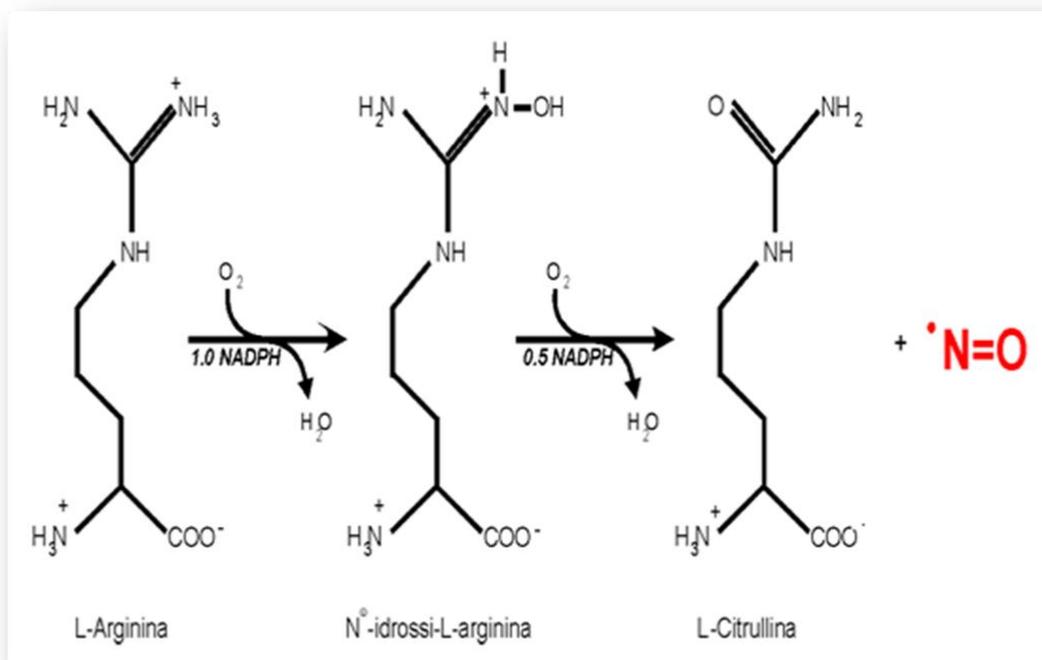


Figura 5. Schema della reazione di ossidazione catalizzata dalle NOS. La NOS usa O₂ che viene ridotto dagli elettroni forniti dal donatore NADPH e dal substrato. La sintesi di NO si articola in due successive ossidazioni. Nel primo passaggio si ha la formazione dell'intermedio stabile N-idrossi-L-arginina attraverso l'ossidazione di 1.0 equivalente di NADPH; nel secondo passaggio viene prodotto L-citrullina e NO attraverso l'utilizzo di 0.5 equivalenti di NADPH.

Hemmens et al., 2000). Alcuni autori hanno concluso che il trasferimento degli elettroni avvenga dal dominio riduttasico di un monomero al dominio ossigenasico del *partner* e che questo trasferimento trasversale sia necessario per l'attività (Erwin et al., 2006). Altri studi, invece non confermano tale ipotesi (Klatt et al., 1995; Hemmens et al., 2000). L'interfaccia di associazione di due monomeri coinvolge il dominio ossigenasico ed include il sito di legame per la BH₄: questa favorisce la formazione della tasca del sito attivo contenente l'eme e l'L-arginina, ed include due residui di cisteina (Cisteina 94 e Cisteina 99) per monomero che sono responsabili del legame di uno ione zinco (Zn²⁺) ai due monomeri stessi (Fig. 6).

La reazione di ossidazione della NOS, inoltre, può generare O₂⁻ invece che NO quando l'accettore finale degli elettroni non è l'arginina ma l'O₂. Tale processo, noto come “reazione non accoppiata” della NOS, è mediato dal gruppo eme del dominio ossigenasico (Stroes et al., 1998) e dipende dalle concentrazioni del substrato arginina e dal cofattore BH₄ (Vasquez-Vivar et al., 1998; Wever et al., 1997). In presenza di entrambi la NOS produce NO; quando la concentrazione di uno dei due elementi è relativamente bassa, l'enzima genera l'anione O₂⁻.

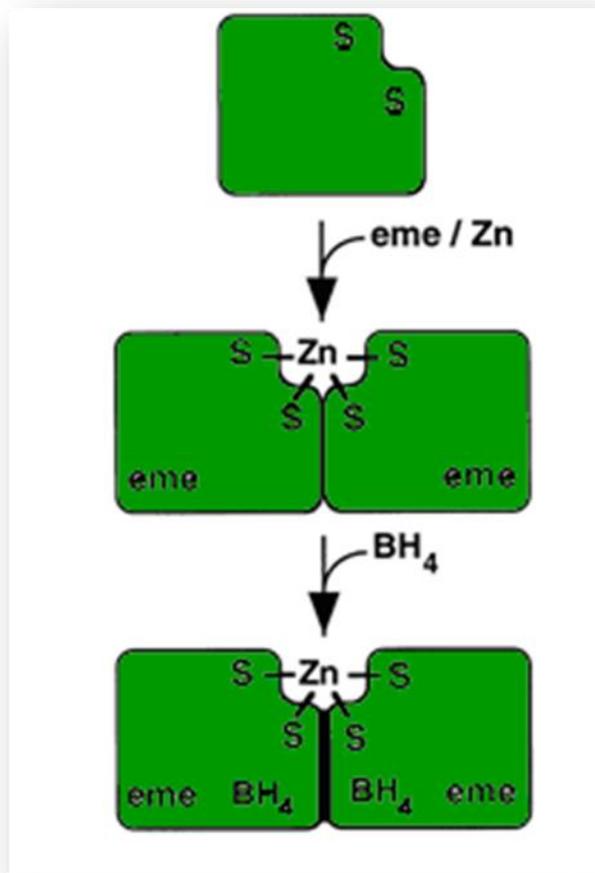


Figura 6. Dimerizzazione della NOS. I due monomeri che costituiscono l'enzima, presentano due residui di Cisteina (S) in posizione 94 e 99. Lo ione Zn^{2+} si lega ai residui di cisteina favorendo la dimerizzazione della NOS.

1.3. La NOS endoteliale (eNOS)

1.3.1. Generalità

La eNOS, espressa soprattutto nelle cellule endoteliali, nei miociti e nelle piastrine, è essenziale per la regolazione del tono vascolare (Ignarro, 1989). Essa gioca un ruolo chiave nella regolazione della fisiologia cardiovascolare (Dudzinski et al., 2006), nell'aggregazione piastrinica (Radomski et al., 1987), nell'adesione delle piastrine e dei leucociti all'endotelio (Kubes et al., 1991; Radomski et al., 1987), nella proliferazione delle cellule muscolari (Garg and Hassid, 1989), nell'apoptosi delle cellule endoteliali (Hoffmann et al., 2001), nell'angiogenesi (Papapetropoulos et al., 1997) e nell'infiammazione acuta durante lo stravaso (Cirino et al., 2003). E' stato documentato che la eNOS è espressa anche in altri tipi cellulari tra cui i mastociti, le cellule dell'epitelio renale, gli eritrociti ed i leucociti T e B (de Frutos et al., 2001; Lowenstein and Michel, 2006).

Dal momento che la produzione del NO deve essere attentamente controllata per rispondere ai diversi stimoli fisio-patologici, la eNOS è un enzima che è soggetto ad una serie di meccanismi di controllo che ne regolano finemente l'attività (Dudzinski and Michel, 2007).

1.3.2. Gene della eNOS: regolazioni trascrizionali e post trascrizionali

Il gene umano della eNOS contiene 26 esoni e 25 introni ed è localizzato sul cromosoma 7. La lunghezza dell'intera sequenza di lettura è 3609 bp, codificante per una proteina di circa 133 kDa.

Studi *in vivo* hanno dimostrato che la produzione della eNOS è fondamentale per la normale fisiologia endoteliale e che la sua espressione è soggetta a svariati meccanismi di controllo che comprendono la regolazione della trascrizione del gene eNOS ed alcune modificazioni post-trascrizionali (Searles, 2006).

In cellule endoteliali in coltura è stato dimostrato che stimoli quali lo *shear stress*, il fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1) (Saura et al., 2002), la ciclosporina A (Lopez-Ongil et al., 1996), la lisofosfatidilcolina (Cieslik et al., 1998), l'acido linoleico ossidato, le statine (Hernández-Perera et al., 1998; Sen-Banerjee et al., 2005) e le ROS (Zhen et al., 2008) aumentano i livelli di mRNA della eNOS. Al contrario, il fattore di necrosi tumorale *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) (Anderson et al., 2004), l'ipossia (Arnet et al., 1996), i lipopolisaccaridi, la trombina e le lipoproteine a bassa densità ossidate (LDL) (Liao et al., 1995) possono ridurre tali livelli.

Lo *shear stress* è uno dei più importanti fattori di regolazione della trascrizione dell'mRNA della eNOS: cellule in coltura (Uematsu et al., 1995, Topper et al., 1996; Weber et al., 2005) o animali da laboratorio (Sessa et al., 1994; Nadaud et al., 1996; Mattsson et al., 1997) sottoposti a stimoli che riproducono stress da stiramento presentano i livelli di tale mRNA aumentati. Alcuni autori (Davis et al., 2001) hanno proposto che tale aumento potrebbe essere attribuito a

due meccanismi distinti: un'attivazione transitoria della trascrizione del gene della eNOS seguita da una prolungata stabilizzazione dell'mRNA. È stato dimostrato che lo *shear stress* induce il legame del fattore trascrizionale *Nuclear Factor-Kappa B* (NF-κB) al promotore del gene della eNOS con conseguente attivazione della trascrizione, aumento dei livelli della proteina eNOS e successivo aumento della produzione di NO (Grumbach et al., 2005). Secondo questi autori, inoltre, il NO finisce per nitrosilare la subunità p50 di NF-κB inattivandolo e quindi chiudendo un'ansa di feedback negativo con blocco della via di regolazione indotta dallo *shear stress*.

Nelle condizioni in cui è stato osservato un aumento dell'mRNA della eNOS è stato rivelato anche un aumento della produzione di NO di circa due-tre volte. Anche se questo livello di modulazione può sembrare modesto, bisogna sottolineare che piccole variazioni dei livelli del NO possono determinare effetti fisiologici significativi. Per esempio, nel caso del rilassamento vascolare, la risposta al NO è dose dipendente; incrementi minuscoli delle concentrazioni del NO possono provocare grandi cambiamenti del tono vascolare (Myers et al., 1990; Sellke et al., 1990).

Oltre alla regolazione a livello trascrizionale, anche i controlli post-trascrizionali sono importanti; questo perché l'emivita dell'mRNA della eNOS è lunga, (10-35 h), e la sintesi della proteina può avvenire anche dopo che la trascrizione del gene è repressa. Le modifiche post-trascrizionali sono in gran parte mediate da elementi *cis-acting* RNA che si localizzano nelle regioni 5' e 3' non tradotte (*UnTranslated Regions*) dell'mRNA (5' e 3'-UTRs) (Grzybowska et al., 2001; Pesole et al., 2001).

1.3.3. Regolazione dell'attività della eNOS.

Una volta sintetizzata, l'eNOS è soggetta a regolazione per modificazioni post-traduzionali quali l'acilazione, la fosforilazione e la nitrosilazione (Fleming and Busse, 2003). La sua localizzazione sub-cellulare e l'attività biologica sono regolate anche mediante l'associazione reversibile con numerose proteine regolatrici quali la CaM, la caveolina-1, NOSIP, NOSTRIN, Hsp90 ed altre.

I vari meccanismi di controllo non si escludono a vicenda, bensì sono strettamente correlati nel mantenere una corretta organizzazione spaziale e temporale del *signalling* della eNOS.

1.3.3.1. Miristoilazione e palmitoilazione

Delle tre isoforme la eNOS è l'unica a subire la N-miristoilazione e la S-palmitoilazione, modificazioni covalenti che ne favoriscono l'attività enzimatica promuovendo la sua localizzazione al complesso del Golgi e alla membrana plasmatica (Dudzinski and Michel, 2007).

La eNOS, a differenza delle altre due isoforme, presenta all'NH₂-terminale una sequenza consenso per la miristoilazione (Pollock et al., 1992; Liu and Sessa, 1994). La miristoilazione è una modificazione irreversibile; è un processo co-traduzionale catalizzato dall'enzima N-miristoil transferasi (NMT), che trasferisce il miristato dal miristoil-CoA al peptide nascente (Resh, 1999). Il peptide, per poter essere miristoilato, deve avere all'NH₂-terminale, una precisa sequenza consenso: Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr. Mentre la glicina in

posizione 2 è assolutamente obbligatoria, la serina o la treonina in posizione 6 facilitano la miristoilazione, ma la loro presenza non è strettamente richiesta. Dopo rimozione della metionina NH₂-terminale da parte di una aminopeptidasi, l'acido miristico viene legato mediante legame ammidico al gruppo α -amminico della glicina. Una mutazione nella sequenza di miristoilazione (glicina ad alanina in posizione 2: G2A) rende l'eNOS solubile, dimostrando che la miristoilazione è necessaria per la sua associazione alle membrane (Busconi and Michel, 1993; Liu and Sessa, 1994).

La eNOS, oltre ad essere miristoilata, lega un altro acido grasso, l'acido palmitico. I siti che vanno incontro al processo di palmitoilazione, tramite legame tioestere, sono due residui di cisteina in posizione 15 e 26 (Liu et al., 1995); tale modificazione, post-traduzionale e reversibile, avviene solo se l'enzima è associato alla membrana (Liu et al., 1995; Robinson et al., 1995). Per chiarire l'importanza delle modificazioni lipidiche in relazione alla sua localizzazione cellulare, sono state costruite delle proteine di fusione eNOS-Green Fluorescent Protein (GFP), ed è stata studiata la loro localizzazione tramite microscopia a fluorescenza (Liu et al., 1997; Sowa et al., 1999). La eNOS non miristoilata (mutante myr⁻), risulta anche non palmitoilata e presenta una distribuzione citosolica diffusa, per cui la miristoilazione è necessaria per la palmitoilazione. Si ritiene, quindi che la miristoilazione sia richiesta per un'associazione transitoria della eNOS alle membrane e che la successiva palmitoilazione renda tale associazione stabile e duratura. Inoltre, chimere costituite dal mutante G2A non miristoilabile legato ad un dominio transmembrana (glicoproteina CD8), possono subire la

palmitoilazione in quanto legate alla membrana, suggerendo che è la localizzazione alla membrana, piuttosto che la miristoilazione a supportare la palmitoilazione (Prabhakar et al., 2000).

Secondo un gruppo di ricercatori, la quantità della eNOS presente sulla membrana plasmatica dipende da continui cicli di palmitoilazione-depalmitoilazione che corrispondono ad una continua traslocazione dell'enzima tra il Golgi e la membrana plasmatica (Garcia-Cardena et al., 1996). Un simile ciclo di acilazione è stato descritto per l'oncogene Ras (Rocks et al., 2005). Sia per la eNOS che per Ras, questo ciclo comprende due tipi di modificazioni, ovvero un'acilazione irreversibile (la miristoilazione della eNOS e la farnesilazione di Ras), e la palmitoilazione reversibile. Agonisti come la bradichinina o la ionomicina attivano la eNOS promuovendo la depalmitoilazione e causando la traslocazione della eNOS dalla membrana plasmatica al citosol (Michel et al., 1997). Il rapido turnover del palmitico legato alla eNOS (45min), rispetto al miristico (18h), suggerisce che il ciclo palmitoilazione-depalmitoilazione possa regolare la quantità di enzima presente sulla membrana plasmatica (Garcia-Cardena et al., 1996).

Mediante esperimenti di *knockdown* dell'enzima palmitoiltransferasi (DHHC21) mediante *short interfering* RNA (siRNA), è stato possibile ottenere una ridotta palmitoilazione della eNOS, con conseguente modifica della sua localizzazione e riduzione del rilascio di NO dopo stimolazione degli agonisti (Fernandez-Hernando et al., 2006). Questo studio dimostra ancora una volta come la localizzazione subcellulare della eNOS sia strettamente correlata con la sua attività.

1.3.3.2. Fosforilazione

La fosforilazione della eNOS, mediata da proteine chinasi di varie vie di segnalazione, è un processo fondamentale nella regolazione della sua attività. Esso si verifica in risposta ad un'ampia gamma di stimoli quali: fattori meccanici (*shear stress*), umorali [fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), bradichinina, insulina, estrogeni, sfingosina 1-fosfato (S1P)] e farmacologici (statine) (Montagnani et al., 2001; Harris et al., 2001; Igarashi et al., 2001; Boo et al., 2002a e b; Harris et al., 2004; Guo et al., 2005) (Fig. 7).

Nell'enzima sono stati identificati sei siti specifici che possono subire fosforilazione (Fig. 7): Tyr-81, Ser-114, Thr-495, Ser-615, Ser-633 e Ser-1177 (nella sequenza umana, equivalenti a Tyr-83, Ser-116, Thr-497, Ser-617, Ser-635 e Ser-1179 nella sequenza bovina) (Fleming e Busse, 2003; Sessa, 2004; Fulton et al., 2005). La fosforilazione di questi siti aumenta (Ser-1177, Ser-633 e Ser-615) o diminuisce (Thr-495 e Ser-611) l'attività dell'enzima.

Il sito di fosforilazione della eNOS più importante, e meglio caratterizzato, è quello della Ser-1177, sito che si trova nel dominio riduttasico a livello del COOH-terminale (Fig. 7). Il più importante stimolo fisiologico per la fosforilazione di tale sito è lo *shear stress*. Lo *shear stress*, così come alcuni ormoni e fattori di crescita [il VEGF, il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), le statine e gli estrogeni], attivano la fosforilazione in questo sito dereprimendo il *loop* autoinibitorio presente al dominio COOH-terminale dell'enzima, riducendo la dissociazione del complesso Ca^{2+}/CaM dalla eNOS e facilitando il trasferimento degli elettroni dal dominio reduttasico al

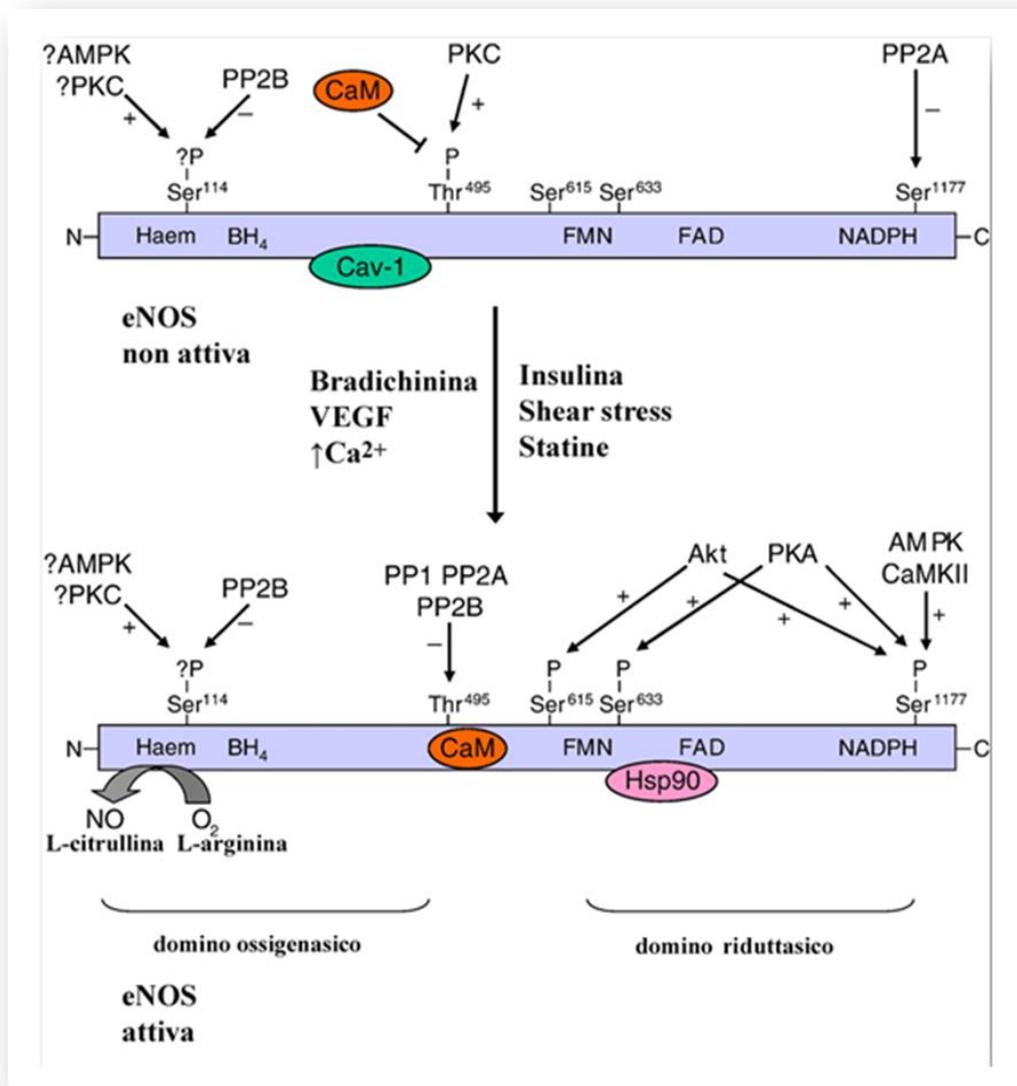


Figura 7. Regolazione dell'attività della eNOS mediata da chinasi e fosfatasi. L'attività della eNOS è coordinata da eventi di fosforilazione e defosforilazione, mediati da numerose protein chinasi e fosfatasi. Con il simbolo + è indicata la fosforilazione mediata dalle chinasi, con il simbolo - è indicata la defosforilazione mediata dalle fosfatasi. La figura illustra anche come eventi di fosforilazione/defosforilazione sono coordinati con il legame di proteine regolatorie attivanti (CaM e Hsp90) ed inattivanti (caveolina). (Modificata da Mount et al., 2007).

dominio ossigenasico (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999; McCabe et al., 2000; Bauer et al., 2003). La mutazione della Ser-1177 con un'alanina (S1177A) impedisce la fosforilazione e di conseguenza la produzione basale e quella indotta del NO; al contrario, la sostituzione della serina con un aspartato (S1177D) genera un enzima costitutivamente attivo (Bauer et al., 2003).

Numerose proteine chinasi, tra cui Akt (Protein chinasi B), la proteina chinasi A (PKA), la proteina chinasi AMP-dipendente (AMPK), la protein chinasi Ca^{2+} /CaM-dipendente (CaMKII), la protein-chinasi cGMP-dipendente (PKG), e fosfatasi, tra cui la protein fosfatasi 2 (PP2A), attivate da diversi stimoli, sono implicate nella regolazione della fosforilazione in Ser-1177 (Fig. 7) (Chen et al., 1999; Fulton et al., 1999; Butt et al., 2000; Michell et al., 2001; Morrow et al., 2003; Levine et al., 2007; Okayasu et al., 2008; García et al., 2008).

Da uno studio del 2002 (Gonzalez et al., 2002) è emerso che la fosforilazione della eNOS in Ser-1177 è influenzata dalla sua localizzazione alla membrana. E' stata infatti confrontata, mediante immunoprecipitazione, la forma *wild-type* dell'enzima con mutanti *palm⁻/eNOS* e *myr⁻/eNOS*; si è osservato che la fosforilazione avviene normalmente nel *wild-type*, risulta parzialmente ridotta nel mutante *palm⁻/eNOS* ed è quasi assente in *myr⁻/eNOS*, sia in condizioni basali che in seguito ad attivazione dell'enzima da parte di VEGF o S1P. Tali mutanti possono essere rifosforilati se ad essi viene legato un dominio transmembrana come la glicoproteina CD8, che consente una corretta rilocalizzazione alle membrane. Considerando questi dati

risulta evidente che per la fosforilazione della Ser-1177 non è fondamentale l'acilazione, bensì il *targeting* alle membrane. Giustiniani et al., (2009) hanno inoltre osservato che per la fosforilazione in Ser-1177 sembra essere necessaria la stabilità dei microtubuli, nonché l'acetilazione della tubulina.

Il significato fisiologico della fosforilazione indotta in altri siti (come in Ser-633 e Ser-615) della eNOS è meno conosciuto. La fosforilazione in Ser-633 è mediata dalla PKA ed aumenta la produzione del NO (Fig. 7) (Michell et al., 2002; Boo et al., 2003a). Diversi agonisti della eNOS che determinano la fosforilazione della Ser-1177, inducono anche la fosforilazione in Ser-633. Con alcuni di tali stimoli quali il VEGF, lo *shear stress*, ed un analogo del cGMP l'8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP) si è osservato che i livelli di fosforilazione in Ser-633 sono più bassi di quelli in Ser-1177. Inoltre la fosforilazione in Ser-633 non richiede un aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare (Boo et al., 2003a). Tali dati suggeriscono che questa fosforilazione è importante nel mantenere l'attività della eNOS dopo un'iniziale attivazione dovuta al flusso di Ca^{2+} e/o fosforilazione in Ser-1177 (Mount et al., 2007).

La fosforilazione in Ser-615 è regolata da Akt (Fig. 7). I dati presenti in letteratura sulla fosforilazione di tale sito sono molto contrastanti. Michell et al. (2002) hanno riportato che la mutazione di tale serina con un aspartato (S615D, che genera una forma che si comporta come quella fosforilata) aumenta l'affinità della eNOS per il complesso Ca^{2+}/CaM ma non stimola ulteriormente l'enzima già attivo. Bauer et al., (2003) hanno invece osservato che questa mutazione (S615D) aumenta l'attività enzimatica in saggi in vitro,

mentre la mutazione con un'alanina (S615A, che genera una forma di eNOS costitutivamente defosforilata) genera una forma meno attiva nei saggi in vitro. Tuttavia, ambedue queste mutazioni risultano in un maggior rilascio di NO sia basale che stimolato *in vivo*. Gli autori suggeriscono che l'effetto stimolatorio della mutazione S615A *in vivo* sia dovuta ad effetti indiretti, comportanti sia l'interazione della eNOS con altre proteine sia la fosforilazione in altri siti. Recentemente Tran et al. (2009) hanno dimostrato che la contemporanea fosforilazione in Ser-615 e in Ser-1177 aumenta notevolmente l'attività della eNOS in presenza di concentrazioni basali di Ca^{2+} , mentre una sola di queste fosforilazioni aumenta di poco l'attività dell'enzima e richiede alte $[Ca^{2+}]$.

Anche la fosforilazione in Tyr-81, indotta da Src chinasi, ha un'azione stimolatoria sull'enzima. Questa fosforilazione contribuisce ad un aumento dell'attività della eNOS, o influenzando l'attivazione dell'enzima Ca^{2+} -mediata, o alterando le interazioni proteina-proteina, oppure modificando la localizzazione dell'enzima (Fulton et al., 2005, 2008).

Il sito Thr-495, localizzato all'interno della sequenza dove si lega il complesso Ca^{2+}/CaM , a differenza di quanto riportato per i residui indicati finora, quando fosforilato riduce l'attività catalitica della eNOS, interferendo con il legame della Ca^{2+}/CaM all'enzima (Harris et al., 2001; Michell et al., 2001; Fleming et al., 2001; Matsubara et al., 2003). La defosforilazione della Thr-495, indotta da agonisti della sintesi del NO come la bradichinina, VEGF e ionomicina è mediata da protein fosfatasi 1 (PP1), fosfatasi 2 (PP2A) e dalla calcineurina (PP2B) (Michel et al., 2001; Greif et al., 2002)

(Fig. 7). In cellule endoteliali, è stato osservato che la defosforilazione di tale residuo e la contemporanea fosforilazione in Ser-1177, sono essenziali per l'attività della eNOS (Harris et al., 2001; Michell et al., 2001; Fleming et al., 2001).

Le relazioni tra Ser-1177 e Thr-495 sono state investigate utilizzando dei mutanti (Lin et al., 2003): mutando la Thr-495 in alanina (T495A) per generare una forma costitutivamente defosforilata della eNOS alla posizione 495 è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica nei relativi lisati cellulari; tuttavia la produzione di NO *in vivo* era ridotta. Se alla prima mutazione si aggiunge quella della Ser-1177 in acido aspartico (S1177D), che da sola renderebbe l'enzima costitutivamente attivo, è stata osservata un'attività estremamente incrementata, con maggiore produzione di O_2^- rispetto alla forma *wild-type*. Questo studio potrebbe chiarire il ruolo della Thr-495 quale importante sito di regolazione della “reazione non accoppiata” della eNOS, ma non spiega perché agonisti della eNOS come la bradichinina, che causano la defosforilazione in tale sito (Harris et al., 2001; Fleming et al., 2001), stimolano la sintesi del NO piuttosto che del O_2^- . Quindi saranno necessari ulteriori studi per chiarire se la defosforilazione in Thr-495 causa prevalentemente un aumento della sintesi del NO o del O_2^- (Mount et al., 2007). In accordo con un'azione inibitoria di fosfo-Thr-495, Yoon et al. (2010) hanno recentemente osservato che in cellule endoteliali, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC), l'invecchiamento della cellula riduce la produzione di NO, i livelli della eNOS ed inibisce l'attività dell'enzima favorendo la fosforilazione in Thr-495 piuttosto che la fosforilazione in Ser-1177.

Il sito di fosforilazione in Ser-116, è l'unico sito individuato nel dominio ossigenasico della eNOS (Fig. 7). Sebbene alcuni studi condotti su cellule endoteliali in coltura hanno mostrato che la fosforilazione di questo residuo contribuisce all'attivazione della eNOS in seguito a *shear stress* (Gallis et al., 1999), ad esposizione alle lipoproteine ad alta densità (HDL) ed all'apolipoproteina AI (Drew et al, 2004), altri autori hanno riportato che tale sito è fosforilato in condizioni basali e che la sua defosforilazione determina un incremento dell'attività della eNOS (Kou et al., 2002). Li et al. (2007) utilizzando mutanti fosfomimetici (S116D) e mutanti non fosforilabili (S116A) hanno confermato che la fosforilazione in Ser116 è inibitoria piuttosto che stimolatoria, e ciò sembra essere dovuto non ad un diretto effetto sull'attività catalitica della eNOS, ma piuttosto ad un'aumentata associazione dell'enzima con la caveolina-1.

Recentemente, è stato osservato che la fosforilazione in questo sito, dovuta alla chinasi S-ciclina-dipendente 5 (Cdk5), induce l'inattivazione della eNOS e quindi una minore produzione di NO con conseguente diminuzione dei danni dovuti alla nitratura di diverse proteine (Lee et al., 2010).

1.3.3.3. S-nitrosilazione

La S-nitrosilazione è una reazione che consiste nell'attacco covalente di gruppi nitrosilici (NO-derivati) ai gruppi tiolici degli amminoacidi cisteina presenti nelle proteine (si veda la sezione 1.1).

La S-nitrosilazione/denitrosilazione è ormai riconosciuta come un meccanismo di fondamentale importanza nella regolazione delle vie di trasduzione del segnale pari ai processi di fosforilazione/defosforilazione (Fig. 8). Nelle cellule endoteliali a riposo la eNOS è inibita mediante S-nitrosilazione a livello delle Cys-94 e Cys-99 che, come detto nella sezione relativa alla struttura della eNOS, sono localizzate all'interfaccia di associazione tra due monomeri (Erwin et al., 2005).

Il meccanismo attraverso cui la S-nitrosilazione inibisce la eNOS non è ancora stato chiarito. Dal momento che lo ione Zn^{2+} viene rilasciato dal *cluster* tetratiolato dopo S-nitrosilazione (Ravi et al., 2004), è stato suggerito che il meccanismo di inibizione potrebbe essere dovuto alla conseguente dissociazione degli omodimeri in monomeri inattivi, tra i quali non può avvenire il trasferimento degli elettroni (Erwin et al., 2006; Dudzinski et al., 2006). Altri studi hanno invece suggerito che la S-nitrosilazione della eNOS possa influenzare il legame del substrato o di cofattori all'enzima stesso (Erwin et al., 2005).

Agonisti quali il VEGF e l'insulina promuovono la denitrosilazione della eNOS e la sua fosforilazione in Ser-1177, attivandola. Sebbene la denitrosilazione avvenga simultaneamente alla fosforilazione in Ser-1177, tali modifiche non sembrano essere interdipendenti (Erwin et al., 2005). In corrispondenza della diminuzione della fosforilazione in Ser-1177 e al ritorno dell'attività dell'enzima allo stato basale, la eNOS è nuovamente S-nitrosilata (Musicki et al., 2009) (Fig. 8).

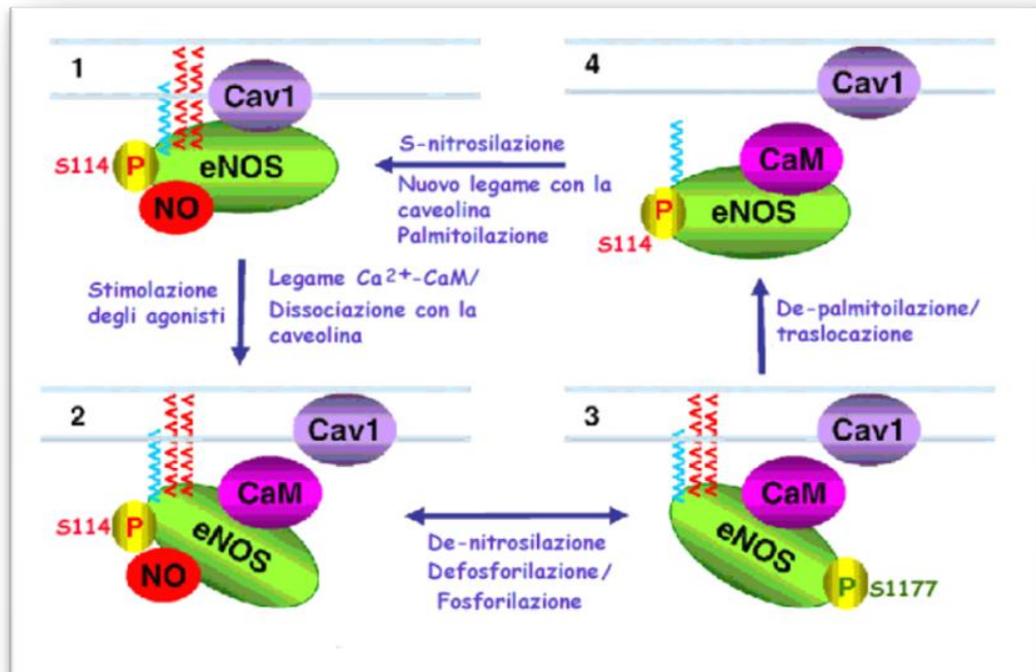


Figura 8. Rapporto dinamico tra la nitrosilazione e le principali modificazioni post-traduzionali della eNOS. Questa figura mostra le relazioni tra i processi di regolazione dell'attività della eNOS più frequenti e importanti: la nitrosilazione, l'acilazione, la fosforilazione e l'associazione con la cav-1. Pannello 1: Mostra la eNOS a riposo, miristoilata e palmitoilata (catene blu e rosse, rispettivamente), ancorata alla membrana ed inibita mediante: la nitrosilazione (indicata con NO gruppi nitrosilici legati ai gruppi tiolici delle Cys-94 e Cys-99); il legame con la caveolina-1 (cav-1) (come riportato nella sezione relativa all'interazione con la cav-1); la fosforilazione inibitoria in Ser-114. Pannelli 2 e 3: Mostrano come gli agonisti promuovono il legame del complesso Ca²⁺/CaM all'eNOS e la dissociazione dalla cav-1 (pannello 3) la de-nitrosilazione e la contemporanea defosforilazione in Ser-114/fosforilazione in Ser-1177. Pannello 4: La prolungata stimolazione degli agonisti induce la de-palmitoilazione con conseguente traslocazione della eNOS dalla membrana al citosol. La eNOS nuovamente palmitoilata, ritorna alla membrana dove va incontro alla nitrosilazione, alla fosforilazione in Ser-114 e al legame con la cav-1. (Modificata da Dudzinski et al., 2007).

Sembra che sia la eNOS a generare il NO necessario per la propria S-nitrosilazione (Erwin et al., 2005) e che la localizzazione intracellulare dell'enzima stesso influenzi tale reazione. In particolare, in esperimenti in cui sono stati usati dei mutanti non miristoilabili (myr⁻-eNOS) è stato osservato che la S-nitrosilazione è abolita, mentre un mutante myr- fuso al dominio transmembrana della glicoproteina CD8 (CD8-myr⁻-eNOS) è iper-nitrosilato (Erwin et al., 2006). Il motivo per cui la S-nitrosilazione richiede la localizzazione dell'enzima alla membrana potrebbe dipendere dalla diversa chimica degli ambienti cellulari che possono essere a favore o sfavore di questa modifica (Hess et al., 2005). È stato ipotizzato che l'ambiente idrofobico delle membrane facilitino la reazione del NO con l'ossigeno gassoso necessaria per la formazione di molecole nitrosilanti, quali N₂O₃ (Erwin et al., 2006; Liu et al., 1998). Al contrario, la de-nitrosilazione nel citosol potrebbe essere facilitata dall'ambiente riducente, dalla più bassa concentrazione di NO e dalla rapida idrolisi di N₂O₃ in ambiente acquoso (Erwin et al., 2006).

1.3.3.4. Acetilazione

Recentemente è stato scoperto che i residui di lisina (Lys 496) e 506 della eNOS, che si trovano nel dominio che lega la CaM, possono essere acetilati e che questa acetilazione riduce il legame tra eNOS e CaM (Mattagajasingh et al., 2007). Il significato biologico di questa modificazione è discussa nella sezione 1.4.1.

1.3.3.5. Interazioni proteine-proteine

Caveolina-1. Le caveoline (proteine palmitoilate di 20-24 Kda), formano l'impalcatura strutturale delle caveolae, causando l'invaginazione di microdomini della membrana plasmatica, i cosiddetti *rafts*, ricchi di colesterolo e sfingolipidi (Galbiati et al., 2001). Le caveoline sono comunemente classificate in: caveolina-1 (cav-1) presente in un'ampia varietà di cellule, compreso l'endotelio; caveolina-2 (cav-2) espressa principalmente negli adipociti; caveolina-3 (cav-3) contenuta nei muscoli striati, incluso il miocardio (Rothberg et al., 1992).

Le caveolae sono particolarmente abbondanti nelle cellule endoteliali; grazie alle loro proprietà dinamiche, partecipano alla transitosi, alla permeabilità vascolare ed al controllo del tono vascolare (Frank et al., 2003).

La membrana plasmatica non è, tuttavia, l'unico sito di localizzazione della cav-1; la si trova anche nel complesso del Golgi (Kurzchalia et al., 1992; Smart et al., 1994; Luetterforst et al., 1999), negli endosomi (Pol et al., 1999), nei corpi lipidici (Pol et al., 2001), sulle membrane mitocondriali e in vescicole di trasporto coinvolte nel traffico della via secretoria (Li et al., 2001). Si ritiene che cav-1 legghi il colesterolo prodotto nel reticolo endoplasmatico e lo trasporti alla membrana plasmatica, passando per il Golgi; è inoltre implicata in una via di endocitosi indipendente dalla clatrina (Hansen and Nichols, 2009) e in vie di trasduzione del segnale (Anderson et al., 1998).

Attraverso esperimenti di co-immunoprecipitazione, di *pull-down* e *two-hybrid* (Ju et al., 1997), è stato dimostrato che la eNOS interagisce, attraverso una sequenza di legame consenso (amminoacidi

350-358), direttamente con la cav-1 legandosi al cosiddetto *caveolin scaffolding domain* (amminoacidi 82-101) (Michel et al., 1997). Tale associazione riduce fortemente l'attività basale della eNOS perché interferisce con il flusso di elettroni che passano dal dominio riduttasico a quello ossigenasico (Ju et al., 1997; Ghosh et al., 1998). E' stato dimostrato che l'interazione inibitoria della eNOS con la cav-1, può essere antagonizzata dal complesso Ca^{2+}/CaM (Michel et al., 1997; Feron et al., 1998): questa serie di esperimenti hanno portato a proporre l'esistenza di un ciclo di regolazione nell'attivazione/inattivazione dell'enzima, dipendente dal complesso Ca^{2+}/CaM e dalla cav-1 (Fig. 9). Diversi agonisti come lo *shear stress*, la bradichinina, gli estrogeni o l'aumento del flusso vascolare, aumentano le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} , promuovendo il legame del complesso Ca^{2+}/CaM all'eNOS e la sua dissociazione dalla cav-1, con conseguente attivazione della stessa. Quando i livelli intracellulari di Ca^{2+} ritornano a livelli basali, il ciclo è invertito, la CaM si dissocia e la caveolina si riassocia con la eNOS ormai inattiva (Feron et al., 1998).

Livelli elevati di LDL in pazienti ipercolesterolemici aumentano l'espressione della cav-1 e la formazione del complesso cav-1/eNOS limitando sia il rilascio del NO basale che quello stimolato dagli agonisti (Feron et al., 1999 e 2001). Questa risposta patologica può spiegare in parte la disfunzione endoteliale presente nei pazienti con ipercolesterolemia.

Bucci et al., (2000) mediante studi *in vivo* hanno osservato che l'interazione della cav-1 con la eNOS riduce la permeabilità vascolare e la formazione di edema tissutale. Il blocco della permeabilità

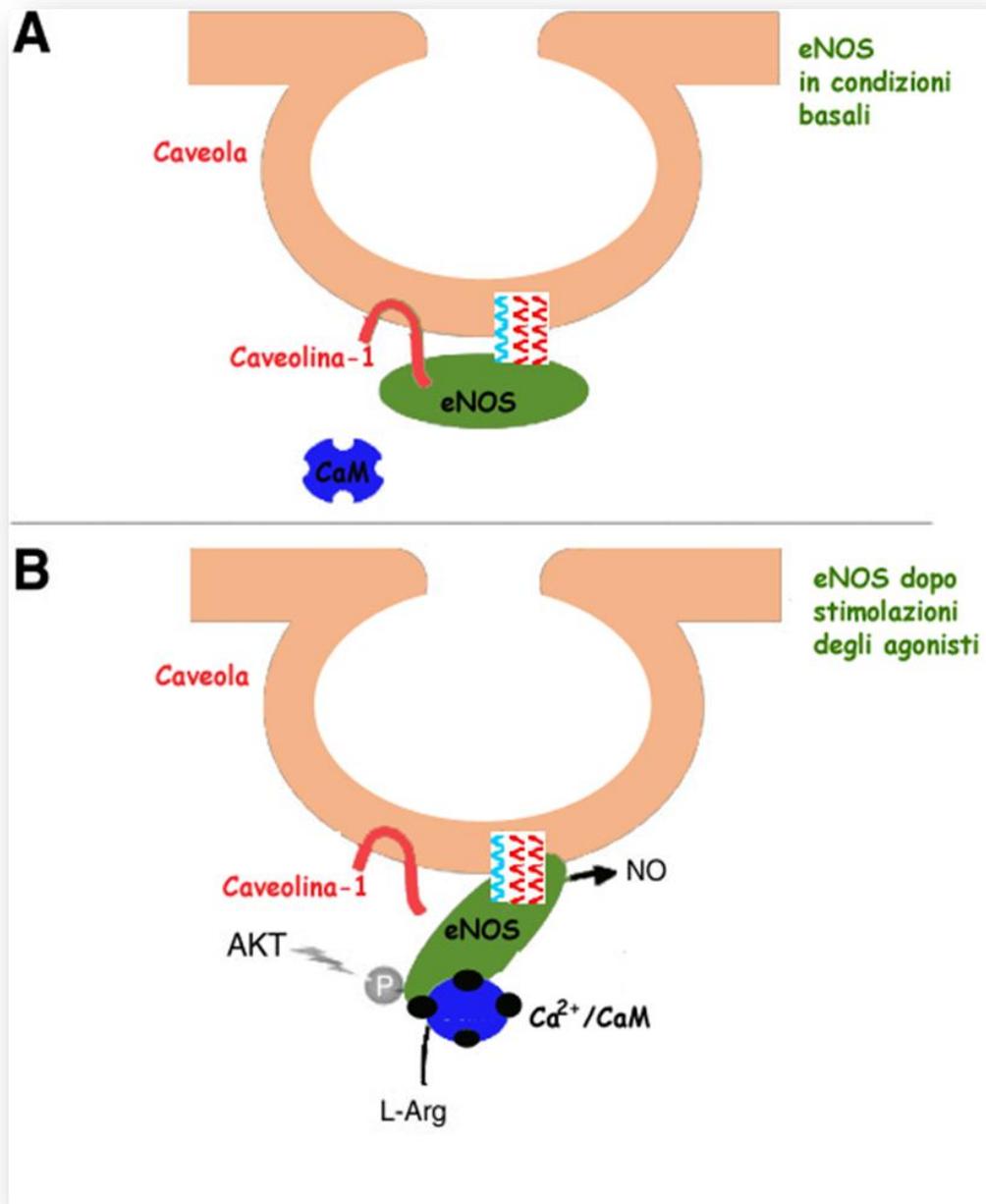


Figura 9. Regolazione della eNOS mediata dall'interazione con la caveolina-1 e dal complesso Ca²⁺/CaM. Pannello A. In condizioni basali l'attività della eNOS è inibita dal legame con la cav-1. Pannello B. Diversi agonisti come lo *shear stress*, la bradichinina, gli estrogeni promuovono il legame del complesso Ca²⁺/CaM alla eNOS, la sua dissociazione dalla cav-1 e fosforilazioni stimolatorie come quella mediata da Akt, con conseguente attivazione dell'enzima e produzione di NO.

vascolare dovuto all'associazione cav-1/eNOS è simile a quello osservato nei topi *knockout* per la eNOS (Fukumura et al., 2001).

Inoltre studi su topi *knockout* (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001) e animali transgenici per la cav-1 (Bauer et al., 2005), hanno dimostrato l'importanza della regolazione negativa della cav-1 sulla eNOS per l'intero organismo. I topi *knockout* per il gene della cav-1 (cav-1 *-/-*) sono vitali e fertili ma privi di caveolae nella maggior parte dei distretti tissutali (polmone, tessuto adiposo, rene, cuore), a conferma del ruolo essenziale della cav-1 nella biogenesi di tali strutture. Gli stessi topi non rispondono al trattamento con il vasocostrittore fenilefrina. Dal momento che la vasocostrizione viene ripristinata somministrando N ω -Nitro-L-Arginina-Metil-Estere (L-NAME), un classico inibitore della eNOS, si è dedotto che, alla base della mancata risposta vasocostrittrice, ci sia un'aumentata attività della eNOS. Al contrario, risulta incrementata la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina ACh (un fenomeno NO-dipendente) confermando l'azione inibitoria della cav-1 sulla eNOS.

La risposta vasodilatativa ACh-dipendente è stata studiata anche in topi transgenici per la cav-1 (che sovraesprimono tale proteina). Come previsto la vasodilatazione risulta ridotta, in quanto l'attività catalitica della eNOS è inibita dalla cav-1. Da questa serie di lavori emerge che a livello endoteliale il ruolo principale della cav-1 sia quello di regolare le funzioni del letto vascolare attraverso l'interazione con la eNOS.

Considerata l'importanza dell'attività della eNOS e della conseguente produzione del NO nel determinare una risposta infiammatoria, il *caveolin scaffolding domain* della cav-1 potrebbe

fornire un nuovo approccio terapeutico per la regolazione della produzione del NO, e per attenuare gli effetti pro-infiammatori dovuti ad un'eccessiva produzione del NO.

Mentre è ormai nota l'interazione tra la cav-1 e la eNOS, meno chiari sono i dati in letteratura circa "il luogo" di interazione tra le due proteine. Diversi lavori riportano che nella membrana plasmatica la eNOS si localizza nelle caveolae (Garcia-Cardena et al., 1996; Shaul et al., 1996; Rizzo et al., 1998; Sowa et al., 2001). Gran parte di questi studi sono basati su una particolare tecnica di frazionamento che isola proteine insolubili in soluzioni fredde di detergenti non denaturanti (come il Triton-X-100). La equazione tra insolubilità in Triton e localizzazione alle caveolae è oggi messa in discussione da diversi ricercatori nel campo (Parton and Simons, 2007). Si deve anche aggiungere che entrambe le proteine sono state trovate anche in altri compartimenti intracellulari (Kurzchalia et al., 1992; Sessa et al., 1995; Li et al., 2001), per cui si potrebbe pensare che la loro interazione possa avvenire in uno di tali compartimenti [anche se uno studio di Govers et al. (2002) suggerisce che il complesso del Golgi non sia un sito di interazione tra le due proteine].

In un studio di microscopia confocale ad alta risoluzione sulla localizzazione della eNOS, è stata riportata una scarsa colocalizzazione dell'enzima con la cav-1 sulla membrana plasmatica di cellule HeLa indotte ad esprimere la eNOS e di cellule HUVEC; in particolare in cellule in migrazione, è stata osservata una netta segregazione tra le due proteine, con la eNOS localizzata al margine avanzante di queste cellule e la cav-1 concentrata nella parte posteriore (Bulotta et al., 2006). Anche in cellule confluenti, non

migranti, il grado di colocalizzazione tra eNOS e cav-1 era scarso. Questi risultati indicano che la maggior parte della eNOS presente sulla membrana plasmatica non è presente in caveolae; tuttavia, il sito di interazione tra l'enzima e la cav-1 rimane ancora da scoprire.

Recentemente è stato osservato che in cellule endoteliali di aorta bovina (BAECs) coltivate in assenza di siero si ha lo spostamento del complesso eNOS/cav-1 dalla membrana plasmatica e dal Golgi a siti intracellulari. In seguito al trattamento con insulina il complesso ritorna alla membrana plasmatica e questa traslocazione è accompagnata dalla riduzione della produzione di NO. Il *knockdown* della cav-1 e l'inibizione della palmitoilazione della eNOS e della cav-1 determinano, in presenza di insulina, un aumento dei livelli di NO. Da ciò emerge che il complesso eNOS/cav-1, nonché l'associazione dello stesso alla membrana plasmatica, rivestano un ruolo determinante nel modulare l'attività dell'enzima indotta dall'insulina (Wang et al., 2009).

Heat shock protein 90 (Hsp90). Hsp90 fa parte del gruppo delle “*Heat Shock Proteins*”, abbondanti proteine citosoliche che agiscono da *chaperon* regolando il ripiegamento, la maturazione, l'attivazione e il traffico di proteine e intervenendo anche nella regolazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (Pratt, 1997).

L'interazione tra eNOS e Hsp90 è stata rilevata con esperimenti di co-immunoprecipitazione ed è stato dimostrato che questa associazione incrementa l'attivazione della eNOS in risposta a svariati

stimoli, quali VEGF e *shear stress* (García-Cardena et al., 1998). In cellule endoteliali a riposo, Hsp90 sembra essere associata in minime quantità alla eNOS. In cellule stimulate da agonisti (VEGF, estrogeni, istamina e *shear stress*) vi è un aumento dell'associazione tra le due proteine correlata con una maggiore produzione del NO (Garcia-Cardena et al., 1998). A conferma del ruolo positivo di Hsp90, la introduzione di un dominante negativo di Hsp90 in cellule endoteliali determina il blocco dell'associazione tra Hsp90, eNOS ed Akt in seguito a trattamento con VEGF, con conseguente defosforilazione di Akt (Ser-473), defosforilazione della eNOS (Ser-1177) e diminuzione del rilascio di NO (Miao et al., 2008). Il controllo positivo attuato da Hsp90 sulla eNOS è stato dimostrato anche *in vivo* (Shah et al., 1999). Recentemente, Yoon et al. (2010) hanno riportato che, in cellule HUVEC invecchiate, aumenta l'associazione della eNOS con la cav-1 rispetto a quella dell'enzima con Hsp90 e Akt.

Il meccanismo d'azione di Hsp90 non è ancora del tutto compreso. È stato suggerito che lo *chaperon* agisca da modulatore allosterico della eNOS, inducendo un cambiamento conformazionale dell'enzima, portando ad un aumento della sua attività oppure ad una stabilizzazione del suo legame con la calmodulina; in alternativa, hsp90 potrebbe agire da proteina di ancoraggio (*scaffold*) per il reclutamento all'enzima di altre proteine regolatrici quali chinasi e fosfatasi (Fulton et al., 2001; Fontana et al., 2002). L'attivazione comporta la dissociazione CaM-dipendente della eNOS dalla cav-1, il successivo reclutamento della eNOS e di Akt ad Hsp90 e la fosforilazione (Akt-mediata) dell'enzima stesso (Garcia-Cardena et

al., 1998; Sato et al., 2000; Kupatt et al., 2004; Takahashi and Mendelsohn, 2003).

Diversi studi suggeriscono che la CaM, la cav-1, Hsp90 e la eNOS fanno parte di un complesso dinamico. Esperimenti di co-immunoprecipitazione indicano che Hsp90 facilita il distacco della eNOS da cav-1 mediato da CaM (Gratton et al., 2000).

Dal punto di vista fisiologico, l'interazione tra eNOS e Hsp90 è importante, in quanto favorisce la reazione "accoppiata" della eNOS e quindi la produzione del NO rispetto al O_2^- (Pritchard et al., 2001; Zhang et al., 2009).

Il NO può modulare negativamente Hsp90 mediante S-nitrosilazione su un residuo di cisteina. Questa nitrosilazione inibisce la funzione ATPasica di Hsp90 e rompe il legame eNOS-Hsp90; questo meccanismo potrebbe fornire un *feedback* negativo per regolare la quantità di NO da produrre e/o contribuire al ciclo di attivazione/inattivazione al quale la eNOS va incontro (Martínez-Ruiz et al., 2005).

Hsp90 possiede al dominio COOH- ed NH₂-terminale delle sequenze per il legame con altre proteine (Harris et al., 2000). Una *co-chaperon* è **cdc37**, una fosfoproteina (50 kDa) che si trova nelle caveolae e che può legarsi direttamente alla eNOS o far parte del complesso eNOS/Hsp90/Akt. Nell'interazione diretta con la eNOS, cdc37 inibisce l'attività dell'enzima e può servire a prevenire una esagerata attivazione dello stesso che porterebbe ad una produzione di O_2^- (Harris et al. 2006). Un altro *co-chaperon* è **CHIP** (*carboxy terminal of Hsp70 Interacting Protein*) che ostacola l'associazione eNOS-Hsp90, sposta la eNOS dal normale traffico al Golgi e la

trasloca al citoscheletro, riducendo così la sua attività enzimatica (Jiang et al., 2003; Schleicher et al., 2005).

eNOS-Interacting Protein (NOSIP). NOSIP è una proteina di 34 kDa che si lega alla regione COOH-terminale (aminoacidi 366-486) del dominio ossigenasico della eNOS. La formazione del complesso NOSIP-eNOS è inibita dalla cav-1, suggerendo che NOSIP e cav-1 competono per lo stesso sito di legame alla eNOS (Dedio et al., 2001).

NOSIP è una proteina che è localizzata prevalentemente nel nucleo; la sua localizzazione è regolata in modo dinamico, in particolare durante la fase G2 del ciclo cellulare, NOSIP si accumula nel citoplasma. Studi di frazionamento sub-cellulare e di immunofluorescenza hanno dimostrato che questo accumulo citoplasmatico ciclo-cellulare-dipendente corrisponde ad una iperespressione di NOSIP che induce una traslocazione della eNOS ai filamenti del citoscheletro di actina e una conseguente inattivazione dell'enzima (Schleicher et al., 2005) (Fig. 10). Il blocco dell'attività basale della eNOS mediato da NOSIP potrebbe rappresentare un'importante meccanismo di difesa della cellula mitotica contro gli effetti tossici del NO (Schleicher et al., 2005).

eNOS TRafficking INducer (NOSTRIN). NOSTRIN è una proteina di 58 kD, appartenente alla famiglia delle proteine PCH (*pombe cdc 15 homology*). NOSTRIN contiene nella regione NH₂-terminale un dominio cdc15 caratteristico delle proteine PCH, ed un dominio SH3

alla regione COOH-terminale dove lega la eNOS ed anche la GTPasi dinamina e *N-WASP* (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*). NOSTRIN, coinvolta nei riarrangiamenti del citoscheletro, è espressa nelle cellule dei tessuti riccamente vascolarizzati quali il fegato, la placenta, i polmoni il cuore e le cellule endoteliali. In cellule endoteliali giunte a confluenza, la eNOS e NOSTRIN colocalizzano a livello della membrana plasmatica. La sovraespressione di NOSTRIN causa un trasporto vescicolare della eNOS dalla membrana plasmatica ai compartimenti intracellulari con conseguente diminuzione dei livelli del NO prodotto (Zimmermann et al., 2002; Schilling et al 2006) (Fig. 10).

NOSTRIN preferisce interagire con la eNOS quando è in uno stato inattivo, legata alla cav-1. Infatti mediante esperimenti di immunoprecipitazione è stata osservata l'esistenza di un complesso ternario eNOS-NOSTRIN-cav-1 normalmente localizzato alla membrana plasmatica (Schilling et al 2006).

Il legame di NOSTRIN con dinamina e N-WASP è necessario per la internalizzazione della eNOS (Tsujita et al., 2006). NOSTRIN lega la dinamina, localizzata nelle caveolae; mediante la sua attività GTPasica, la dinamina favorisce il distacco delle vescicole di endocitosi dalla membrana (Fig. 10). Inoltre, dal momento che N-WASP e NOSTRIN colocalizzano con la eNOS lungo i filamenti di actina, e che la depolimerizzazione dei filamenti di actina blocca la traslocazione di NOSTRIN-eNOS, è stato ipotizzato che l'associazione NOSTRIN/N-WASP promuova la polimerizzazione dell'actina per facilitare il trasporto vescicolare (Icking et al., 2005; Schilling et al 2006) (Fig. 10). Secondo Schilling e collaboratori

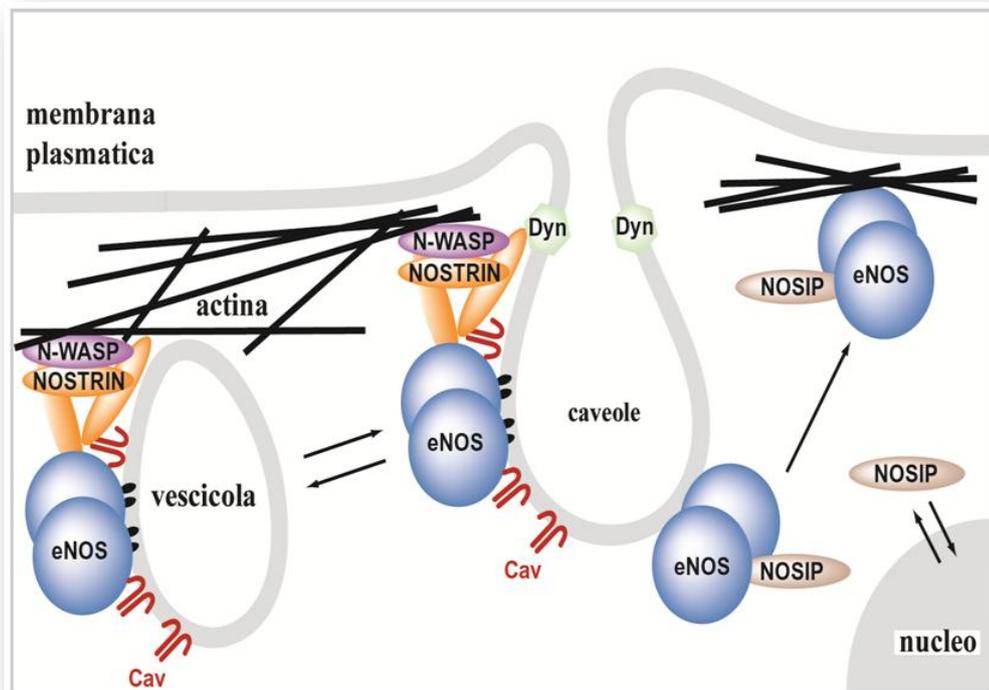


Figura 10. NOSIP e NOSTRIN regolano negativamente l'attività della eNOS attraverso la promozione della traslocazione della eNOS dalla membrana plasmatica ai siti intracellulari. NOSIP induce una traslocazione della eNOS dalla membrana plasmatica ai filamenti del citoscheletro di actina. NOSTRIN facilita il trasporto vescicolare della eNOS dalla membrana plasmatica ai compartimenti intracellulari.

(2006) la eNOS in seguito ad endocitosi non viene degradata e ritorna in superficie probabilmente mediante un processo che coinvolge lo stato di acilazione della eNOS.

Dinamina-2. La dinamina-2 appartiene alla famiglia delle “*large GTPasi*”, si localizza sulla membrana plasmatica e sul complesso del Golgi, ed è coinvolta nella formazione delle vescicole, nell’endocitosi mediata da recettori, nell’internalizzazione delle caveolae e nel traffico vescicolare (Schmid et al., 1998). Essa colocalizza con la eNOS principalmente a livello del Golgi. La dinamina-2 si lega al dominio FAD della eNOS e regola l’attività dell’enzima promuovendo il trasferimento degli elettroni tra la flavine, a livello del dominio riduttasico della eNOS (Cao et al, 2003).

Porina o canale anione selettivo voltaggio-dipendente (VDAC). La porina è una proteina localizzata sulla membrana mitocondriale esterna, che polimerizzando e formando canali acquosi trans membrana rende la membrana mitocondriale esterna liberamente permeabile agli ioni e alle molecole con peso molecolare inferiore a 5000 Dalton. L’interazione della eNOS con la porina è diretta e specifica, è rafforzata da agonisti della eNOS e risulta in un incremento nell’attività dell’enzima (Sun e Liao, 2002). L’attivazione della eNOS sulla superficie dei mitocondri potrebbe avere

implicazioni per il ruolo del NO nella regolazione della funzione mitocondriale (si veda la sezione 1.1).

1.3.4. Localizzazione della eNOS

Un fattore determinante nel controllo dell'attività della eNOS è la sua localizzazione cellulare. La compartimentalizzazione dell'enzima è molto importante: primo perché determina con quali proteine esso può interagire e quindi come esso può rispondere ai *pathways* di segnalazione che ne regolano l'attività; secondo, essendo il NO una molecola con emivita molto breve, il sito di produzione è importante per l'interazione con i suoi effettori ed in generale per i suoi effetti biologici.

Come detto in precedenza, la eNOS subisce una triplice acilazione (N-miristoilazione e S-palmitoilazioni) che le permette il legame alle membrane: in particolare è in gran parte associata alla faccia citosolica della membrana plasmatica e dell'apparato di Golgi, e in parte è libera nel citosol (Sessa et al., 1995; García-Cardena et al., 1996). Oltre a questa localizzazione, è stato riportato anche una localizzazione mitocondriale (Bates et al., 1995) e nucleare (Feng et al., 1999) ma questi dati non sono stati confermati da altri. La eNOS è stata anche rilevata a livello dei contatti intercellulari in cellule endoteliali confluenti (Govers et al., 2002).

In molti lavori è dimostrato che la localizzazione subcellulare della eNOS è un evento dinamico. Per esempio, diversi gruppi hanno riportato che in seguito a stimolazione con bradichinina (Michel et al.,

1993; Prabhakar et al., 1998), con estradiolo (Goetz et al., 1999), con un analogo del ceramide (Igarashi et al., 1999), la eNOS trasloca dalla membrana al citosol, e tale evento si associa con un aumento della produzione di NO. Tuttavia, sebbene il trattamento con la forma ossidata della lipoproteina a bassa densità (oxLDL) determina sempre la traslocazione dell'enzima dalla superficie al citosol, l'attività dell'enzima risulta essere diminuita (Blair et al., 1999).

Come detto nella sezione sulle modifiche post-traduzionali mediante acilazioni (sezione 1.3.3.1), la eNOS va incontro a continui cicli di palmitoilazione-depalmitoilazione che corrispondono ad una continua traslocazione dell'enzima tra il Golgi e la membrana plasmatica. Ad oggi, non è chiaro se il passaggio della eNOS tra membrana plasmatica avvenga attraverso il citosol o se si realizza tramite trasporto vescicolare. Interazioni proteina-proteina con NOSIP, NOSTRIN nonché con il co-chaperone CHIP potrebbero contribuire alla ridistribuzione intracellulare della eNOS (Jiang et al., 2003).

Nonostante l'accordo generale sulla triplice e dinamica localizzazione dell'eNOS (membrana plasmatica, apparato di Golgi e citosol), vi sono notevoli discordanze sulla compartimentalizzazione dell'enzima in microdomini della membrana plasmatica e sul significato fisiologico di tale compartimentalizzazione. In particolare molto interesse è rivolto alla localizzazione dell'enzima nelle caveolae, nell'apparato di Golgi, e alla sua interazione con il citoscheletro.

1.3.4.1. Localizzazione della eNOS nelle caveolae

Come spiegato nella sezione 1.3.3.5, le caveolae sono una sottoclasse di “*raft*” (zattere), cioè di sottodomini della membrana plasmatica arricchite in colesterolo e glicolipidi, nei quali i lipidi si trovano in uno stato relativamente ordinato (“*liquid-ordered*”). I “*raft*” sono stati spesso definiti anche biochimicamente, come domini della membrana plasmatica insolubili in soluzioni di detergenti freddi (chiamati DRMs per *Detergent Resistant Membranes*), ma la equivalenza di queste frazioni con microdomini realmente esistenti nella membrana plasmatica è tutt’ora oggetto di dibattito (Munro, 2003).

Le caveolae si distinguono dagli altri “*raft*” per la loro chiara morfologia e composizione molecolare: consistono infatti in invaginazioni della membrana plasmatica a forma di fiasco, rivestite da una o più isoforme della proteina caveolina (Galbiati et al., 2001).

Diversi lavori, basati sul frazionamento cellulare (García-Cardena et al., 1996; Shaul et al., 1996), sulla microscopia a fluorescenza (García-Cardena et al., 1996; Sowa et al., 2001) e sulla microscopia elettronica (Shaul et al., 1996; Rizzo et al., 1998; Sowa et al., 2001) hanno portato alla conclusione che la eNOS localizzata sulla membrana plasmatica è distribuita principalmente nelle caveolae. Tuttavia, la maggior parte di questi lavori erano basati sul recupero della eNOS in DRMs. Come spiegato sopra, la equivalenza dei DRMs con le caveolae non è ritenuta valida. In altre parole, il recupero di una proteina nelle DRMs non significa necessariamente che *in vivo* essa sia contenuta in microdomini lipidici (“*raft*”) e tanto meno nelle caveolae. Anche gli studi morfologici, pur mostrando la presenza della

eNOS nelle caveolae, non hanno dato stime quantitative sulla proporzione dell'enzima che si trova in tali strutture. Perciò è sorprendente che venga oramai dato per scontato che la eNOS sulla membrana plasmatica sia praticamente tutta contenuta nelle caveolae.

Nel nostro laboratorio è stato condotto uno studio accurato sulla localizzazione della eNOS, sia in una linea di cellule HeLa stabilmente esprime l'enzima che in cellule HUVEC (Bulotta et al., 2006). In questo studio, condotto con microscopia confocale ad alta risoluzione, sono stati utilizzati tre anticorpi diversi e diverse metodiche di permeabilizzazione e di fissazione delle cellule per escludere possibili artefatti. Con anticorpi e metodiche di preparazione diversi, è stato sempre osservato che la eNOS colocalizza scarsamente con la cav-1 sulla membrana sia di cellule HeLa che di cellule HUVEC, confluenti e non confluenti. La segregazione tra eNOS e cav-1 era particolarmente chiaro in cellule polarizzate migranti, nelle quali la eNOS era concentrata nel margine avanzante della cellula, sul largo lamellipodio delle HUVEC o in cosiddette “*ruffles*” (increspature) nella HeLa, mentre la cav-1 era concentrata nella parte posteriore della cellula. In cellule HUVEC tuttavia, è stato osservato che nella parte posteriore delle cellule, la eNOS e la cav-1 co-localizzano a livello di strutture intracellulari che rimangono da definire. Benché l'importanza della interazione eNOS-cav1 non è messa in discussione, dal lavoro di Bulotta et al. (2006) si può concludere che la proporzione della eNOS presente nelle caveolae è stata sovrastimata negli studi precedenti.

1.3.4.2. Significato della eNOS golgiana

Data l'esistenza di un grosso *pool* della eNOS nell'apparato di Golgi, sono stati condotti diversi studi per comprendere se l'enzima Golgiano ha caratteristiche di attivazione diverse da quella della membrana plasmatica, o se addirittura non contribuisce al *signalling* mediante NO ma rappresenta solamente una riserva di enzima destinata alla membrana plasmatica. Inizialmente, è stato riportato che l'attivazione della eNOS ad opera del VEGF o per overespressione di Akt incrementa la fosforilazione dell'enzima (con conseguente produzione di NO), sia nelle frazioni caveolari della membrana che nei compartimenti intracellulari del Golgi, senza un netto cambiamento della distribuzione della eNOS (Fulton et al., 2002), a suggerire che ambedue i *pool*, della membrana plasmatica e golgiana, rispondono ad agonisti che attivano la via PI3K/Akt. Di seguito Fulton et al. (2004) hanno confrontato l'attivazione di costrutti eNOS, espressi in cellule COS, che si localizzano esclusivamente sulla membrana plasmatica o sul complesso del Golgi: ambedue i costrutti sono risultati enzimaticamente attivi; tuttavia, la proteina di fusione che porta la eNOS sulla membrana plasmatica è fosforilata costitutivamente ed è molto più attiva di quella localizzata nel Golgi; essa risulta più sensibile all'aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare, mentre la chimera indirizzata al *cis*-Golgi è attivata da agonisti che attivano Akt. Gli esperimenti di Fulton et al. (2004) sono stati poi estesi a cellule HUVEC, nella quali l'espressione della eNOS endogena è stata abolita mediante "*RNA interference*" (Zhang et al., 2006). Nelle cellule endoteliali è stata confermata la maggiore sensibilità delle enzima della membrana plasmatica ad aumenti di Ca^{2+}

ma a differenza della situazione nelle cellule COS-7, l'enzima di superficie era anche più responsivo ad attivazione da parte di Akt.

E' stata indagata l'attivazione della eNOS forzata anche ad associarsi con altri compartimenti subcellulari. Quando l'enzima è espresso nel *trans*-Golgi ed in altri organelli, quali mitocondri e nucleo, la sua attività è fortemente ridotta. Questo è stato attribuito alla scarsa quantità del complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ nei microambienti considerati (Jagnandan et al., 2005). Per quanto riguarda invece la forma solubile, Church and Fulton (2006) hanno riportato che il mutante G2AeNOS (forma solubile della eNOS) presenta, rispetto al WT, una minore fosforilazione nei residui di Ser-1177, Ser-633 e Ser-615 ed è stato ipotizzato che questa differenza nello stato di fosforilazione sia responsabile della ridotta attività enzimatica della forma solubile piuttosto che la diversa concentrazione di Ca^{2+} negli ambienti intracellulari.

In conclusione, gli studi condotti indicano che il “*pool*” golgiano della eNOS sia attivabile in seguito a stimoli fisiologici ma che il grado di attivazione e la risposta a diversi agonisti siano diversi per l'enzima nelle due localizzazioni, golgiana e di superficie.

1.3.4.3. Interazione con il citoscheletro

Dato l'importante ruolo del citoscheletro in fenomeni come la migrazione e l'angiogenesi e il ruolo del NO in questi processi (si veda la sezione 1.4), non è sorprendente che vi sia stato un interesse nella interazione tra eNOS e il citoscheletro.

Diversi studi hanno dimostrato un ruolo del citoscheletro nella localizzazione e nella regolazione della attività della eNOS (Zharikov et al., 2001; Su et al 2002, 2003). Tuttavia, gli effetti sono complessi e non è possibile a tutt'oggi costruire un modello coerente con tutti i dati riportati in letteratura.

Su e collaboratori (2002) hanno osservato come il trattamento di *pulmonary artery endothelial cells* (PAEC) con sostanze che bloccano la polimerizzazione dei microtubuli diminuisce l'attività della eNOS influenzando la capacità di Hsp90 di legare ed attivare l'enzima. La perfetta organizzazione dei microfilamenti di actina influenza anche il trasporto della L-arginina e quindi la produzione di NO (Zharikov et al., 2001).

Studi di coimmunoprecipitazione su lisati di cellule PAEC hanno rilevato che la eNOS e l'actina coprecipitano, suggerendo un'associazione tra le due proteine; l'associazione della eNOS con la G-actina aumenta l'attività dell'enzima, e il trattamento di cellule PAEC con una sostanza che distrugge il citoscheletro di actina, la *swinolide A*, determina una maggiore associazione eNOS-G-actina ed un conseguente aumento dell'attività enzimatica; al contrario, il trattamento delle stesse cellule con la falloidina, una sostanza che stabilizza il citoscheletro di actina, porta ad una maggiore associazione della eNOS con la F-actina ed una conseguente diminuzione dell'attività enzimatica (Su et al., 2003).

Tramite analisi di immunofluorescenza è stato osservato che in cellule endoteliali confluenti la eNOS si concentra nei siti di contatto cellula-cellula, siti che sono ricchi dei filamenti di actina (Govers et al., 2002).

Mediante analisi di microscopia confocale, in cellule eNOS/HeLa-TetOff non confluenti, è stato osservato che la eNOS colocalizza con l'actina a livello dei *ruffles* (Bulotta et al., 2006), zone di attiva polimerizzazione dell'actina corticale coinvolte nella motilità cellulare (Small et al., 2002). In accordo con questa localizzazione, è stato osservato che anche in cellule polarizzate la eNOS si concentra sul margine avanzante (*leading edge*) cellulare. Inoltre, è stato riportato che il trattamento con citocalasina-D (sostanza che blocca la polimerizzazione dei filamenti di actina) causa lo spostamento della eNOS dalla superficie ai siti di localizzazione intracellulare, riducendone l'attività catalitica (Bulotta et al., 2006).

Da tutti questi studi, e tenendo presente anche i lavori su NOSTRIN e NOSIP (sezione 1.3.3.5), è difficile trarre delle conclusioni generali. Mentre è chiaro che la eNOS interagisce con l'actina e che la sua localizzazione è fortemente influenzata dallo stato del citoscheletro, non è chiaro il significato fisiologico della associazione. Da una parte sembra che l'integrità del citoscheletro sia necessaria per l'attività enzimatica, d'altra parte sembra che l'associazione con filamenti di actina possa inibirla. Saranno necessari ulteriori studi per avere un quadro completo di queste complesse interazioni.

1.4. Ruoli fisiologici della eNOS

La eNOS è coinvolta in diversi processi fisiologici quali: regolazione del tono vascolare, vasodilatazione, apoptosi, angiogenesi ed è implicata nella patogenesi delle malattie cardiovascolari ed in diverse patologie neurodegenerative, come la retinopatia diabetica (Awata et al., 2004), il glaucoma (Toda and Nakanishi-Toda, 2007) e l'emicrania (Gruber et al., 2009).

1.4.1. eNOS e vasodilatazione

Come già detto il NO prodotto dalla eNOS è un potente vasodilatatore; esso svolge un importante ruolo protettivo nel sistema vascolare, regola il flusso sanguigno, la pressione arteriosa e conferisce protezione e tromboresistenza all'endotelio dei vasi sanguigni (Li and Forstermann, 2000).

L'inibizione della eNOS, per mezzo di analoghi competitivi della L-arginina resistenti all'idrolisi, riduce drasticamente il rilassamento endotelio-dipendente *in vitro*, in particolare nelle grandi arterie di conduzione (Moncada et al., 1991). La somministrazione in acuto di inibitori della NOS determina vasocostrizione, e ratti trattati cronicamente con questi composti sviluppano ipertensione (Moncada et al., 1991). Infine, l'importanza della eNOS nella regolazione del tono vascolare è dimostrato inequivocabilmente dallo sviluppo di ipertensione in topi *knockout* per la eNOS (Shesely et al. 1996).

Il NO induce il rilassamento della muscolatura liscia vasale mediante cGMP (Rapoport and Murad, 1983), quest'ultimo attiva la

PKG, la quale determina una diminuzione della forza di contrazione stimolando una pompa ionica che mantiene bassa la concentrazione citosolica di Ca^{2+} ; inoltre la PKG fosforila i canali del potassio (K^+), inducendo iperpolarizzazione con inibizione della risposta alla stimolazione recettoriale (Lincoln et al., 1994) (Fig. 11). In alcune arterie il NO attiva i canali del K^+ indipendentemente dal cGMP (Bolotina et al., 1994).

L'attività vasodilatatoria del NO presenta diverse caratteristiche a seconda del distretto vascolare, del tipo di stimolo (ACh, VEGF o istamina) e della specie (uomo, ratto, topo, criceto). Per esempio, topi *knockout* per il gene della eNOS (-/-) non presentano vasodilatazione indotta dall'istamina nelle arteriole del muscolo cremastere (Payne et al., 2003), mentre negli stessi topi l'ACh induce vasodilatazione in altri distretti mediante meccanismi compensatori quali: *up*-regolazione della nNOS; produzione di EDHF (*Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*) prodotto in condizioni di ridotta biodisponibilità del NO; prostaglandine vasodilatatrici (Meng et al., 1998; Sun et al., 1999).

Disfunzioni nella generazione di NO sono state associate a condizioni patologiche (Mombouli and Vanhoutte, 1999). Nei soggetti che presentano malattie cardiovascolari è stata osservata una ridotta vasodilatazione ed è stato proposta una correlazione tra tale effetto e la diminuita sintesi del NO o una sua minore bio-disponibilità. Non è chiaro se ciò possa essere una causa o una conseguenza della disfunzione endoteliale. Sono state individuate quattro cause principali per la diminuita bio-attività del NO: la diminuita espressione e/o attività della eNOS, la reazione non accoppiata della eNOS, l'aumento

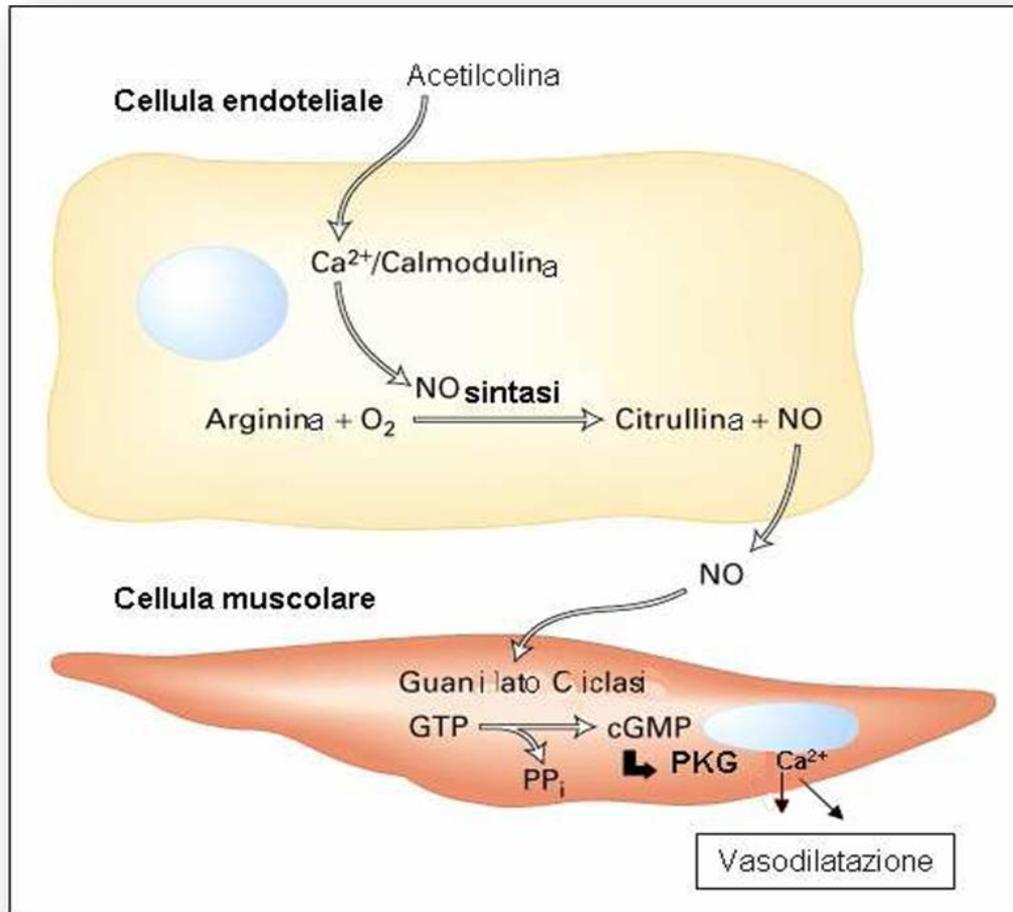


Figura 11. L'ossido nitrico nella regolazione della vasodilatazione. Nella cellula endoteliale l'attivazione della eNOS attraverso uno stimolo chimico o fisico è dovuta all'aumento del Ca^{2+} intracellulare. Il NO prodotto diffonde verso le cellule della muscolatura del vaso dove attiva la sGC. Il cGMP attiva la PKG che causa una diminuzione dei livelli di Ca^{2+} e la conseguente vasodilatazione.

delle ROS e la compromissione delle vie di *signalling* NO-mediate (Braam and Verhaar, 2007).

Considerati gli effetti benefici del NO, l'aumentata produzione di NO dovuta ad una *up*-regolazione dell'espressione della eNOS potrebbe essere di interesse terapeutico o di profilassi. Tuttavia, se da un lato l'iperpressione della eNOS genera le ROS anzichè il NO, attraverso la "reazione non accoppiata" della NOS (Xia et al., 1998; Vasquez-Vivar et al., 1998), d'altro canto *in vivo* è stato dimostrato che gli inibitori della protein chinasi C (PKC) riducono lo stress ossidativo ed inibiscono la "reazione non accoppiata" della eNOS (Mollnau et al., 2002). Li e collaboratori (2006) hanno infatti osservato che la contemporanea inibizione della PKC e l'*up*regolazione della eNOS, portano ad un aumento dei livelli del NO con conseguente vasodilatazione e riduzione della pressione arteriosa.

Recentemente è stato dimostrato come l'enzima deacetilasi, SIRT1, sia capace di modulare il rilassamento vascolare mediante la deacetilazione della eNOS con conseguente incremento della sintesi del NO (Mattagajasingh et al., 2007). E' stato infatti scoperto che i residui Lys 496 e 506 della eNOS, che si trovano nel dominio che lega la CaM, possono essere acetilati e che questa acetilazione riduce il legame tra eNOS e CaM. La deacetilazione da parte di SIRT1 aumenta quindi l'associazione della eNOS con CaM con conseguente attivazione dell'enzima. Tale scoperta suggerisce come l'induzione di alcune modificazioni post-traduzionali, attraverso approcci farmacologici, per sopperire o potenziare ciò che si verifica fisiologicamente, possa rappresentare un ottimo punto di partenza nel

disegno di strategie terapeutiche innovative nei disordini cardiovascolari in generale (Si veda anche la sezione 1.3.3).

1.4.2. Protezione dall'apoptosi

14.2.1. Caratteristiche generali dell'apoptosi

Il termine apoptosi è stato proposto nel 1972 da Kerr (Kerr et al., 1972) a partire dal termine greco che significa “caduta delle foglie e dei petali dei fiori”, per indicare una forma di morte cellulare programmata. Si tratta di un processo ben distinto rispetto alla necrosi cellulare e in condizioni normali contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un sistema.

Una cellula apoptotica, a differenza di quella necrotica, perde rapidamente volume, si condensa, si stacca dalle cellule vicine, si frammenta in una serie di “corpi apoptotici” ed espone sulla membrana dei componenti normalmente non presenti o poco espressi. Questi ultimi vengono riconosciuti dalle cellule fagocitiche vicine che inglobano la cellula morente. Dal momento che non si ha versamento del contenuto citosolico nel mezzo extracellulare, non si ha alcun processo flogistico secondario. Tutto il processo non dura che 1-2 h e colpisce poche cellule del tessuto, rendendone così difficoltosa l'identificazione (Golstein et al., 1991; Majno and Joris, 1995).

Nell'uomo i processi apoptotici sono coinvolti: nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi di tessuti e organi (Kerr et al., 1972), tra cui il sistema nervoso centrale (Naruse and Keino, 1995); nel *turn-over* cellulare (Wyllie et al., 1980); nello spegnimento delle risposte

immunitarie (Chen et al., 1992). Inoltre l'apoptosi è implicata in condizioni patologiche (Thompson, 1995), dove una sua deregolazione può portare a: patologie associate ad un aumento della sopravvivenza e della proliferazione cellulare (diminuzione dell'apoptosi) quali i tumori; o a patologie caratterizzate da un eccesso di morte cellulare programmata, come le malattie virali o neurodegenerative (AIDS, malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi laterale amiotrofica ecc.).

1.4.2.2. NO, eNOS ed apoptosi.

Un interessante aspetto della biologia della eNOS e del NO da essa prodotto è il ruolo nel controllo dell'apoptosi. Come riportato in letteratura il NO svolge un duplice ruolo nella modulazione del processo apoptotico: può infatti, in base alla sua forma, alla concentrazione e al tipo cellulare, sia promuovere che inibire la morte cellulare (Snyder, 1993). Se prodotto ad elevate concentrazioni (dell'ordine di 1-3 mM), il NO con i suoi derivati può avere effetti deleteri per tutte le funzioni cellulari, portando per esempio alla perdita di funzioni enzimatiche, all'alterazione dell'integrità di membrana e a mutazioni del DNA (Chung et al., 2001; Choi et al., 2002; Yung et al., 2004; Fabbri et al., 2005). Invece, a concentrazioni più basse (nM - μ M), in vari sistemi il NO protegge le cellule da morte apoptotica (Kim et al., 1999; Choi et al., 2002).

Per studiare il ruolo del NO nella regolazione dell'apoptosi, Bulotta et al. (2001) hanno utilizzato come modello cellulare cloni

Hela-TetOff con espressione inducibile della eNOS; gli autori hanno osservato che l'induzione dell'enzima causa una parziale protezione dall'apoptosi indotta da TNF- α e hanno dimostrato che tale effetto è mediato da stimolazione della attività della eNOS dal TNF- α stesso. In un successivo lavoro, gli autori hanno analizzato la via tramite la quale il TNF- α stimola l'attività della eNOS, dimostrando che il *pathway* non dipende dal complesso Ca²⁺/CaM ma che comprende l'attivazione di N-SMasi (la SfingoMielinasi Neutra), la produzione di ceramide, l'attivazione di PI3K (*Phosphatidylinositol 3'-kinase*), di Akt e quindi della eNOS (Barsacchi et al., 2003). Viene così a stabilirsi un circuito di feedback tra eNOS/NO e ceramide.

Il ruolo protettivo esercitato dalla eNOS nei confronti dell'apoptosi è stato osservato anche in cellule HUVEC, dove la morte cellulare è stata indotta da elevate concentrazioni di glucosio; l'utilizzo di inibitori (*wortmannin* e *LY294002*) e di mutanti negativi di PI3K ha dimostrato che la via di segnalazione coinvolta nell'attivazione della eNOS è quella PI3K-Akt (Ho et al., 2006).

Nel trattamento terapeutico dei tumori, considerato l'effetto antiapoptotico del NO prodotto dalla eNOS, l'inibizione specifica dell'enzima, da sola o in combinazione con agenti chemioterapici, potrebbe essere una valida opzione per stimolare l'apoptosi nelle cellule tumorali (Ying and Hofseth, 2007).

Il NO esercita gli effetti citoprotettivi attraverso la sua diretta o indiretta interazione con il macchinario apoptotico (Kim *et al.*, 1999; Choi et al., 2002; Manucha and Vallés, 2008). I meccanismi biochimici proposti essere responsabili degli effetti antiapoptotici del NO sono (Fig. 12):

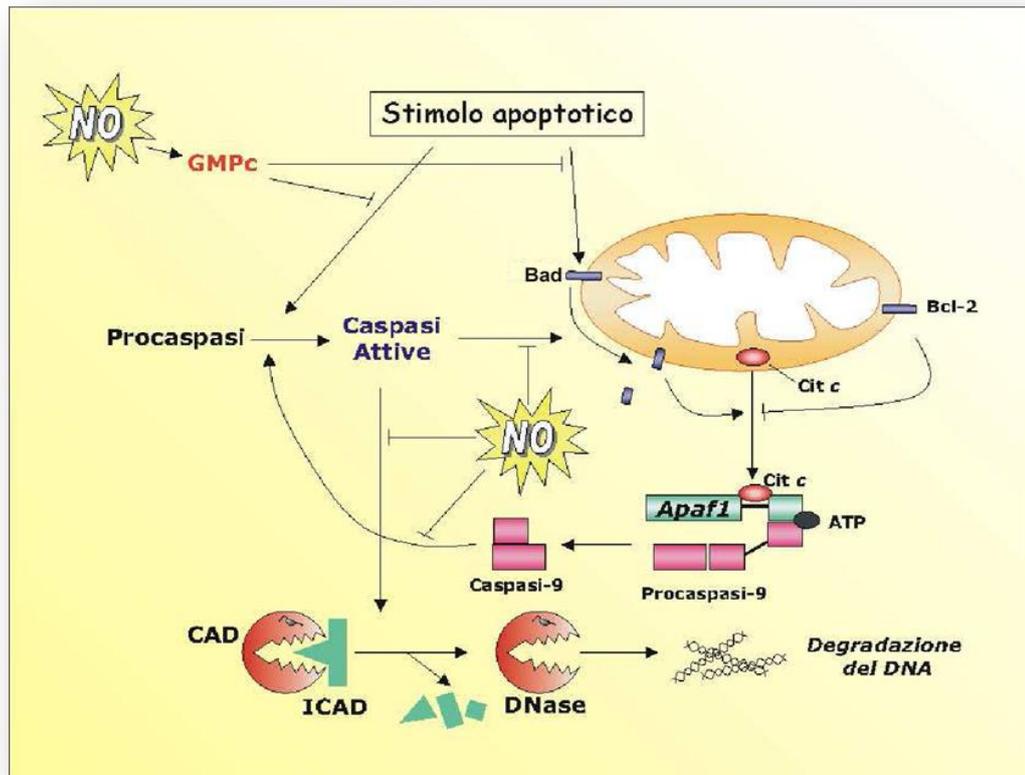


Figura 12. Effetti antiapoptotici del NO. Il NO stimola l'attività della sGC ed induce l'accumulo del secondo messaggero cGMP, il quale inibisce l'attivazione delle caspasi, esecutrici del programma apoptotico, e di Bad un fattore pro-apoptotico. IL NO, inoltre è in grado di S-nitrosilare la cisteina del sito attivo delle caspasi portando alla loro inattivazione. Questo fenomeno impedisce la degradazione della proteina antiapoptotica Bcl-2 ed il rilascio dal mitocondrio del citocromo *c* utile all'attivazione delle caspasi.

-via cGMP: il NO, come detto, è in grado di stimolare l'attività della GCs ed indurre l'accumulo del secondo messaggero cGMP. Come discusso nella sezione 1.4.1., il cGMP attiva i processi di estrusione del Ca^{2+} , e poiché l'aumento di Ca^{2+} citosolico rappresenta un segnale chiave per l'instaurazione del processo apoptotico, l'abbassamento del Ca^{2+} intracellulare potrebbe di per sé avere un effetto anti-apoptotico. E' stato inoltre riportato che la caspasi 3, la principale caspasi "esecutrice" del processo apoptotico è inibita in modo cGMP-PKG-dipendente ma non è stato chiarito se l'azione di PKG sulla caspasi è diretta o indiretta (Kim *et al.*, 1997).

-inibizione della produzione di ceramide: la produzione di ceramide rafforza l'apoptosi indotta da $\text{TNF-}\alpha$. Il NO mediante l'attivazione del c-GMP è in grado di inibire la produzione del ceramide bloccando il processo apoptotico (De Nadai *et al.*, 2000; Bulotta *et al.*, 2001).

-inibizione delle caspasi tramite S-nitrosilazione: tutte le caspasi contengono una singola cisteina nel sito catalitico che è essenziale per la loro attività. Il tiolo della cisteina è suscettibile alle modificazioni redox e può essere S-nitrosilato in presenza di NO (Kim *et al.*, 1997). La reazione della cisteina con il NO può prevenire efficacemente le attivazioni anomale delle caspasi. Il NO è in grado di S-nitrosilare la cisteina del sito attivo delle caspasi esecutrici del programma apoptotico portando alla loro inattivazione (Kim *et al.*, 1997).

-inibizione del rilascio di citocromo c: il rilascio di citocromo *c* è un fattore essenziale nell'attivazione delle caspasi (Jiang and Wang, 2004) ed è notoriamente impedito dall'azione antiapoptotica della proteina Bcl-2. Poiché la stessa Bcl-2 è substrato delle caspasi, la S-nitrosilazione di quest'ultime previene l'inattivazione della funzione

antiapoptotica di Bcl-2 e conseguentemente il rilascio di citocromo c nel citosol (Genaro et al., 1995).

-regolazione dell'espressione di geni antiapoptotici: il NO induce l'espressione di geni citoprotettivi quali quelli codificanti per Hsp70 ed Hsp32, che proteggono gli epatociti dall'apoptosi indotta dal TNF- α e dallo stress ossidativo e nitrosativo (Kim et al., 1995).

1.4.3. Angiogenesi e migrazione

1.4.3.1. Generalità

L'angiogenesi è un processo fisiologico di rimodellamento del tessuto vascolare, caratterizzato dalla formazione di nuovi vasi a partire da vasi preesistenti. L'angiogenesi è attiva durante l'embriogenesi, mentre durante la vita adulta è quiescente o limitata a particolari fenomeni fisiologici come la cicatrizzazione delle ferite, l'ovulazione e il ciclo mestruale (Carmeliet, 2000). Nell'individuo sano l'angiogenesi è regolata dall'equilibrio tra fattori pro-angiogenici [VEGF, il *fibroblast growth factor* (FGF), le angiopoietine, il *transforming growth factor alpha* (TGF- α), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), il *connective tissue growth factor* (CTGF), il *platelet derived-growth factor* (PDGF), TNF- α , e l'interleuchina-8 (IL-8)] ed anti-angiogenici [*pigment epithelium-derived growth factor* (PEDF), il *transforming growth factor beta* (TGF- β), l'angiostatina, l'endostatina, la trombospondina (TSP-1)], e l'allontanamento da tale equilibrio (*angiogenic switch*) è correlato a numerose patologie (Hanahan et al., 1996). La prevalenza di fattori pro-angiogenici (angiogenesi

eccessiva) è associata al cancro, alla retinopatia proliferativa, all'artrite reumatoide ed alla psoriasi (Walsh, 2007). Al contrario, un'angiogenesi insufficiente è alla base di malattie coronariche, ischemia, e ad una ridotta capacità di rigenerazione tissutale (Carmeliet, 2000).

Il processo di angiogenesi richiede: la degradazione della matrice extracellulare; la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali (EC), seguita dall'organizzazione di queste cellule in strutture stabili (Folkman and Shing, 1992; Conway et al 2001).

Durante l'angiogenesi la chemiotassi (migrazione cellulare direzionale) è un evento chiave. Quando le cellule migrano su di una superficie, si osservano molti cambiamenti nella morfologia e nella distribuzione degli organelli interni. Le cellule in risposta agli stimoli migratori, adottano una forma polarizzata in direzione del gradiente chemiotattico: presentano una estensione della membrana plasmatica sul bordo che avanza (*leading edge*) e una stretta "coda" all'estremità posteriore. A questo si accompagna una distribuzione asimmetrica di molecole *signalling*, molecole di adesione cellulare, ma soprattutto un costante rimodellamento dei filamenti di actina nei filopodi, lamellipodi e *stress fibers* (Fukata et al., 2003; Alberts et al., 2008).

Il movimento cellulare è caratterizzato da numerose tappe, riassumibili in sei fasi principali (Alberts et al., 2008; Lamalice et al., 2007) (Fig. 13):

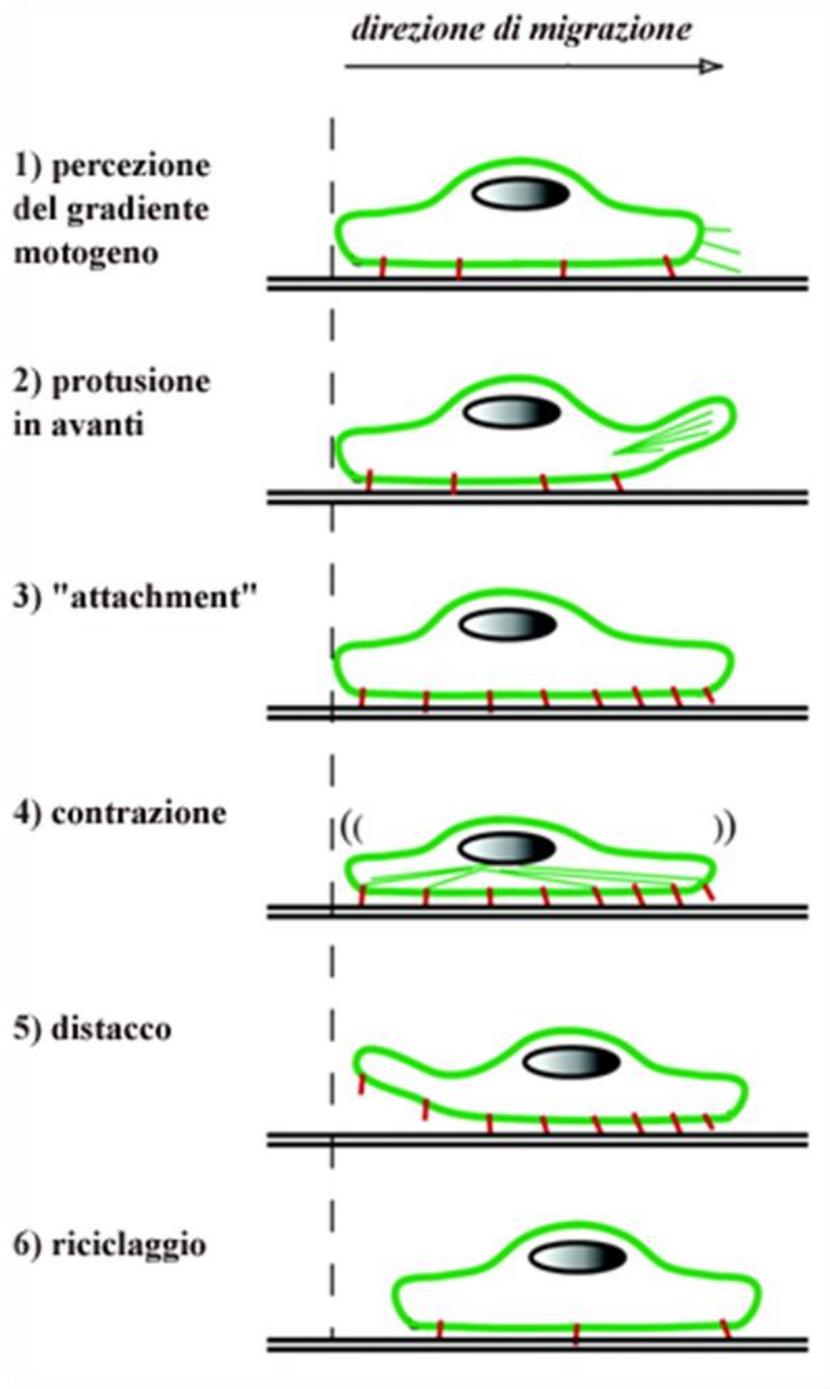
1. percezione del segnale motogeno da parte dei filopodi (proiezioni di membrana contenenti filamenti di actina riuniti in stretti fasci);

2. protrusione della membrana plasmatica sul bordo avanzante, grazie alla formazione di lamellipodi e pseudopodi (queste due strutture citoscheletriche sono caratterizzate da una fitta rete di filamenti di actina e si differenziano dai filipodi per il modo in cui l'actina è organizzata);
3. *attachment*, in cui le interazioni iniziali integrina-elementi della matrice extracellulare, in seguito al reclutamento di componenti citoscheletrici, maturano in strutture altamente specializzate, i “contatti focali”, che rafforzano e stabilizzano le adesioni e allo stesso tempo forniscono la base per la spinta contrattile in avanti;
4. contrazione del corpo cellulare in avanti (fase di trazione) mediata da proteine motrici quali la miosina II, associata ai filamenti di actina nelle *stress fibers*. Tali strutture si ancorano alle adesioni focali e trascinano il retro della cellula verso il *leading edge*;
5. disassemblaggio delle vecchie adesioni focali e retrazione della coda;
6. riciclaggio dei componenti di adesione e di segnalazione.

1.4.3.2. Ruolo della eNOS e del NO da essa prodotto nella migrazione delle cellule endoteliali

L'attività della eNOS e la produzione del NO sono fondamentali nelle cellule endoteliali per l'acquisizione di un fenotipo

Figura 13. Fasi principali della migrazione cellulare. La migrazione delle cellule endoteliali può essere suddivisa in sei eventi successivi: (1) percezione, da parte dei filipodi dello stimolo chemiotattico; (2) protrusione della membrana in avanti, che coinvolge la formazione di lamellipodi; (3) attacco delle protusioni alla matrice extracellulare mediante la formazione delle adesioni focali; (4) contrazione del corpo cellulare mediata dalle *stress fibers* e progressioni in avanti; (5) rilascio del retro della cellula grazie alle forze di trazione esercitate dalle fibre di stress e al disassemblaggio delle vecchie adesioni focali; (6) riciclaggio delle molecole di adesione e di segnalazione. (Modificata da Lamalice et al., 2007).



migratorio in risposta a stimoli quali il VEGF, le endoteline, la S1P o la sostanza P (Ziche et al., 1994; Ziche et al., 1997; Noiri et al., 1998; Morales-ruiz et al., 2001).

Il ruolo del NO come mediatore degli effetti angiogenetici del VEGF è stato ampiamente visualizzato in diversi esperimenti sia *in vitro* che *in vivo*: in topi *knockout* per la eNOS (eNOS (-/-) sia la permeabilità VEGF-mediata, che l'angiogenesi e la motilità delle cellule endoteliali è notevolmente ridotta (Murohara et al., 1998; Fukumura et al., 2001). Veicolando (mediante adenovirus) il cDNA della eNOS nei muscoli di un arto ischemico di ratto, vi si osserva un significativo aumento della perfusione sanguigna e della densità capillare in quel distretto (Kawasaki et al., 2003). Con esperimenti di transfezione di cellule endoteliali coltivate è stato visto che un mutante fosfomimetico della eNOS (in cui la serina in posizione 1177 è sostituita con un residuo di acido aspartico: S1177D) stimola le cellule a migrare, mentre un mutante non fosforilabile (in cui la serina in posizione 1177 è sostituita con un residuo di alanina: S1177A) inibisce la migrazione indotta da VEGF (Dimmeler et al., 2000).

Il VEGF, tramite legame ai suoi due recettori *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1* (VEGFR1 o FLT1) e *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR2 oppure KDR), attiva il *pathway* PI3K/Akt; Akt a sua volta può fosforilare la eNOS in Ser1177, con conseguente attivazione della eNOS ed aumento della produzione di NO (Noiri et al., 1997; Ziche et al., 1994; Goligorsky et al., 1999). L'inibizione della eNOS o l'overespressione di un dominante negativo di Akt, inibisce la migrazione cellulare indotta da VEGF; al contrario la overespressione di una forma costitutivamente

attiva di Akt è sufficiente per indurre la migrazione cellulare in assenza di VEGF (Dimmeler et al., 2000; Morales-Ruiz et al., 2000; Ackah et al 2005).

E' stato riportato che il VEGFR2 è localizzato sulla membrana plasmatica a livello delle caveolae ed è associato con la cav-1. E' stato quindi suggerito che un secondo meccanismo di attivazione della eNOS da parte del VEGF è basato sullo spiazzamento della eNOS da cav-1 da parte del recettore attivato (Labrecque et al., 2003; Bauer et al., 2005).

Chiariti i meccanismi di attivazione della eNOS da parte di agonisti motogeni, rimane da discutere le modalità tramite le quali il NO prodotto aumenta la migrazione delle cellule endoteliali. Numerosi studi sono stati indirizzati ad approfondire i meccanismi d'azione attraverso cui il NO esercita i suoi effetti sui processi angiogenetici e sulla migrazione. La maggior parte degli studi hanno portato alla conclusione che molti degli effetti angiogenetici sono mediati dalla via cGMP-sGC (Ziche et al., 1997; Parenti et al., 1998; Pyriochou et al., 2006; Morbidelli et al., 2010), anche se è stato osservato che il NO agisce anche mediante meccanismi via cGMP-indipendente. In uno studio di Cudmore et al. (2006) è stato osservato che l'angiogenesi VEGF-mediata richiede l'attivazione della fosfolipasi C γ (PLC γ) in una via indipendente dal *pathway* sGC-cGMP-PKG. Sebbene il NO possa stimolare l'angiogenesi anche in assenza della sGC, l'espressione di questo enzima in cellule che normalmente non lo contengono ne aumenta gli effetti angiogenetici (Pyriochou et al., 2007).

E quali sono i target finali tramite i quali NO esercita i suoi effetti angiogenetici? Kawasaki et al. (2003) hanno ipotizzato che il

NO esercita i suoi effetti angiogenetici attraverso la via PI3K/Akt in modo cGMP-dipendente: infatti, l'uso di donatori di NO, in cellule endoteliali, aumenta i livelli di fosforilazione di Akt e la sua attività, mentre il co-trattamento con l'inibitore di PI3K (la *wortmannina*) reverte tale effetto. In questo modo verrebbe a costituirsi un'ansa di feedback positivo tra Akt ed eNOS.

Un altro target possibile è costituito dalle integrine. Secondo quanto riportato dal gruppo di ricerca Murohara et al., (1999), il NO regola positivamente l'espressione delle integrine $\alpha v\beta 3$, molecole di adesione che facilitano l'angiogenesi delle cellule endoteliali.

Un altro gruppo (Goligorsky et al., 1999) ha studiato il coinvolgimento del NO nella regolazione delle adesioni focali. Osservando il disegno di increspature lasciate da cellule HUVEC su un foglietto di silicone, si è concluso che la somministrazione del NO tramite donatori risulta in un abbassamento delle forze di trazione esercitate dalle adesioni focali e dalle *stress fibers*. L'immunofluorescenza di cellule HUVEC trattate con donatori di NO, ha rilevato una diminuita fosforilazione in tirosina della *Focal adhesion kinase* (FAK), nonché un diminuito reclutamento della paxillina alla adesioni focali. Secondo gli autori questo dimostrerebbe che il NO induce il distacco delle cellule dai punti di adesione promuovendo così il movimento cellulare. Inoltre l'effetto del NO non è direzionale: la direzionalità della chemiotassi sarebbe data invece dal gradiente di concentrazione del fattore motogeno.

Recentemente è stato osservato che *in vivo* il NO promuove la migrazione cellulare tramite azione nella matrice extracellulare: mediante nitratura infatti il NO attiva la MMP13 favorendo

indirettamente la migrazione delle cellule endoteliali (si veda la sezione 1.1) (Lopez-Rivera et al., 2005; Lizarbe et al., 2008).

Anche, l'interazione hsp90-eNOS è importante nel mediare la risposta angiogenica (Brouet et al., 2001). In numerosi studi è stata dimostrata l'importanza di questa interazione (Chen et al., 2004; Sun e Liao, 2004; Duval et al., 2007; Miao et al., 2008), indicando che questo onnipresente chaperone svolge un ruolo chiave nel regolare gli effetti mediati dal NO nell'angiogenesi e nella migrazione cellulare.

Da quanto detto, nonostante la mole di lavoro che è stato condotto sul ruolo del NO nell'angiogenesi e sulla migrazione cellulare in particolare, il meccanismo tramite il quale il NO esercita i suoi effetti non sono ancora stati del tutto chiariti. Specificamente, non è chiaro se gli effetti del NO dipendano da una azione diretta sull'apparato della motilità cellulare o dall'amplificazione di vie di trasduzione del segnale comunque operanti. Inoltre, gli effetti del NO sono diversi in cellule diverse. Per esempio, il NO inibisce piuttosto che stimolare la motilità di cellule muscolari lisce (Dubey et al., 1995) e in alcuni studi è stato riportato un suo effetto inibitorio anche sulle cellule endoteliali (Lau et al., 1996; Murohara et al., 1999).

I risultati discordanti di questi studi sono probabilmente dovuti alla diversità degli stimoli utilizzati per generare NO, con conseguenti differenti modalità di attivazione della eNOS e di cinetica di generazione del gas. Inoltre, in letteratura sono ben noti gli effetti stimolatori del NO sulla migrazione cellulare quando è prodotto acutamente, mentre poco studiati sono gli effetti dovuti ad una sua produzione cronica a bassi livelli. La distinzione tra esposizione acuta e cronica al NO è un punto importante la cui risoluzione potrebbe

aiutare a risolvere le complessità del ruolo del NO nella migrazione cellulare.

1.5. Scopo della tesi

Benchè sono noti in letteratura gli effetti stimolatori del NO, sintetizzato dalla eNOS, sulla migrazione cellulare quando prodotto acutamente, poco studiati sono gli effetti dovuti ad una sua produzione cronica a bassi livelli.

Scopo del mio lavoro, dunque durante gli anni del Corso di Dottorato, è stato quello di:

- valutare gli effetti dell'espressione cronica della eNOS sulla migrazione cellulare;
- chiarire i meccanismi d'azione tramite i quali il NO prodotto cronicamente influenza la capacità migratoria delle cellule;
- analizzare mediante tecniche proteomiche gli effetti della NO basale sul fenotipo cellulare.

Per le mie indagini ho tratto vantaggio dall'utilizzo di una linea cellulare HeLa-TetOff sviluppata nel mio laboratorio (Bulotta et al., 2001). Tale linea esprime stabilmente la eNOS bovina sotto un promotore sensibile alla tetraciclina, di modo che è possibile indurre l'espressione dell'enzima semplicemente rimuovendo l'antibiotico dal mezzo di coltura. Poiché le cellule HeLa non producono eNOS endogenamente, la linea cellulare eNOS-HeLa-TetOff ci ha permesso di valutare gli effetti dell'espressione di livelli fisiologici dell'enzima in un sistema cellulare controllato. In parallelo ho condotto

esperimenti su cellule HUVEC, che esprimono endogenamente la eNOS e su cellule HeLa non transfettate trattate con donatori di NO. Il confronto dei dati generati in questi tre sistemi ha rafforzato il significato dei risultati ottenuti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Colture cellulari

Sono state utilizzate cellule HeLa-TetOff non transfettate (HeLa-TetOff NT), cellule HeLa-TetOff transfettate con un plasmide contenente il cDNA della eNOS bovina e selezionate con gli opportuni antibiotici (Bulotta et al., 2001) o cellule HUVEC.

Le cellule HeLa-TetOff sono state coltivate in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) supplementato con Tet-System Fetal bovine serum (FBS-Clontech), L-glutamina (2 mM), penicillina (50 UI/ml), streptomicina (50 µg/ml), G418 (100 µg/ml) e mantenute a 37 °C in incubatore al 5% di CO₂.

Il “*TetOff system*” è un sistema nel quale l'espressione di un singolo gene, nel nostro caso quello per la eNOS, è accesa quando la tetraciclina o un suo derivato, come la doxiciclina (dox), sono assenti dal mezzo di coltura.

Le cellule HeLa-TetOff stabilmente transfette con eNOS bovina (cellule eNOS-HeLa-TetOff) sono state coltivate come sopra, aggiungendo al mezzo dox (100 ng/ml) e igromicina B (100 µg/ml). Per indurre le cellule TetOff ad esprimere la eNOS, le cellule sono state coltivate in assenza di dox per 3-4 giorni. Le cellule venivano tripsinizzate e piastrate in una Petri nuova in assenza di dox. Dopo 24 h, il mezzo veniva sostituito con mezzo fresco e privo di dox; le cellule venivano utilizzate per esperimenti dopo altri 2-3 giorni di coltura.

Le cellule HUVEC sono state isolate da cordoni ombelicali mediante digestione con collagenasi, come descritto da Jaffe et al., (1973). Le cellule sono state coltivate in 199 medium, supplementato

con 20% di FBS, il fattore di crescita endoteliale (25 µg/ml) ed eparina (50 µg/ml) dal secondo al settimo passaggio.

2.2. Lisi cellulare - quantificazione delle proteine e del DNA

Per lisare le cellule, è stato usato un tampone contenente 2% SDS, Tris-HCl 5mM pH 6,8 ed un cocktail di inibitori delle proteasi Roche Complete; il tampone, riscaldato a 100°C, è stato aggiunto dopo aver lavato le cellule con PBS. Dopo aggiunta di β-mercaptoetanololo (concentrazione finale 2%), i campioni sono stati bolliti per 5 minuti. Spesso si riscontrava una notevole viscosità dei campioni a causa del DNA ancora integro, per cui i campioni venivano siringati ripetutamente con delle siringhe da insulina, e congelati e scongelati per due volte. Nel caso di esperimenti finalizzati a valutare i livelli di Akt e pAkt, le cellule, cresciute fino ad ottenere un monostrato confluyente, sono state lavate con PBS freddo e lisate con un tampone riscaldato a 100°C contenente SDS 2%, Tris-H₃PO₄ 6,25 mM pH 6,8, NaF 10 mM, inibitori delle proteasi e DTT 50mM.

La quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante l'utilizzo del saggio BCA reagent (PIERCE), mentre per quella del DNA è stato utilizzato il kit fluorescente Hoechst (Bio-rad) (Labarca *et al.*, 1980). La fluorescenza del DNA è stata misurata in piastre a 96 pozzetti mediante l'utilizzo dello spettrofluorimetro Perkin Elmer Victor-2 1420-012, usando come standard DNA di timo bovino (*calif thymus*).

2.3. Immunoblot

Questa tecnica, utilizzata per valutare le quantità di proteine prese in esame in questo studio, consiste nella separazione di polipeptidi contenuti in un lisato cellulare (oppure una frazione di lisato) su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, ossia elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato), seguita da trasferimento su una membrana di un materiale adatto, come il nylon, la nitrocellulosa o il polivinilidene fluoruro (PVDF) e rilevazione della proteina di interesse con un anticorpo specifico. Più precisamente, ho proceduto come descritto qui di seguito.

Ai lisati preparati come descritto nella sezione precedente è stato aggiunto glicerolo a una concentrazione finale di 2%. I campioni sono stati quindi caricati sul gel di acrilamide/bis-acrilamide al 9% e fatti migrare per 1h circa a 100 V. L'elettroforesi in sodio dodecil solfato (SDS) è un metodo analitico che permette di separare, grazie all'azione di un campo elettrico costante e dell'“effetto setaccio” dovuto alle maglie di acrilammide, molecole diverse in base al peso molecolare. L'SDS è un denaturante proteico dotato di una testa polare a carica negativa grazie alla quale rende omogenea la carica netta delle singole proteine. Il suo utilizzo durante il trattamento del campione, nel tampone di corsa e nel gel di poliacrilammide, assicura quindi una separazione delle proteine solo in base al peso molecolare.

Successivamente le proteine presenti sul gel sono state trasferite su PVDF, 0,45 μm (GE-Healthcare), supporto capace di mantenere adsorbite le molecole separate in precedenza. Il trasferimento avviene in presenza di tampone contenente Tris 25 mM, glicina 192 mM e

metanolo al 20%, ottimizzato mediante l'applicazione di corrente di 250 mA per circa 2h e mantenendo l'apparecchiatura a temperature basse ($\sim 4^{\circ}\text{C}$).

Trascorso il tempo del trasferimento, le proteine sono state colorate provvisoriamente con Amido Black e, dopo un breve lavaggio con PBS, la membrana è stata incubata con una soluzione contenente latte scremato al 5%, PBS, Triton-X100 (0.1%), per eseguire il bloccaggio dei siti aspecifici. Trascorso il periodo di un'ora è stato aggiunto l'anticorpo primario e il filtro è stato lasciato in incubazione tutta la notte in camera fredda ($+4^{\circ}\text{C}$) sotto lenta agitazione. Trascorsa l'incubazione con l'anticorpo primario, la membrana è stata lavata 3 volte con PBS/Triton-X100 (0.1%) ed incubata con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi per 1h a temperatura ambiente sotto lenta agitazione. Successivamente è stata lavata per 3 volte con la stessa soluzione usata precedentemente ed altre 3 volte con una soluzione di Tris-HCl 50 mM pH 7.4, per eliminare il detergente Triton-X100. La presenza degli anticorpi contro la proteina di interesse, è stata messa in evidenza con il metodo delle chemiluminescenza ECL (Amersham). Il filtro è stato esposto per un minuto al sistema di rivelazione ECL costituito da H_2O_2 e luminolo (substrato chemiluminescente). La perossidasi riduce l' H_2O_2 liberando 2O^- che, andando ad ossidare il luminolo, lo convertono in un composto instabile, che emette luce nel momento di decadere a una forma stabile. La luce emessa è in grado di impressionare una lastra radiografica che, una volta sviluppata, dà un'indicazione della quantità di proteina di interesse presente nel campione.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti eNOS monoclonale (BD), diluizione 1/1500; anti β -actina monoclonale (Sigma), diluizione 1/5000; anti-Akt policlonale (Cell Signaling Technology), diluizione 1/1000; anti-phospho-Akt policlonale (Cell Signaling Technology), diluizione 1/1000; anti-HIF1 α monoclonale (Santa Cruz) diluizione 1:500. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi secondari: anti-IgG di topo coniugato con perossidasi (Clontech), diluizione 1/1500 se contro la eNOS, diluizione 1/5000 se contro la β -actina, diluizione 1/2000 se contro HIF1 α ; anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi (Clontech), diluizione 1/2000 sia se contro Akt che contro pAkt. Dopo lo sviluppo, le lastre sono state digitalizzate ed analizzate con il software IMAGE J. L'intensità delle bande è stata determinata utilizzando una tabella di calibrazione per convertire l'intensità della scala di grigio in unità di densità ottica.

2.4. Saggio di proliferazione

Per valutare quantitativamente le proprietà di proliferazione, le cellule eNOS-HeLa-TetOff, indotte e non indotte ad esprimere l'enzima sono state staccate con tripsina (GIBCO, BRL), risospese in DMEM, contate all'interno di una cameretta di Burker con un microscopio a contrasto di fase Nikon e piastrate in multiwell da 6 alla densità di 1×10^5 cellule/per pozzetto. Le multiwell sono state poi incubate a 37°C per 24h nell'incubatore termostato equilibrato con 5% CO₂. Dopo l'incubazione, le cellule sono state staccate con

tripsina, risospese in DMEM e contate. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

2.5. Saggio di adesione

Le cellule eNOS-HeLa-TetOff, indotte e non indotte ad esprimere l'enzima, sono state coltivate per 72h fino ad ottenere un monostrato confluyente in piastre da 100 mm di diametro. Quindi sono state staccate con PBS contenente EDTA 0,53 mM, risospese in mezzo completo e piastrate alla densità di 600 cellule/mm² in piastre da 60 mm pretrattate con mezzo di coltura contenente 10% siero. Le piastre sono state incubate, e a specifici intervalli di tempo (Fig. 27), lo stesso campo è stato osservato e fotografato usando un microscopio invertito (Leica, DMI 4000B), con un obiettivo ad ingrandimento 20x.

L'adesione è stata anche valutata quantitativamente mediante colorazione con il Crystal Violet. Le cellule, staccate con tripsina, risospese in DMEM e contate, sono state piastrate in multiwell da 24 pretrattate con mezzo completo, alla densità di $2,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto. A specifici tempi, i pozzetti sono stati lavati con PBS addizionato di CaCl₂ e MgCl₂, per rimuovere le cellule non adese. Le cellule che rimanevano nei pozzetti (cellule adese) sono state quindi fissate con paraformaldeide al 4% in 120 mM di sodio fosfato, pH 7,4, per 15 minuti a temperatura ambiente e successivamente colorate con una soluzione Crystal Violet (0,1% w/v in 20% v/v metanolo) per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver rimosso la soluzione e

lavato le cellule con acqua, il colorante legato alle cellule è stato solubilizzato con 10% acido acetico e quindi quantificato misurando l'assorbanza a 560 nm con il Multi-label Counter Victor 2 WALLAC 1420. L'intensità dell'assorbanza è proporzionale al numero di cellule adese nei pozzetti. In ogni esperimento, l'adesione è stata valutata su campioni in quadruplicato.

2.6. Saggio di migrazione di Boyden

Il saggio di Boyden è un saggio di chemiotassi in cui le cellule migrano nella direzione di un gradiente motogeno.

Tale saggio è stato condotto in un apparato di chemiotassi, detto Transwell (Costar) (Fig. 14). Le transwell sono delle piastre multipozzetto contenenti un inserto dotato di un filtro di policarbonato, con pori del diametro di 8 μm ed area di 0,33 cm^2 . Pur mantenendo lo stesso principio di migrazione delle camerette di Boyden, le Transwell eliminano problemi tecnici riscontrati nell'uso delle classiche camerette di Boyden. Risultano infatti più maneggevoli, in quanto sono congegnate in modo tale che, nel loro allestimento, si eviti la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la camera inferiore, bolle che possono interferire con il processo di migrazione. Le figure (14 e 15) mostrano un modello di Transwell ed in modo schematico il suo principio di funzionamento.

L'apparato è stato preparato aggiungendo 600 μl di mezzo di chemiotassi (DMEM contenente siero al 10%) nella camera inferiore. Le cellule da analizzare sono state staccate con tripsina (GIBCO,

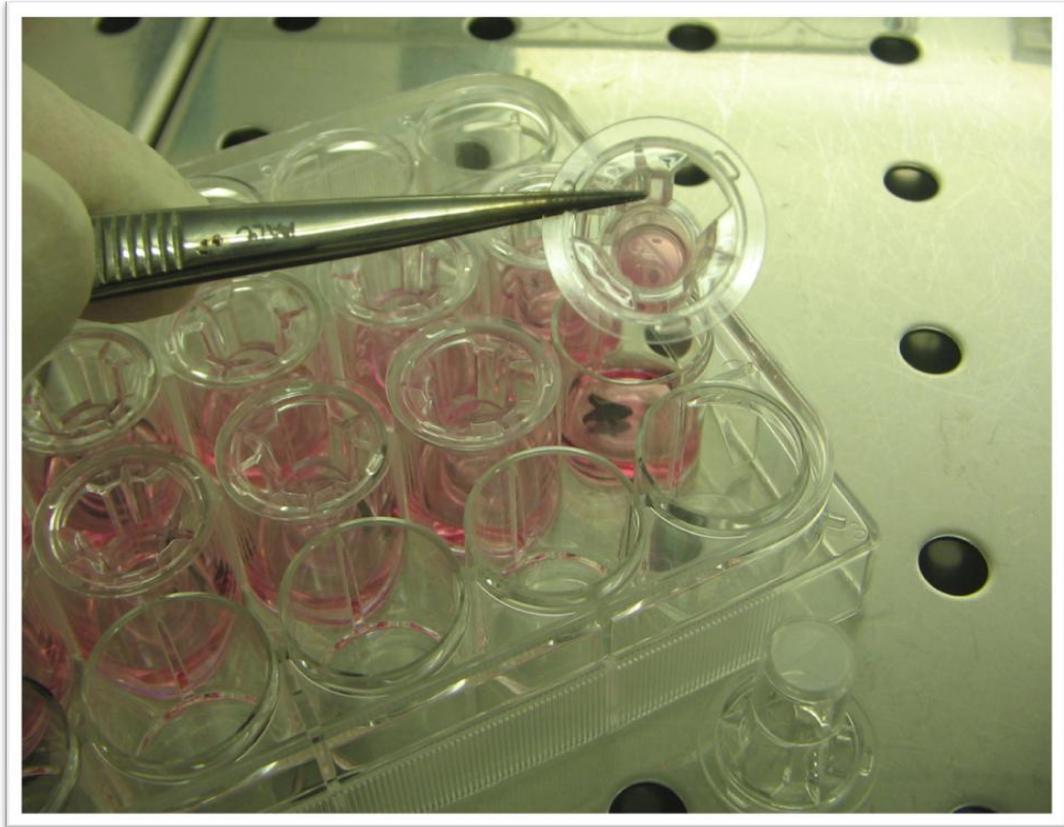


Figura 14. Apparato per saggi di migrazione. La foto mostra l'apparato di chemiotassi Transwell (Costar) contenente gli inserti dotati di filtro. I filtri di policarbonato presentano pori da 8 μm che permettono alle cellule di migrare dalla camera superiore a quella inferiore, verso uno stimolo motogeno.

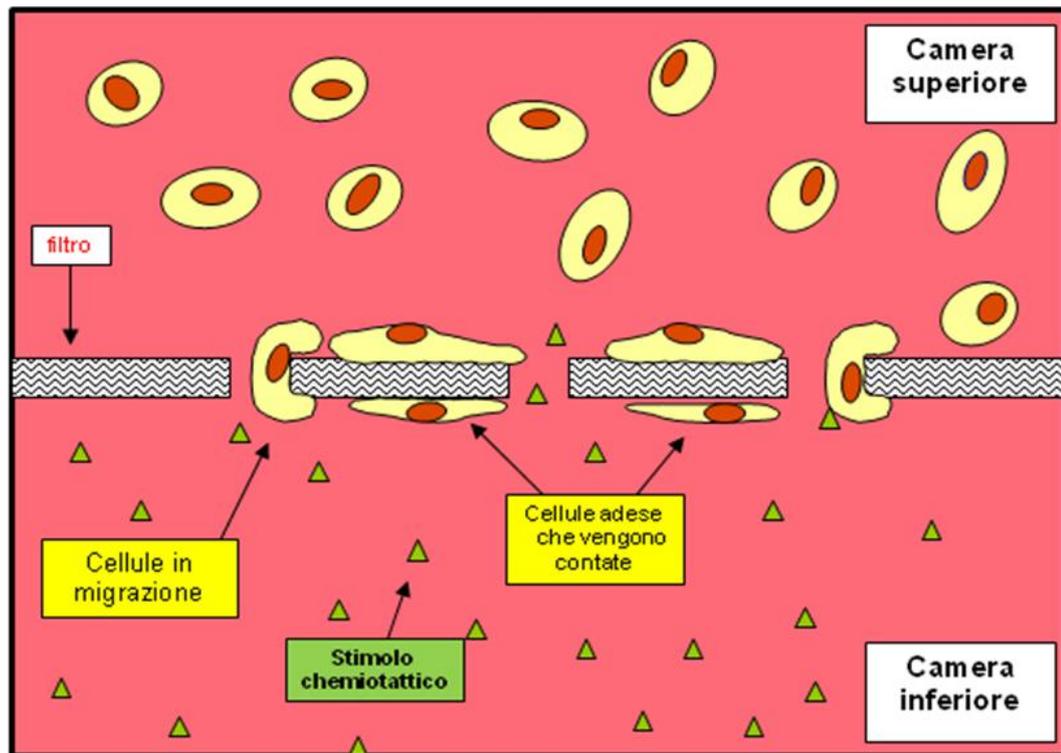


Figura 15. Illustrazione del meccanismo di funzionamento della Transwell. Le cellule sono poste nella cameretta superiore e lasciate depositare sul filtro di policarbonato per azione della forza di gravità. Nella cameretta inferiore non sono inserite cellule, ma è posto un mezzo contenente l'agente chemiotattico. Dopo un periodo di tempo variabile le cellule migrano attraverso i pori, guidate dalle sostanze presenti nel mezzo della camera inferiore. Alla fine dell'esperimento le cellule sono rimosse dal lato superiore del filtro, mentre quelle sul lato inferiore vengono fissate, colorate e poi contate.

BRL), risospese in DMEM, contate e centrifugate. Quindi sono state lavate in DMEM privo di siero, ricentrifugate e risospese ancora in DMEM privo di siero contenente albumina sierica bovina (BSA) all'1%, alla densità di 6×10^5 cellule/ml. Le cellule sono state quindi ricontate, per verificare l'accuratezza della risospensione, e 6×10^4 cellule (100 μ l), sono state inserite nella cameretta superiore. Le transwell sono state poi incubate a 37°C per i tempi specificati nelle didascalie delle figure nell'incubatore termostato equilibrato con 5% CO₂. Dopo l'incubazione, la faccia superiore del filtro è stata pulita con un *cotton-fiocc* per eliminare le cellule non migrate. Quindi i filtri, rimossi dalle camerette, sono stati fissati e colorati con Diff-Quick (VWR Scientific Products, Bridgeport, NJ, USA). Il numero di cellule migrate è stato determinato contando le cellule presenti su 8 campi non sovrapposti attraverso un obiettivo ad ingrandimento 10x, mediante un microscopio Leica modello DM LB2. L'oculare utilizzato conteneva un reticolo per conte. Ogni punto sperimentale rappresenta la media di 3 filtri. La migrazione è stata espressa come percentuale di cellule migrate per mm².

Per i saggi di migrazione con le HUVEC, sono state utilizzate camere di Boyden modificate (multiwell con 48 pozzetti) come descritto da Cattaneo et al., (2008). I filtri utilizzati (policarbonato, con pori del diametro di 8 μ m), pre-trattati con collagene tipo IV, erano posizionati sopra la camera inferiore contenente 199 medium addizionato di 10% di FBS o 25 ng/ml VEGF (+ 1% di BSA) utilizzati come fattori motogeni. Le cellule sono state risospese in 199 medium contenente albumina sierica bovina all'1% (BSA), e 5×10^4 cellule sono state inserite nella cameretta superiore. Dopo 6 ore di

incubazione a 37°C, il filtro è stato rimosso e le cellule sono state fissate, colorate e contate come descritto per le cellule HeLa. Tutti gli esperimenti di migrazione cellulare sono stati eseguiti in triplicato.

2.7. Trattamenti con farmaci

Tutti i farmaci sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): le cellule eNOS-HeLa TetOff sono state trattate con L-NAME per 48h prima del saggio di migrazione. Il farmaco in soluzione acquosa (500 mM stock) è stato usato alla concentrazione finale di 1 mM. Trascorse le prime 24h di trattamento, il mezzo veniva sostituito con del mezzo fresco contenente l'inibitore.

2,2'-(Hydroxynitrosohydrazino)bis-ethanamine (DETA-NO): le cellule HeLa-TetOff NT sono state incubate con DETA-NO, alle concentrazioni indicate nelle figure 21 e 22, per due giorni, cambiando il mezzo dopo 24h. La soluzione "stock" 10 mM e le varie diluizioni in PBS sono state preparate 20 min prima di aggiungerle alle cellule.

1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ): la soluzione del farmaco (4,5 mM) in dimethylsolfoossido è stata diluita nel mezzo di coltura ed usata alla concentrazione finale di 1 μM. Le cellule sono state trattate con il farmaco per 48 h prima del saggio di migrazione, cambiando il mezzo dopo 24h. Il campione di controllo è stato trattato con un volume uguale di vettore.

8-Br-cGMP: le cellule HeLa TetOff non transfettate sono state incubate, con questo analogo del cGMP alle concentrazioni specificate, partendo da una soluzione 300 mM in PBS, per 48h, cambiando il mezzo dopo 24h.

2.8. Immunofluorescenza

Le cellule HeLa e le cellule HUVEC usate per immunofluorescenza sono state coltivate su vetrini coprioggetto non pretrattati, o rivestiti di gelatina, rispettivamente. Dopo due lavaggi con PBS (nel caso dei cloni HeLa) o con PBS supplementato di $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (nel caso delle cellule HUVEC), le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in una soluzione di sodio fosfato 0.120 M pH 7.4, per 20 minuti a 37°C, e successivamente lavate con PBS. Dopo due lavaggi con una soluzione alto sale (HS = NaCl 500 mM tampone sodio fosfato pH 7.4 20 mM), le cellule sono state permeabilizzate nel tampone ad alto sale contenente Triton-X-100 0,3% e gelatina allo 0,2%, per 30 minuti a temperatura ambiente in una camera umida, come descritto in De Silvestris et al., (1995).

Dopo la permeabilizzazione, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo primario eNOS (vedi sopra) oppure con un anticorpo policlonale anti-complesso III (Raimondi et al., 2006) nello stesso tampone usato per la permeabilizzazione, per 2h a temperatura ambiente. All'incubazione con l'anticorpo primario sono seguiti cinque lavaggi con HS, e l'incubazione con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 antimouse IgG (Molecular Probs) dil. 1:400 e Alexa Fluor 555 antirabbit IgG (Molecular Probs) dil. 1:400 diluito sempre

nel tampone di permeabilizzazione, per 1h a temperatura ambiente. Infine, dopo cinque lavaggi con HS ed un lavaggio con PBS, i vetrini sono stato montati su un vetrino portaoggetto usando una soluzione di montaggio contenente PBS, glicerolo 70%, e para-fenilen-diammina 0.1%.

Le cellule sono state osservate utilizzando un microscopio confocale Leica modello DM-IRB/TC-SP2 e le immagini sono state acquisite con un obiettivo 63x ad immersione ad olio (apertura numerica 1.32) a 1024x1024 pixel di risoluzione. Le immagini sono state composte usando il software Adobe Photoshop 6.0.

2.9. Misura del potenziale di membrana mitocondriale

La rilevazione del potenziale di membrana è stata eseguita mediante colorazione delle cellule con *TetraMethyl Rhodamine Methylester* (TMRM) un marcatore fluorescente che si accumula nei mitocondri in modo dipendente dal potenziale a cavallo della membrana interna. Questa sonda fluorescente è rilevabile mediante citofluorimetria. Attraverso l'utilizzo del citofluorimetro a flusso (FACScan, Becton Dickinson), interfacciato con postazione PC dotata di software *CellQuest Pro*, è stato possibile misurare il potenziale di membrana mitocondriale esaminando 50.000 eventi.

Le cellule eNOS-HeLa-TetOff, indotte e non indotte ad esprimere l'enzima, sono state coltivate per 72h, e, dopo un lavaggio rapido con PBS, sono state staccate con tripsina, risospese in DMEM e centrifugate. Le cellule sono state quindi risospese in DMEM privo

di siero, contate e posizionate negli appositi tubi per l'analisi citofluorimetrica alla densità di 5×10^4 cellule/ml. Dopo aggiunta di Hepes 25 mM pH 7,2 e ciclosporina H (CsH) 1,6 μ M le cellule sono state lasciate in incubazione nel bagnetto a 37°C per 30 min. Il trattamento con la ciclosporina è stato fatto per inibire la P-glicoproteina della membrana plasmatica che altrimenti inibirebbe l'accumulo di TMRM all'interno delle cellule (Angelin et al., 2007). A questo punto le cellule sono state trattate con TMRM (stock 20 μ M in DMSO) alla concentrazione finale di 7 nM per 30 minuti a 37°C. In esperimenti preliminari, abbiamo determinato che questa concentrazione è ottimale per rilevare lo stato di polarizzazione della membrana mitocondriale ed evitare artefatti dovuti a saturazione del sistema. Il citofluorimetro è stato calibrato con le cellule così trattate. Dopo questa prima misurazione, agli stessi tubi è stata aggiunta oligomicina, in soluzione di etanolo (5 mM stock) usata alla concentrazione finale di 6 μ M, e la lettura è stata effettuata dopo incubazione di 30 minuti a 37°C. Infine le cellule sono state trattate con idrazone fenilico del cianuro di carbonile di p-trifluoromethossile (FCCP) in soluzione di etanolo (1 mM stock) usato alla concentrazione finale di 4 μ M e la lettura è stata effettuata immediatamente. L'oligomicina, inibendo l'ATP sintasi, porta al valore massimo il potenziale mitocondriale (e quindi la lettura FACS). Invece l'FCCP, disaccoppiando la fosforilazione ossidativa, causa la depolarizzazione della membrana interna con conseguente perdita della fluorescenza. La posizione relativa del picco di fluorescenza delle cellule non trattate rispetto alle cellule trattate con le due sostanze è una misura del grado di polarizzazione della membrana

mitocondriale: cioè, più vicino è la fluorescenza a quella rilevata dopo trattamento con oligomicina, più è polarizzata la membrana mitocondriale (Angelin et al., 2007).

2.10. Proteomica

La proteomica viene utilizzata per l'identificazione di tutte le proteine presenti in un campione con la conseguente definizione del profilo d'espressione proteico in seguito a stimoli farmacologici, chimici e fisici, l'analisi delle modifiche posttraduzionali e non da ultimo la comprensione delle interazioni proteina-proteina.

Per analizzare i cambiamenti nel profilo di espressione proteica in cellule HeLa-TetOff cronicamente esposte a bassi livelli di NO, ho iniziato un'analisi proteomica mediante elettroforesi bidimensionale di lisati cellulari. Questa analisi è tutt'ora in corso e presento in questa tesi i dati preliminari ottenuti.

2.10.1. Preparazione dei campioni e separazione in 2-D

L'elettroforesi bidimensionale combina l'isoelettrofocalizzazione (IEF) che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico, con la SDS-PAGE, in cui la separazione avviene in base alla massa.

Per la preparazione degli estratti proteici, le cellule cresciute fino ad ottenere un monostrato confluento, sono state lavate con PBS

freddo e lisate con un tampone contenente Tris-HCl 5 mM pH 8.8, Triton 2% ed inibitori delle proteasi. Dopo aggiunta di DNAasi (Sigma D4527 20000u/580 μ l), i campioni, sono stati posti sulla ruota in camera fredda (+4°C) per tutta la notte. Dopo centrifugazione (2000 g a 4°C per 10 min), è stato prelevato il sovrantante, il cui contenuto proteico è stato determinato col saggio BCA (Pierce).

Dal sovrantante di ciascuno campione sono state isolate le proteine per precipitazioni ripetute con acetone. I campioni sono stati miscelati con cinque volumi di acetone 100%, e quindi centrifugati a 4°C a 16000 g per 30 min. Il *pellet* ottenuto è stato lavato con 1 ml di soluzione di lisi e 4 ml di acetone (100%), nuovamente centrifugato come prima, risospeso in 300 μ l di soluzione di lisi e 1,2 ml di acetone e nuovamente centrifugato. Infine il surnatante è stato eliminato ed il *pellet* è stato risospeso in 350 μ l di un tampone contenente: urea 7 M, tiourea 2 M, Triton-X100 4% e glicerolo 5%) al quale sono state aggiunte anfoline all'1%. I campioni così preparati sono stati posti sulla ruota in camera fredda (+4°C) per tutta la notte. Il giorno successivo, dopo aver aggiunto DTT 40 mM, tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) 4 mM e 2 μ l di blu di bromofenolo, i campioni sono stati centrifugati a 4°C nell'ultracentrifuga a 16000 g per 10 min per eliminare tutti i residui insolubili e favorire così la corsa isoelettroforetica.

Il sovrantante è stato separato in prima dimensione tramite isoelettrofocalizzazione. L'isoelettrofocalizzazione separa le proteine in base al loro punto isoelettrico: sottoposte a un campo elettrico in presenza di un gradiente di pH, esse migrano fino a quando non raggiungono un valore di pH per cui la proteina ha carica zero (il suo

punto isoelettrico). L'isoelettrofocalizzazione è stata eseguita con il *Protean IEF cell* (Bio-Rad) utilizzando *precast DryStrips* 18 cm con un gradiente di pH 3-10 ed è stata quindi condotta come segue: dopo un'ora a 18°C in cui il campione viene adsorbito dalla strip, si fa partire la corsa per circa 24 ore fino ad un voltaggio di 10000V mantenendo la corrente costante a 50 μ A; si prosegue per cinque ore a 10000V per ottenere un voltaggio totale di 50000 V x h.

Terminata la prima dimensione, le proteine sono state separate in SDS-PAGE. Prima della corsa le strisce di isoelettrofocalizzazione devono essere equilibrate in un tampone contenente: 50 mM Tris/HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerolo v/v e 2% SDS w/v, con lo scopo di rivestire le proteine di SDS per poterle separare esclusivamente in base alla massa relativa (Bjelloqvist et al., 1993). Per la riduzione e l'alchilazione dei campioni le strisce sono trattate come segue:

-riduzione dei ponti disolfuro aggiungendo al tampone di equilibratura DTT 16 mM per 20 min;

-alchilazione delle funzioni -SH utilizzando tampone di equilibratura contenente iodoacetammide 25 mM per 10 min, in modo da prevenire la riossidazione durante la corsa elettroforetica.

Ciascuna striscia è stata poi applicata all'estremità superiore di un gel di poliacrilammide (formato 22 x 22 cm) con gradiente di concentrazione 9-16%. L'elettroforesi è stata condotta a 30 V per 1 h e a 300 V per 4 h, mantenendo la temperatura a 18°C.

I gels così ottenuti sono stati colorati con il *Coomassie* colloidale e decolorati in acqua.

2.10.3. Acquisizione ed analisi delle immagini

Dopo la colorazione, il gel bidimensionale così ottenuto viene visualizzato come una complessa mappa proteomica costituita da migliaia di macchie (*spot*) ciascuna delle quali corrisponde, con elevata probabilità, ad una singola specie proteica del campione. E' possibile ora determinare, per ogni proteina risolta, i valori di punto isoelettrico e di peso molecolare, nonché la quantità relativa in base alle coordinate e dall'intensità dello banda corrispondente.

I gel sono stati acquisiti con Image 2D scanner (GE Healthcare) ad una risoluzione di 500 DPI e analizzati mediante il *software* Image 2D Master Platinum (GE Healthcare) e il *software* Proteom Weaver (BioRad). Image 2D Master Platinum è un *software* semi-automatico che rivela *macthing* tra gli *spot* in base ai parametri forniti dall'operatore. Proteom Weaver è un *software* completamente automatizzato: i gel vengono inseriti nel programma ed il *macthing* viene eseguito automaticamente.

Ciascun campione è stato soggetto ad elettroforesi bidimensionale due volte, e sono state considerate solamente le differenze riproducibili che presentavano un rapporto tra gli *spot* delle cellule indotte e non indotte ad esprimere la eNOS e delle cellule esposte e non esposte a DETA-NO $\geq 1,5$.

2.11. Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il test t di Student su almeno 3 ripetizioni di ciascun esperimento (ciascun esperimento a sua volta era eseguito almeno in triplicato). I simboli *,**, e *** riportati nelle

figure indicano la probabilità statistica (P) di $<0,05$, $<0,01$ e $<0,001$,
rispettivamente.

3. *RISULTATI*

3.1. Linee eNOS-HeLa-TetOff

Il modello cellulare da me utilizzato in questi studi consiste in una linea cellulare HeLa stabilmente transfettata con il cDNA della eNOS bovina sotto il controllo di un promotore inducibile responsivo alla tetraciclina (linee eNOS-HeLa-TetOff). Le cellule sono state mantenute in coltura con dosi non tossiche dell'antibiotico (≤ 0.1 $\mu\text{g/ml}$) e la sua semplice rimozione dal mezzo di coltura permette di indurre selettivamente l'espressione della eNOS. In questo modo è stato possibile saggiare l'effetto del NO prodotto dalle cellule (e non solo da donatori artificiali) in un contesto altamente controllato.

Prima di eseguire ciascun esperimento con queste cellule, i livelli di espressione della eNOS sono stati saggiati mediante western blot. Ho condotto esperimenti soltanto con cellule che esprimevano livelli della eNOS 50-100 volte superiori alle cellule non indotte. La figura 16 mostra un esempio rappresentativo di uno dei western eseguiti. Nella prima corsia sono stati caricati 20 μg di estratto proteico totale proveniente da cellule eNOS-HeLa-TetOff coltivate in presenza di dox per tre giorni, in modo da visualizzare l'espressione basale della eNOS; nella seconda e nella terza corsia sono stati caricati rispettivamente 2 e 0,2 μg di estratto proteico totale proveniente da cellule eNOS-HeLa-TetOff coltivate in assenza di dox per tre giorni. Come si può osservare dalla figura 16, la banda eNOS della corsia 1 (20 μg) è di intensità paragonabile a quella ottenuta nella corsia 3 (0,2 μg) indicando che l'induzione dell'espressione della eNOS, in assenza di dox, è di circa 100 volte.

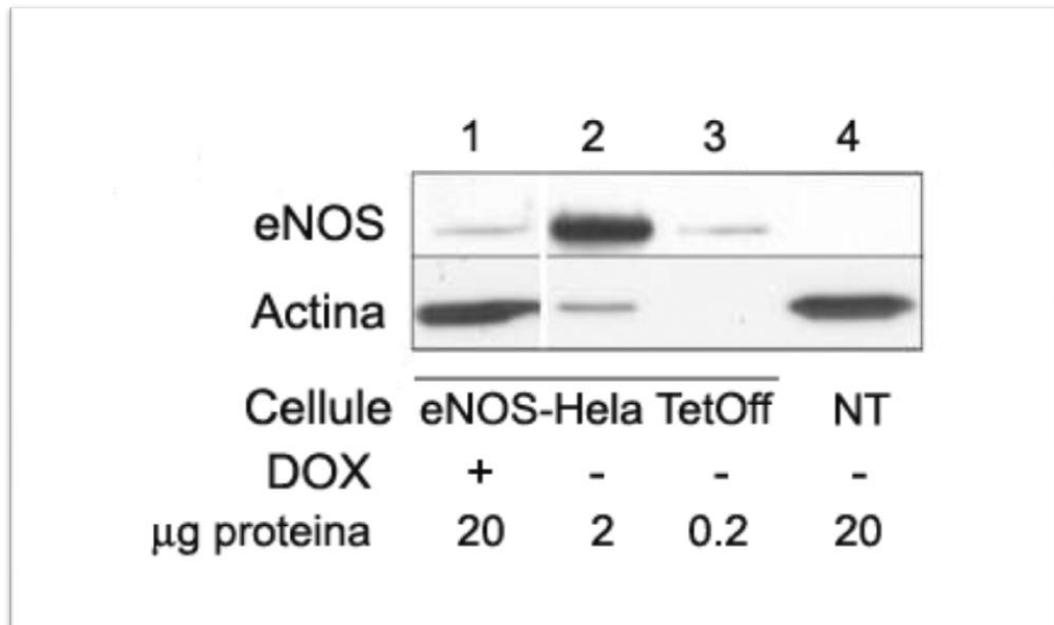


Figura 16. Valutazione semiquantitativa dell'induzione dell'espressione della eNOS in seguito a rimozione della doxiciplina. Gli estratti cellulari sono stati ottenuti da cellule eNOS-HeLa-TetOff (corsie 1-3) o da cellule HeLa-TetOff non transfettate (NT, corsia 4) coltivate in presenza o assenza di doxiciplina per tre giorni, come indicato. La quantità di estratto proteico caricato è indicato sotto ciascuna corsia. Una linea bianca separa le corsie 1 e 2, le quali provengono dalla stesso blot. Come si può osservare dalla figura, la banda della corsia 1 (20 µg) è di intensità paragonabile a quella ottenuta nella corsia 3 (0,2 µg) indicando che l'induzione dell'espressione della eNOS, in assenza di doxiciplina, è di circa 100 volte.

3.2. L'espressione cronica della eNOS diminuisce la migrazione di cellule HeLa TetOff

A seguito delle osservazioni nelle linee eNOS-HeLa-TetOff di una preferenziale localizzazione della eNOS ai *ruffles*, cioè in quelle aree di attiva polimerizzazione dell'actina corticale coinvolte nella motilità cellulare (Bulotta et al., 2006) ho deciso di utilizzare tali linee per approfondire il ruolo della eNOS e del NO nella motilità cellulare.

In precedenti esperimenti eseguiti con le cellule eNOS-HeLa-TetOff era stato dimostrato che la migrazione bidimensionale, osservata in seguito alla creazione di una ferita in un monostrato confluyente, non era alterata in seguito ad espressione della eNOS (Bulotta, 2005). Poichè sono state riportate differenze nel comportamento migratorio di cellule a seconda del saggio utilizzato, ho confrontato il comportamento di cellule indotte o non indotte in camere di Boyden.

Il saggio di Boyden è un saggio che permette di misurare la migrazione cellulare verso uno stimolo chemiotattico. In questi esperimenti ho utilizzato il siero come sorgente di fattori motogeni. Con questo saggio, abbiamo innanzitutto caratterizzato la migrazione di cellule HeLa-TetOff NT verso siero di vitello fetale (FBS) e abbiamo escluso qualsiasi effetto della dox sulla migrazione (Bulotta, 2005).

Ho poi analizzato l'effetto della rimozione della dox sulla migrazione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff. Sorprendentemente, ho osservato che l'espressione della eNOS inibisce fortemente e riproducibilmente la migrazione cellulare rispetto alle cellule non indotte ad esprimere l'enzima. Tale inibizione era visibile anche con la

semplice visualizzazione qualitativa dei filtri colorati (Fig. 17 pannello A); come mostrato in fig. 17 pannello B, l'inibizione era di ~85% e la differenza tra cellule indotte e non indotte era altamente significativa.

Una possibile spiegazione della mia osservazione poteva essere che l'espressione della eNOS diminuisse la proliferazione cellulare, e che quindi una differenza nella proliferazione cellulare fosse alla base del diverso numero di cellule attaccate alla faccia inferiore del filtro in presenza e in assenza dell'antibiotico. Tuttavia, come mostrato in fig. 18, ho verificato che la presenza o assenza di dox ha un effetto scarso o nullo sulla proliferazione delle cellule.

Per determinare se l'inibizione della migrazione causata dalla espressione della eNOS è dovuta alla produzione del NO, le cellule sono state trattate con un inibitore specifico della eNOS, l'L-NAME, 24 ore prima del saggio di chemiotassi. Dopo questo trattamento la migrazione delle cellule indotte ad esprimere la eNOS aumentava di 2,2 volte, evidenziando così che è la produzione cronica di NO a provocare delle alterazioni del fenotipo cellulare, alterazioni che diminuiscono le capacità di migrazione verso uno stimolo chemiotattico (Fig. 19). Risultati simili sono stati ottenuti dopo trattamento con L-NAME 1 mM o 5 mM, per 24 o 48 ore.

Poiché il recupero della migrazione dopo trattamento con L-NAME era solo parziale, ho ipotizzato che l'inibizione della eNOS da parte dell'inibitore non fosse completa a causa della presenza nel mezzo e nelle cellule del substrato L-arginina. Il NAME agisce infatti per un meccanismo di competizione. Quindi, ho condotto esperimenti su cellule coltivate in assenza di arginina e in presenza di L-NAME

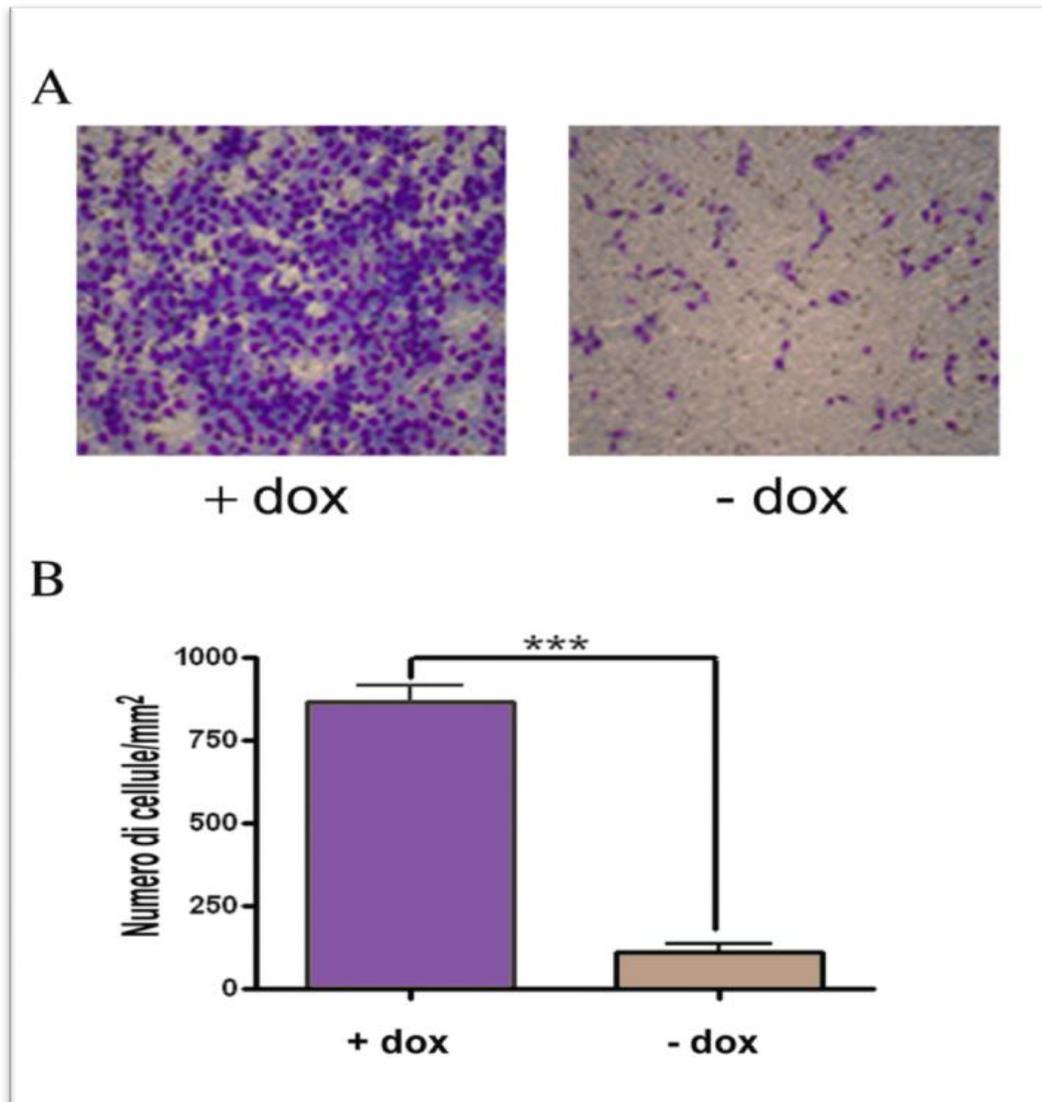


Figura 17. Effetto dell'espressione della eNOS sulla migrazione cellulare. A: Le cellule esprimenti la eNOS (- dox) migrano di meno (si può osservare come il relativo filtro sia attraversato da un numero molto ridotto di cellule) rispetto alle cellule non esprimenti l'enzima (+ dox). B: quantificazione di dati come quelli illustrati in pannello A. I dati rappresentano la media \pm SEM di 6 esperimenti, nei quali la migrazione è stata condotta per 12 ore;*** indica la $P < 0,001$ calcolata con il test t di Student.

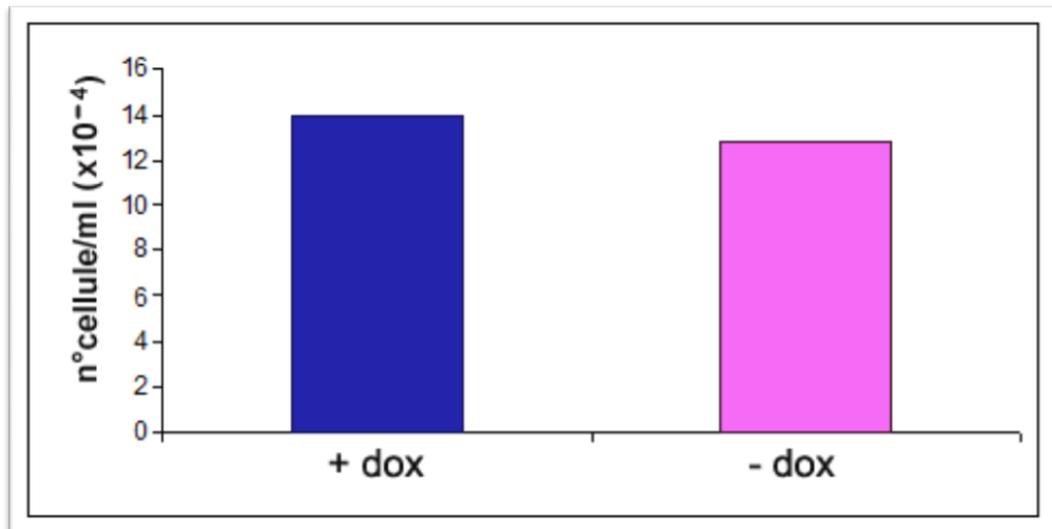


Figura 18. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sulla proliferazione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff. Le cellule coltivate in presenza o assenza della doxiciclina come indicato, sono state staccate e sono state piastrate alla densità di 1×10^5 cellule/per pozzetto, poi incubate a 37°C per 24h, nuovamente staccate e contate (vedi Metodi). E' mostrata la media di 3 esperimenti.

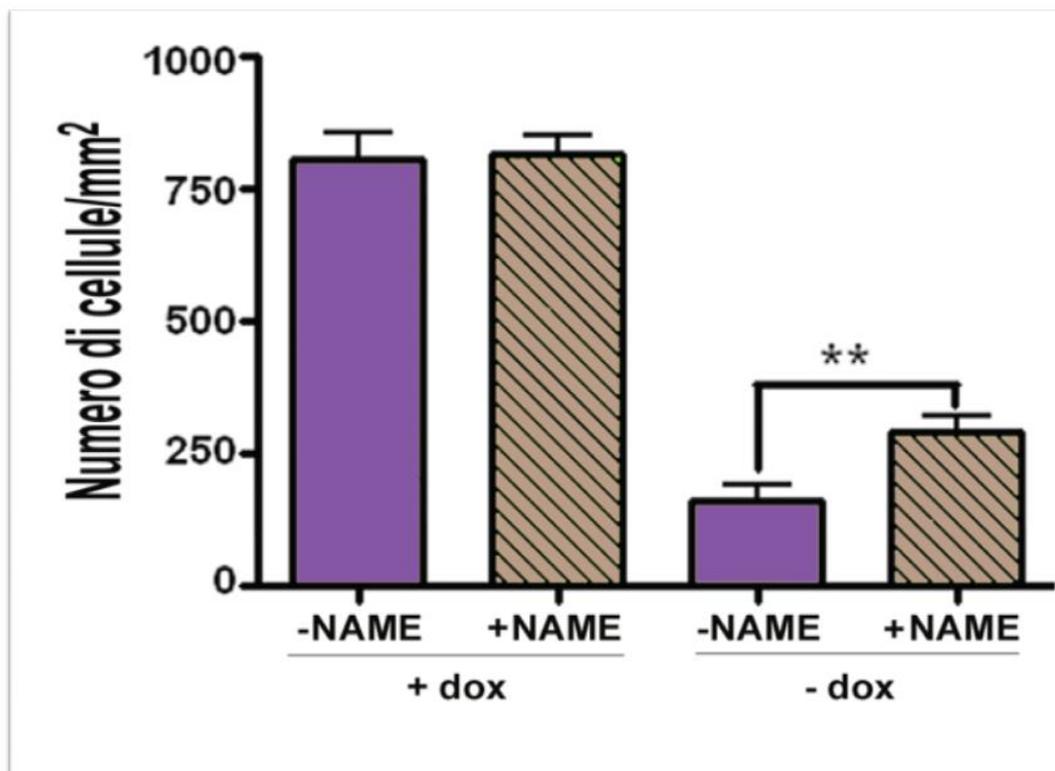


Figura 19. Effetto del trattamento cronico con L-NAME sulla migrazione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff. Il pre-trattamento per 24 h con l'inibitore (L-NAME 1 mM) della eNOS blocca parzialmente l'effetto inibitorio dell'espressione dell'enzima sulla migrazione cellulare. I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti, condotti come quelli della figura 18; ** indica la $P < 0,01$ calcolata con il test t di Student.

per 15-24 h. Purtroppo però le cellule soffrivano in coltura senza arginina e risultava fortemente diminuita la capacità migratoria sia delle cellule indotte che di quelle non indotte ad esprimere la eNOS. Perciò non è stato possibile proseguire con questo approccio.

Il NO svolge le sue azioni mediante numerosi meccanismi molecolari tra i quali l'attivazione della sGC (si veda l'Introduzione di questa tesi). Dunque, per controllare se l'effetto inibitorio del NO sulla migrazione avviene mediante la stimolazione della sGC, ho eseguito esperimenti di migrazione dopo trattamento delle cellule esprimenti la eNOS con l'inibitore specifico ODQ. Il trattamento delle cellule in modo cronico con questa sostanza (1 μ M) diminuiva l'effetto inibitorio della eNOS sulla migrazione del 50% (Fig. 20).

3.3. Inibizione della capacità migratoria delle cellule HeLa dopo trattamento cronico con concentrazioni nanomolari di donatori di NO

I risultati appena descritti suggeriscono che l'espressione cronica della eNOS alteri il fenotipo migratorio delle cellule tramite produzione di NO che a sua volta attiva la guanilato ciclasi. Questo sorprendente effetto è in contrasto con quanto generalmente riportato in letteratura sull'effetto del NO sulla migrazione. Tuttavia bisogna considerare che durante il periodo di induzione della espressione della eNOS, le cellule non sono sottoposte a stimoli che attivano l'enzima. Perciò ho pensato che l'alterazione fenotipica osservata potesse essere causata da livelli estremamente bassi del messaggero gassoso. Per

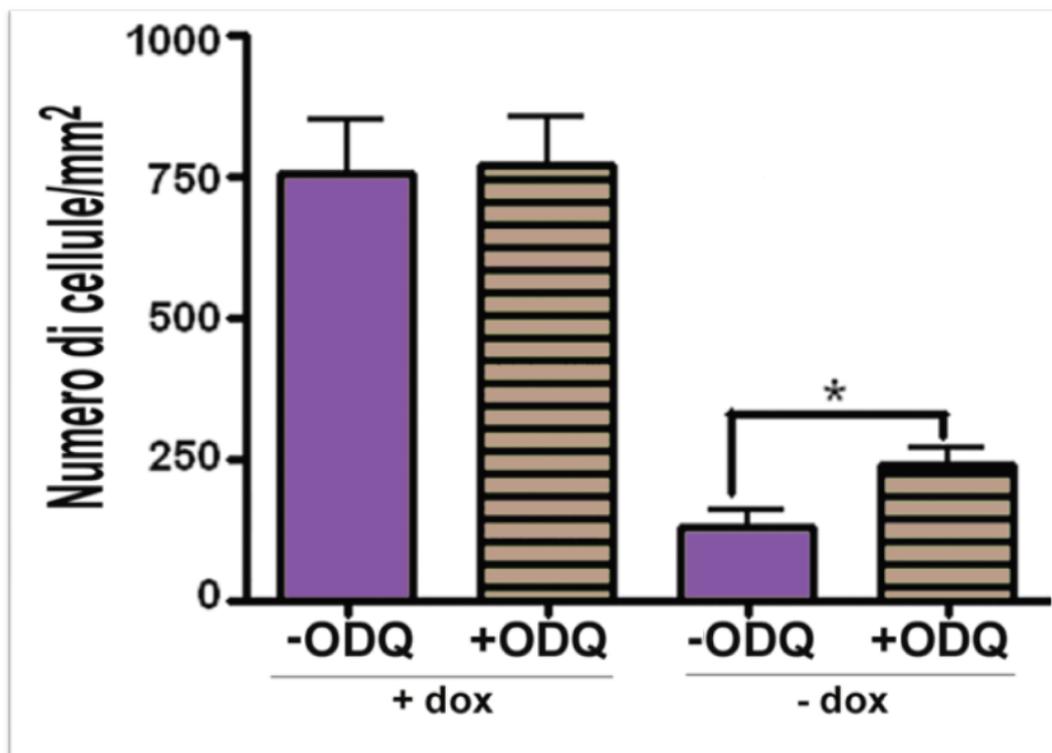


Figura 20. Effetto del trattamento cronico con ODQ sulla migrazione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff. L'effetto inibitorio dell'espressione dell'enzima sulla migrazione cellulare è parzialmente bloccato dal pre-trattamento cronico per 48 ore con un inibitore specifico (ODQ 1 μ M) dell'enzima sGC. I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti, condotti come quelli della figura 18; * indica la $P < 0,05$ calcolata con il test t di Student.

verificare questa ipotesi, ho analizzato la migrazione di cellule HeLa-TetOff NT dopo trattamento cronico con diverse concentrazioni di DETA-NO. Il DETA-NO è un donatore che rilascia in modo lento il NO, in modo che si riesce ad ottenere una esposizione prolungata delle cellule al messaggero gassoso. Dopo 2 giorni di esposizione a DETA-NO, ho eseguito esperimenti di migrazione in assenza del donatore. Come mostrato in figura 21 il trattamento cronico con basse concentrazioni di DETA-NO a partire da 1 nM provoca una diminuzione della migrazione, con una forte inibizione (~60%) alle concentrazioni di 0,1 μ M. A concentrazioni più elevate si ha minore inibizione. Questi risultati sono del tutto coerenti con quelli ottenuti con le cellule transfettate.

Per verificare se anche nelle cellule HeLa-TetOff NT trattate con DETA-NO (0,1 μ M), l'inibizione della migrazione è dovuta ad attivazione della guanilato ciclasi, le cellule sono state trattate simultaneamente con il donatore e con ODQ per 48h. L'ODQ in questi esperimenti è riuscito a revertire completamente l'effetto inibitorio da parte del NO sulla migrazione cellulare (Fig. 22). Anche il trattamento cronico delle cellule HeLa-TetOff NT con un analogo del cGMP, l'8-Br-cGMP, ha confermato che l'effetto inibitorio del NO avviene mediante attivazione della sGC. L'andamento della curva dose-effetto ottenuta dopo i trattamenti con l'8-Br-cGMP, è analogo a quello che si ha con DETA-NO, con una forte inibizione a concentrazioni di 3 μ M (Fig. 23) e minore inibizione a concentrazioni più elevate.

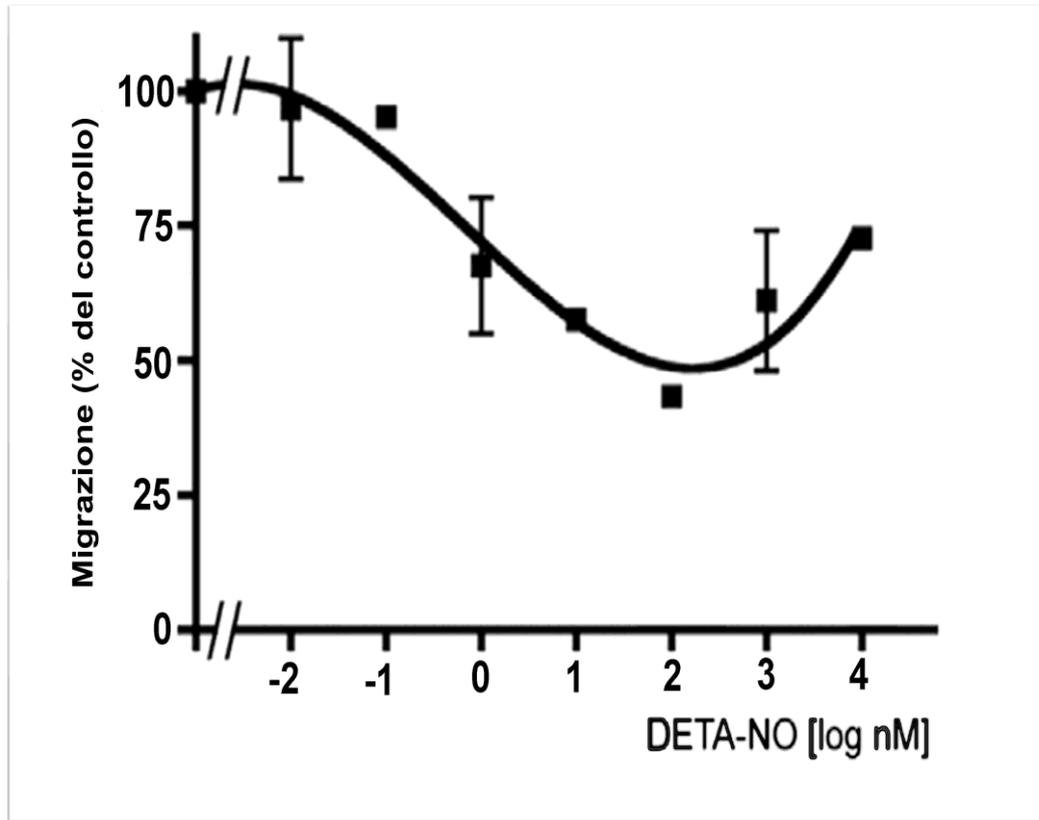


Figura 21. Curva dose-effetto relativa al trattamento cronico con DETA-NO di cellule HeLa-TetOff NT. Le cellule HeLa-TetOff NT, pre-trattate con concentrazioni crescenti di DETA-NO per 48 ore, hanno migrato attraverso camerette Transwell verso FBS per 8 ore. La dose di DETA-NO alla quale si osserva il massimo effetto inibitorio sulla migrazione è 0,1 μ M. Ciascun punto sperimentale rappresenta la media di tre esperimenti (\pm SEM). La curva è stata ottenuta mediante processo di *fitting* con un'equazione polinomiale di terzo ordine.

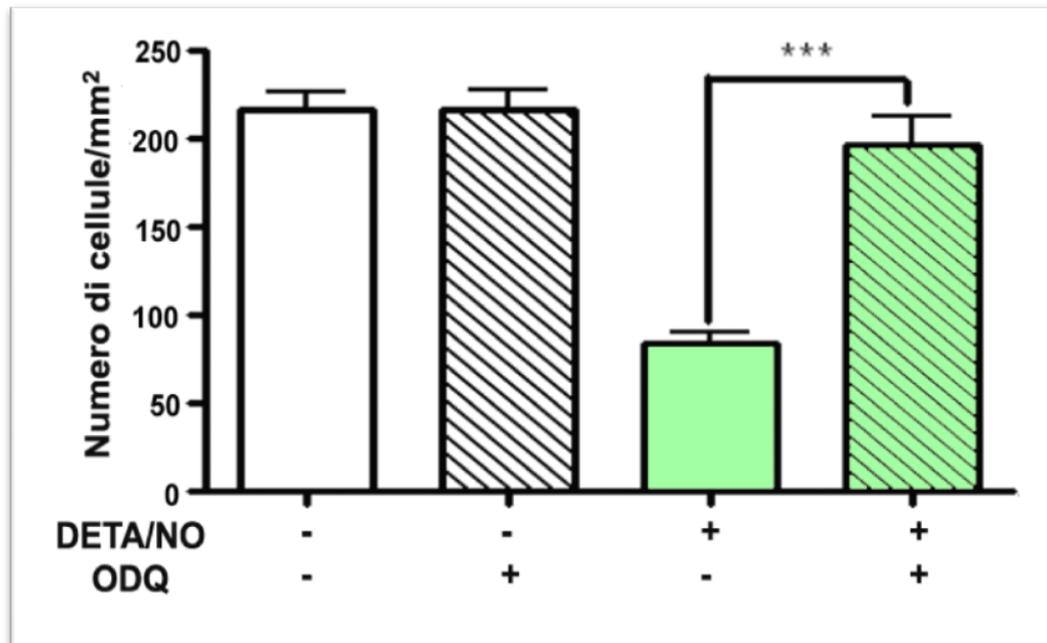


Figura 22. Effetto del co-trattamento cronico con DETA-NO e ODQ sulla migrazione delle cellule HeLa-TetOff NT. L'effetto inibitorio sulla migrazione cellulare ottenuto mediante trattamento cronico con DETA-NO (0,1 μ M) è bloccato dal trattamento simultaneo con l'inibitore della guanilato ciclastasi ODQ (1 μ M). I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti; le migrazioni erano per 8 ore; *** indica la $P < 0,001$ calcolata con il test t di Student.

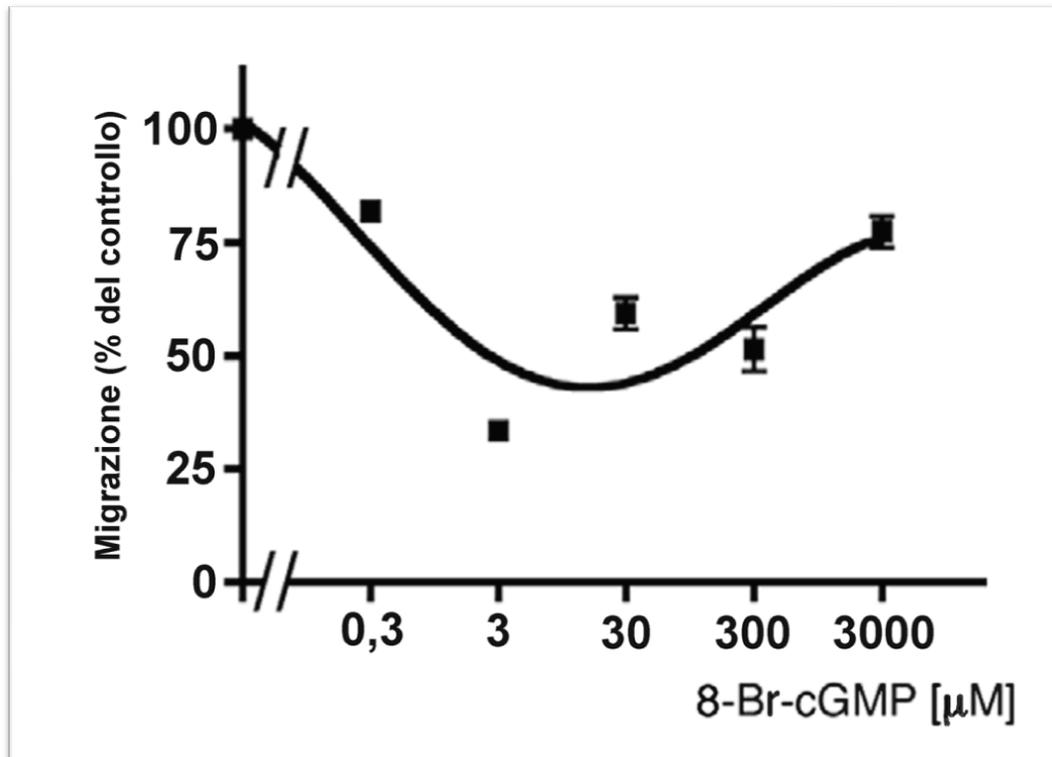


Figura 23. Curva dose-effetto relativa al trattamento cronico con 8-Br-cGMP di cellule HeLa-TetOff NT. L'effetto inibitorio sulla migrazione di DETA-NO (0,1 µM) è mimato dal pre-trattamento con un analogo del cGMP (8-Br-cGMP). La dose di 8-Br-cGMP alla quale si osserva il massimo effetto inibitorio sulla migrazione è 3 µM. Ciascun punto sperimentale rappresenta la media di due esperimenti (\pm SEM); le migrazioni erano per 8 ore; la curva è stata ottenuta mediante processo di *fitting* con un'equazione polinomiale di terzo ordine.

3.4. Aumento della migrazione delle cellule HUVEC dopo trattamento cronico con L-NAME

Per valutare se l'inibizione della migrazione dovuta alla produzione cronica del NO a livelli basali è osservata anche su cellule endoteliali, abbiamo eseguito esperimenti su colture primarie di cellule endoteliali umane (HUVEC), nelle quali la eNOS è espressa costitutivamente. Questi esperimenti sono stati condotti in collaborazione con la prof.ssa L. Vicentini e la dott.ssa M.G. Cattaneo (Università di Milano).

Prima di eseguire gli esperimenti di migrazione ho confermato che la distribuzione intracellulare della eNOS, rilevata per immunofluorescenza, è simile nelle HUVEC (Fig. 24 pannello a) e nelle cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte (Fig. 24 pannello d). Come illustrato nella figura, l'enzima è concentrato nella zona perinucleare e nel margine avanzante delle cellule polarizzate, come precedentemente osservato (Bulotta et al., 2006). Nelle cellule non indotte, al contrario si è osservato un leggero background (Fig. 24 pannello b) simile a quello osservato nelle cellule HeLa NT (Fig. 24 pannello c).

Ho poi voluto confrontare i livelli di espressione della eNOS tra le HUVEC e le eNOS-HeLa-TetOff indotte. A causa delle maggiori dimensioni delle cellule HUVEC rispetto alle HeLa e quindi del maggiore rapporto tra superficie e volume di queste ultime, ho normalizzato per il DNA (proporzionale al numero di cellule) piuttosto che per il contenuto di proteine. Dall'analisi dei blot (Fig. 25), è emerso che l'espressione della eNOS nelle HUVEC (corsia 2) è 8 volte di più rispetto alle cellule eNOS-HeLa-TetOff non indotte

(corsia 3), considerando che nei campioni caricati nelle corsie 2 e 3 il contenuto di DNA è uguale. Analizzando invece i lisati ottenuti dalle cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte si può evincere che l'espressione della eNOS è circa 20 volte inferiore che nelle cellule endoteliali (si noti che la corsia 4 contiene circa 20 volte meno lisato eNOS-HeLa-TetOff rispetto alla corsia 2, contenente il lisato HUVEC e che l'intensità dei due segnali eNOS è comparabile in queste due corsie).

Quindi ho valutato l'effetto della inibizione cronica della eNOS sulla migrazione delle HUVEC mediante trattamento delle cellule per 48 ore con 5 mM L-NAME e successivo saggio di migrazione in assenza dell'inibitore. In accordo, con i dati ottenuti con le cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte, le cellule HUVEC, trattate per 48h con L-NAME prima del saggio di chemiotassi, mostrano un aumento della migrazione sia verso siero, sia verso il fattore angiogenico VEGF (Fig. 26 pannello A). Questo aumento della migrazione è statisticamente significativo rispetto alle cellule non trattate (Test t di Student).

Poiché la chemiotassi delle HUVEC verso il VEGF e altri fattori angiogenici è fortemente dipendente dalla generazione di NO, ho considerato la possibilità che l'aumentata migrazione osservata dopo inibizione cronica della eNOS potesse essere dovuta a "upregolazione" della espressione dell'enzima durante l'inibizione, e successiva aumentata attività enzimatica dopo rimozione del farmaco. Tuttavia, il confronto dei livelli della eNOS in cellule trattate o non con L-NAME non ha rivelato un aumento dell'enzima nelle cellule cronicamente inibite (Fig. 26 pannello B).

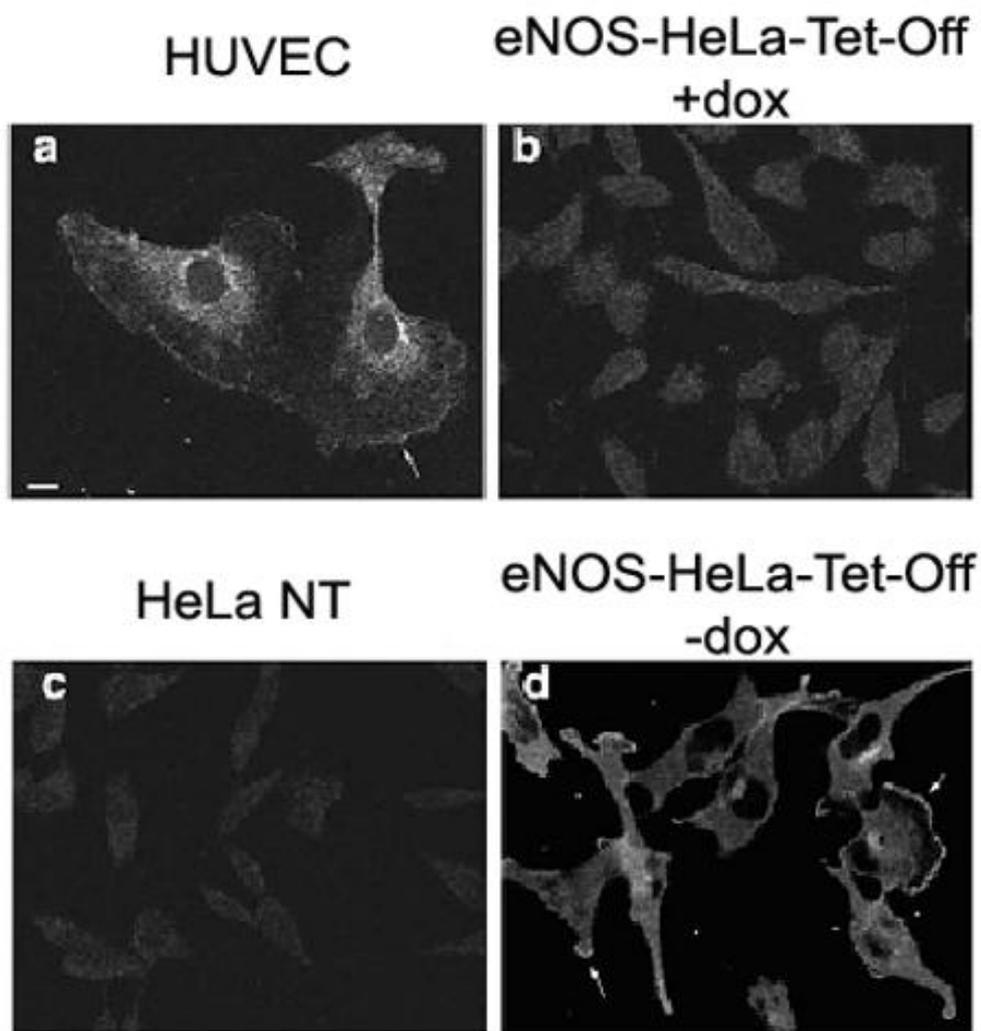


Figura 24. Analisi al microscopio confocale delle cellule eNOS-HeLa-TetOff e HUVEC. Le cellule HUVEC, eNOS-HeLa-TetOff indotte (- dox) o non indotte (+ dox) e le cellule HeLa-TetOff NT (HeLa NT) sono state fissate e marcate con un anticorpo primario per la eNOS. I campi mostrati nei pannelli a-c sono stati acquisiti nelle stesse condizioni. Nel pannello a e d le frecce indicano lamellipodi e *ruffles* arricchiti della eNOS. Scala 10 μ M.

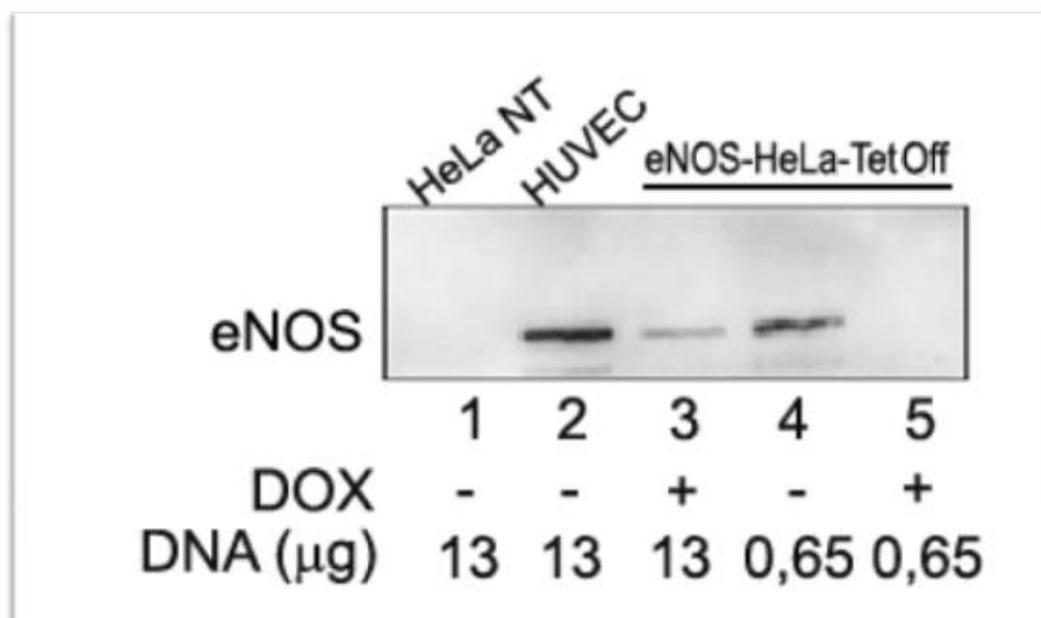


Figura 25. Confronto dell'espressione della eNOS nelle cellule HUVEC e eNOS-HeLa-TetOff mediante western blotting. I lisati ottenuti dalle HUVEC (corsia 2), dalle cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte (corsia 4) o non indotte (corsia 3 e 5) e dalle cellule HeLa-TetOff NT (corsia 1), caricati con un contenuto di DNA come mostrato, sono stati analizzati mediante western blotting con anticorpi anti-eNOS.

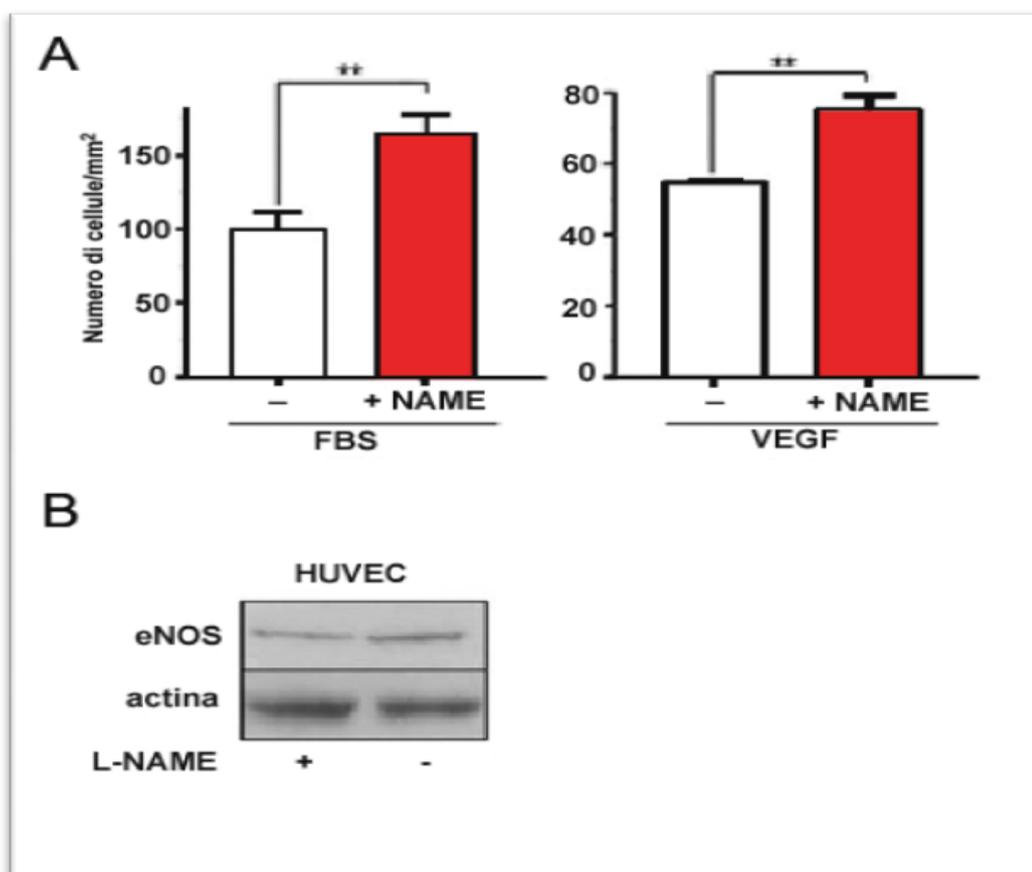


Figura 26. Aumento della migrazione delle cellule HUVEC dopo trattamento cronico con L-NAME. A: E' stato osservato il comportamento migratorio delle cellule HUVEC, dopo pretrattamento per 48h con L-NAME, in camere di Boyden, utilizzando il siero e VEGF come fonte di fattori motogeni. I dati rappresentano la media \pm SD di 3 esperimenti per il grafico mostrato a sinistra e di 2 esperimenti per quello di destra; le migrazioni erano per 6 ore. B: I livelli della eNOS in cellule HUVEC trattate e non trattate con L-NAME. Le cellule HUVEC dopo essere state trattate o non con L-NAME sono state lisate e analizzate per immunoblotting.

3.5. Possibili meccanismi d'azione del NO basale sulla migrazione

3.5.1. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sulla adesione

La migrazione cellulare dipende dalla capacità della cellula di stabilire reversibilmente contatti con la matrice extracellulare (si veda l'Introduzione di questa tesi) ed è stato suggerito che il NO eserciti i suoi effetti positivi sulla migrazione alterando le proprietà di adesione della cellula (Goligorsky et al. 1999; Isenberg et al., 2005). Perciò ho indagato se l'espressione cronica della eNOS avesse effetti sulla capacità delle cellule eNOS-HeLa-TetOff di aderire a un substrato.

Le cellule coltivate fino ad ottenere un monostrato confluento in piastre da 100 mm sono state staccate con PBS - EDTA, piastrate su piastre pretrattate con siero e poi osservate a tempi diversi. Come mostrato in figura 27 pannello A, l'osservazione dello stesso campo a tempi diversi ha rivelato che già dopo 30 minuti non vi era ulteriore aumento nel numero delle cellule adese, ma che si aveva un progressivo appiattimento delle cellule fino a circa due ore dalla piastratura. Il comportamento delle cellule coltivate in presenza o in assenza di dox era indistinguibile. Per analizzare le prime fasi del processo, ho valutato quantitativamente l'adesione mediante spettrofotometria usando il saggio Crystal Violet. Come mostrato in figura 27 (pannello B), il decorso temporale dell'adesione non presentava differenze tra le due popolazioni cellulari.

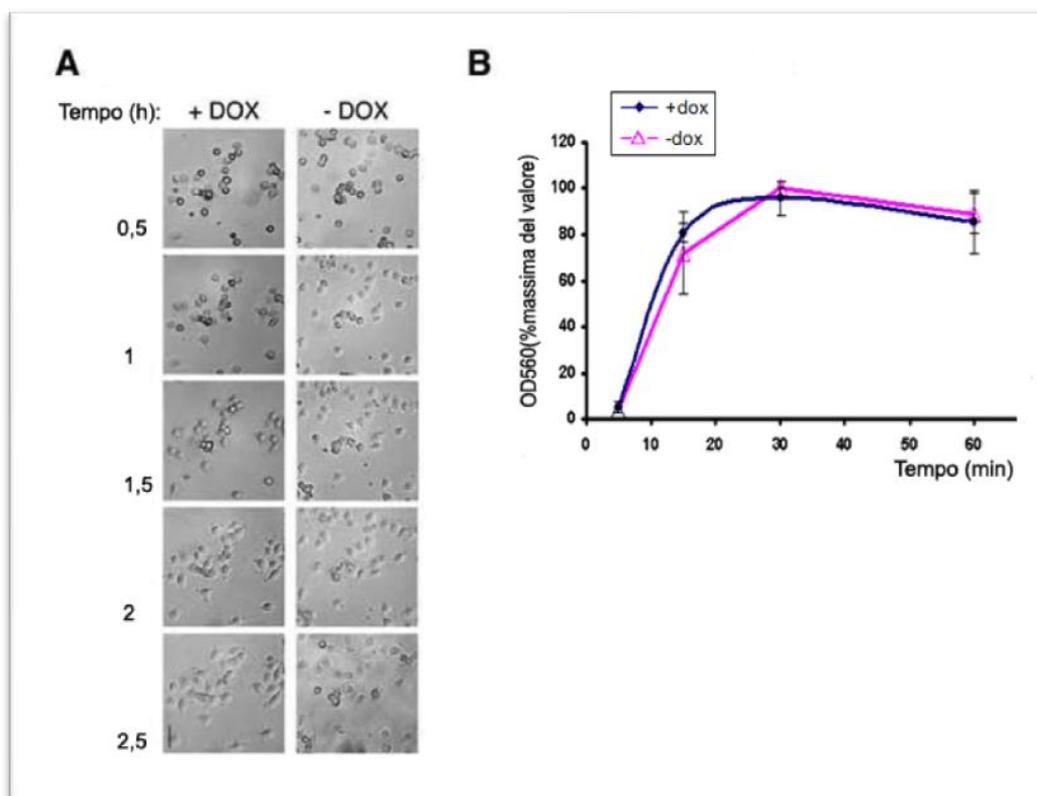


Figura 27. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sull'adesione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff. A: Le cellule coltivate in presenza o assenza della doxyciclina come indicato, sono state staccate e fatte aderire su piastre pretrattate (vedi Metodi). Lo stesso campo è stato fotografato ai tempi indicati sulla sinistra dei pannelli. Le immagini sono rappresentative di tre piastre separate, in ognuna delle quali sono state analizzati tre differenti campi. Barra, 100 μ m. B: L'adesione delle cellule indotte e non indotte è stata analizzata mediante l'uso del colorante Crystal Violet (vedi Metodi). Ogni punto rappresenta la media di 3 esperimenti \pm SD.

3.5.2. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS su Hypoxia inducible Factor (HIF) 1 α

Molti studi hanno rivelato come l'ipossia abbia un'azione promigratoria e come questa azione sia almeno parzialmente mediata da "Hypoxia Induced Factors" (HIF) (per es. Kunz et al., 2003), tra cui gioca un ruolo fondamentale la proteina HIF-1 α . In condizioni normossiche, HIF-1 α è resa instabile per idrossilazione su residui di prolina; queste reazioni avvengono per azione di enzimi O₂-dipendenti. In condizioni ipossiche, gli enzimi idrossilanti sono inattivi, HIF-1 α è quindi stabilizzata, e, insieme al fattore HIF 1 β , forma un complesso trascrizionale attivo, responsabile per le risposte cellulari alla carenza di O₂ (Alberts et al., 2008).

E' noto che il NO ha un importante effetto sui livelli di HIF-1 α : se presente acutamente ad alte concentrazioni, ne aumenta i livelli; invece se presente cronicamente a basse concentrazioni ne abbassa la concentrazione, anche in condizioni ipossiche (Berchner-Pfannschmidt et al., 2010). Ho quindi ipotizzato che la inibizione della migrazione causata dal NO basale nelle cellule HeLa potesse essere causata da un diminuito livello di espressione di HIF-1 α . Per indagare questa possibilità, ho analizzato per immunoblotting HIF-1 α in cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte o non indotte. Come controllo positivo ho analizzato le stesse cellule dopo esposizione a cloruro di cobalto (CoCl₂), un trattamento che stabilizza HIF-1 α aumentandone i livelli intracellulari. Come si può vedere in fig. 28, il fattore trascrizionale era chiaramente rilevabile sia nelle cellule indotte che nelle non indotte dopo trattamento con CoCl₂, ma in assenza di trattamento non era rilevabile in entrambi i tipi di cellule. Per avere maggiore

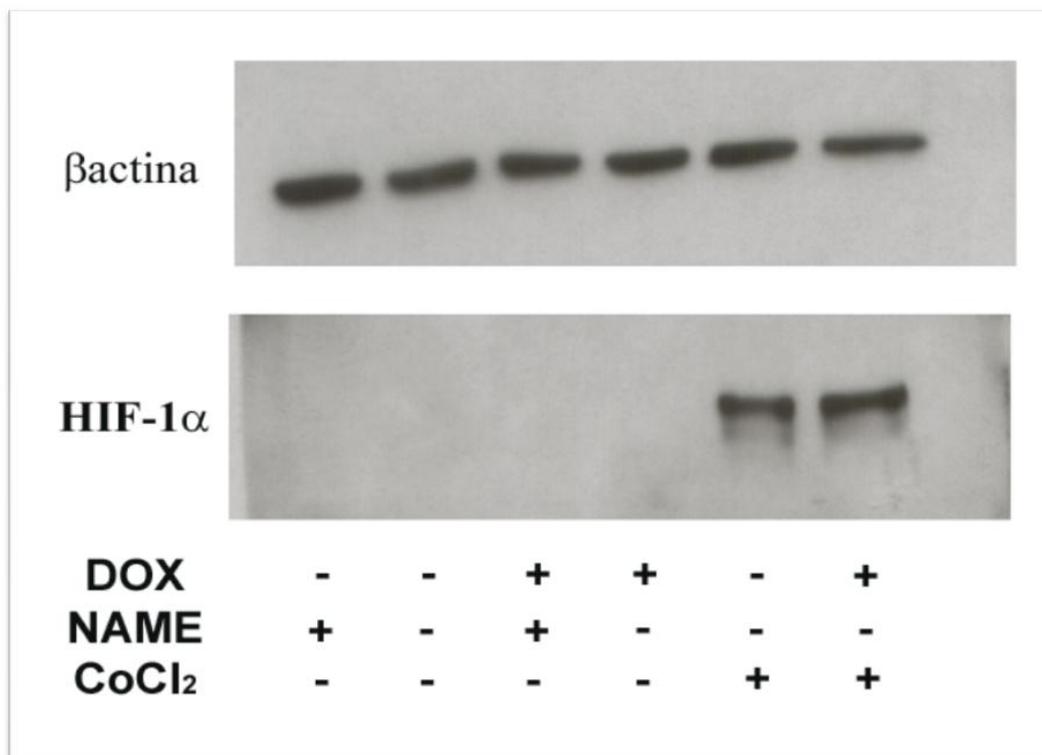


Figura 28. In cellule eNOS-Hela-TetOff, HIF-1 α è rilevabile solamente dopo trattamento con CoCl₂. Cellule eNOS-Hela-TetOff sono state coltivate in presenza o assenza di doxyciclina per quattro giorni con o senza L-NAME (24 h), come indicato sotto le corsie. Le cellule analizzate nelle ultime due corsie sono state esposte a CoCl₂ 150 μ M per 12 h prima di essere raccolte. Il blot è stato incubato con anticorpi anti-actina (pannello superiore) e anti-HIF-1 α (pannello inferiore).

sensibilità, ho anche condotto il western blot su estratti nucleari ma nemmeno in questo caso ho rilevato il fattore trascrizionale in cellule non trattate con CoCl_2 (risultato non mostrato).

3.5.3. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sull'organizzazione della rete mitocondriale

Lavori recenti del gruppo di Viola hanno dimostrato che lo stato di connessione della rete mitocondriale gioca un ruolo importante nella regolazione della chemiotassi: una rete molto interconnessa inibisce la migrazione, mentre una sua parziale frammentazione, con raccolta dei mitocondri nella parte posteriore della cellula, è permissiva (Campello et al., 2006). Perciò ho analizzato la morfologia della rete mitocondriale nelle nostre cellule mediante immunofluorescenza utilizzando un anticorpo anti- complesso III (Fig. 29). Diversamente da quanto mi aspettavo, le cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte e non indotte mostravano entrambe una rete mitocondriale ben organizzata, con lunghi mitocondri tubulari interconnessi (Fig. 29).

3.5.4. Mancanza di effetto dell'espressione della eNOS sulla funzionalità energetica dei mitocondri

I mitocondri sono le "centrali energetiche" della cellula; producono l'energia necessaria per molte funzioni cellulari tra le quali

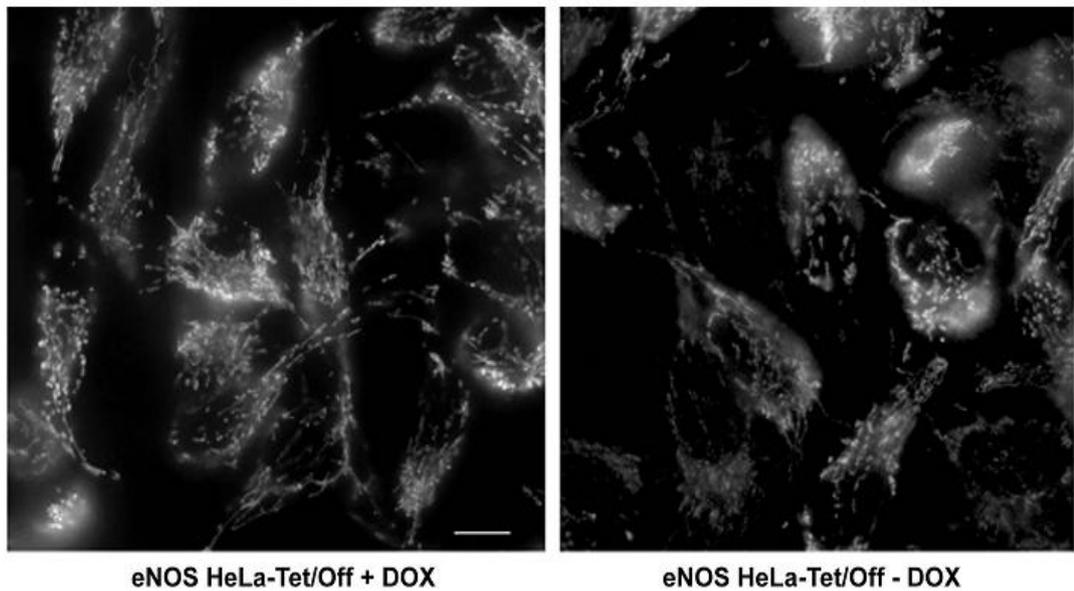


Figura 29. Aspetto della rete mitocondriale in cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte o non indotte ad esprimere l'enzima. I mitocondri sono stati visualizzati con un anticorpo anti-complesso III. Non si notano differenze nella organizzazione della rete mitocondriale tra le cellule indotte e non indotte. Barra, 10 μ M.

il movimento. Poiché è risaputo che il NO interferisce con la funzione della citocromo ossidasi (si veda l'Introduzione della tesi), ho indagato la funzionalità energetica dei mitocondri in cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte e non indotte mediante misure del potenziale di membrana mitocondriale. A questo scopo ho utilizzato la TMRM come sonda, misurando il suo accumulo nei mitocondri con il FACS. Come già accennato in Materiali e Metodi, TMRM è una sonda fluorescente lipofilica e cationica che si accumula nella matrice mitocondriale. Per impedire l'estrusione della sonda, prima di ogni esperimento al FACS, le cellule sono state trattate con ciclosporina H un analogo della ciclosporina A che non inibisce il poro di transizione della permeabilità mitocondriale ma è attivo sulle pompe *multi drug resistance* (MDR) responsabili dell'estrusione di sostanze esogene come la TMRM (Angelin et al., 2007).

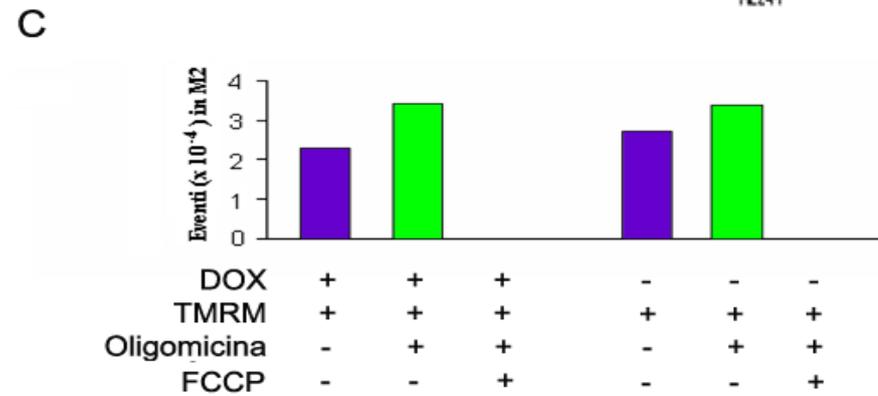
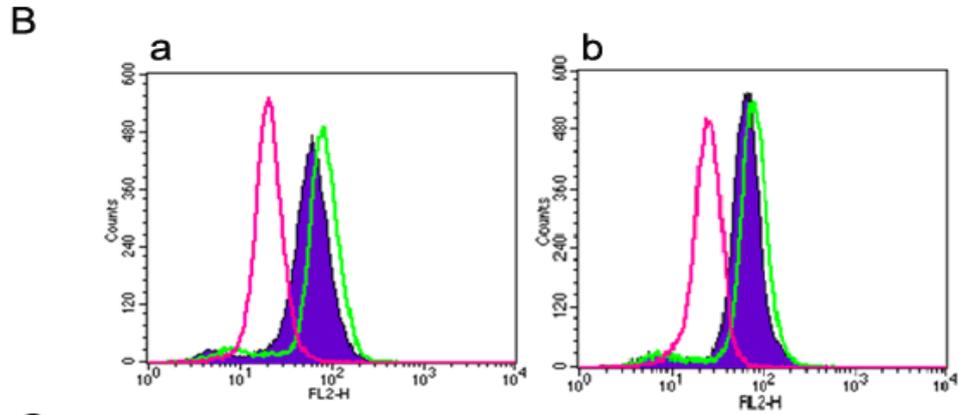
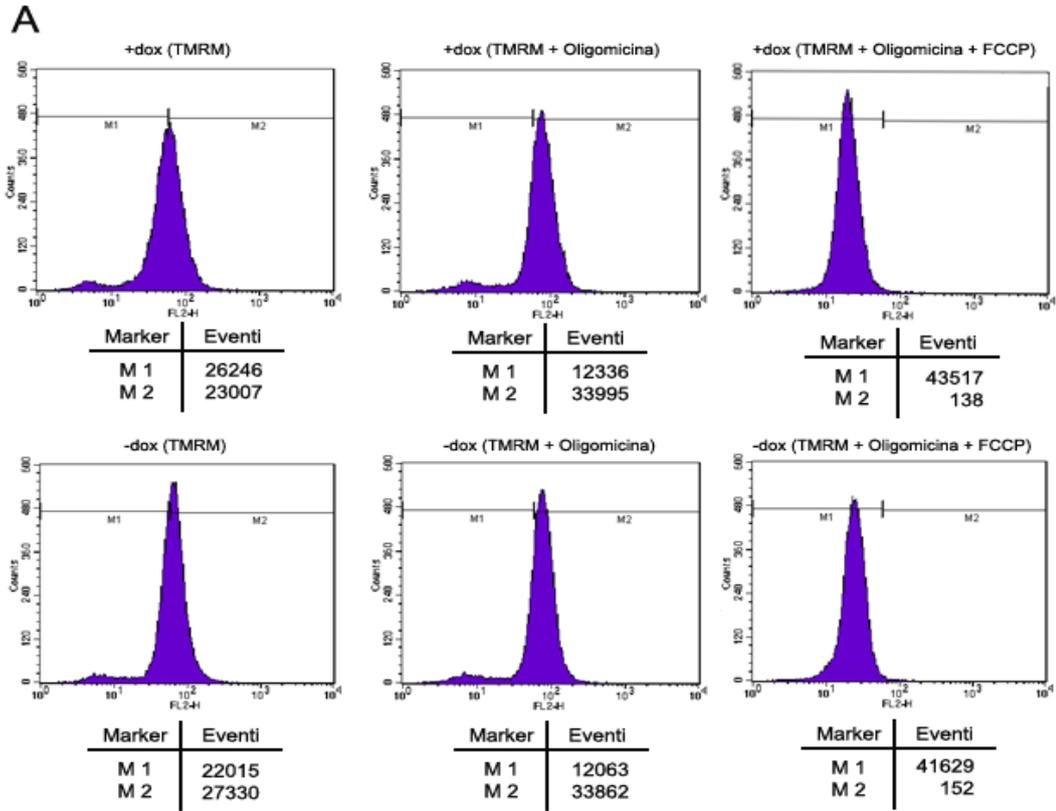
Lo stato di polarizzazione dei mitocondri delle cellule +dox e -dox è stato valutato confrontando la posizione del picco di fluorescenza con quello ottenuto dopo trattamento con oligomicina e successivamente con FCCP (Fig. 30 pannello A). L'oligomicina inibisce il ritorno di protoni attraverso l'ATP sintetasi, ottenendosi così il gradiente protonico massimo sostenibile dalla catena di trasporto degli elettroni. Al contrario il FCCP è un protonoforo che causa il collasso del potenziale della membrana mitocondriale interna. Come si può vedere dal confronto tra i pannelli a (cellule non indotte) e b (cellule indotte) che mostrano l'*overlay* della curva degli eventi (Fig. 30 pannello B), l'induzione della espressione della eNOS non ha causato un cambiamento nel potenziale mitocondriale (curva viola).

Inaspettatamente, come si può osservare in figura 30. Dopo trattamento con l'oligomicina vi è stato solo un lieve aumento dell'intensità della fluorescenza della TMRM (curve verdi), mentre abbiamo osservato l'attesa caduta del potenziale dopo trattamento con FCCP (curve rosa). Questi risultati suggeriscono che nelle nostre condizioni di coltura le cellule eNOS-HeLa-TetOff producano la maggior parte del loro ATP mediante glicolisi anaerobica, indipendentemente dai livelli di espressione della eNOS. Il quasi identico comportamento delle cellule indotte e non indotte è confermato dall'analisi quantitativa mostrata in figura 30 pannello C.

3.5.5. L'espressione prolungata della eNOS diminuisce la fosforilazione di Akt in risposta al siero.

Una via cruciale coinvolta nella migrazione chemiotattica è quella mediata dalla fosforilazione e attivazione della protein chinasi Akt/PKB (Manning and Cantley, 2007). Akt è una serina-treonina chinasi che viene reclutata a livello della membrana plasmatica tramite PI (3,4,5,) P3 generata da PI3K e attivata attraverso una fosforilazione in serina. I “*signalling*” mediati da NO e Akt sono strettamente correlati: Akt attiva la eNOS mediante fosforilazione su Ser 1177 (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999) e il NO a sua volta aumenta la fosforilazione di Akt (Kawasaki et al., 2003). Ho ipotizzato che la produzione basale di NO potesse inibire la migrazione delle cellule eNOS-HeLa-TetOff attenuando la via

Figura 30. Visualizzazione della variazione del potenziale mitocondriale mediante analisi citofluorimetrica in cellule eNOS-HeLa-TetOff non indotte o indotte ad esprimere la eNOS. A: In questo pannello viene mostrato lo spostamento della fluorescenza delle cellule (+dox e -dox) in seguito ad aggiunta di oligomicina e di FCCP, con relativa statistica. **B:** Questo pannello mostra l'overlay delle curve degli eventi. Viene indicato in viola il potenziale basale, in verde l'iperpolarizzazione in seguito ad aggiunta di oligomicina ed in rosa la depolarizzazione in seguito ad aggiunta di FCCP. **C:** viene mostrata la quantificazione dell'analisi citofluorimetrica. Gli istogrammi indicano il numero degli eventi compresi nello spazio delineato dal marker M2 (pannello A).



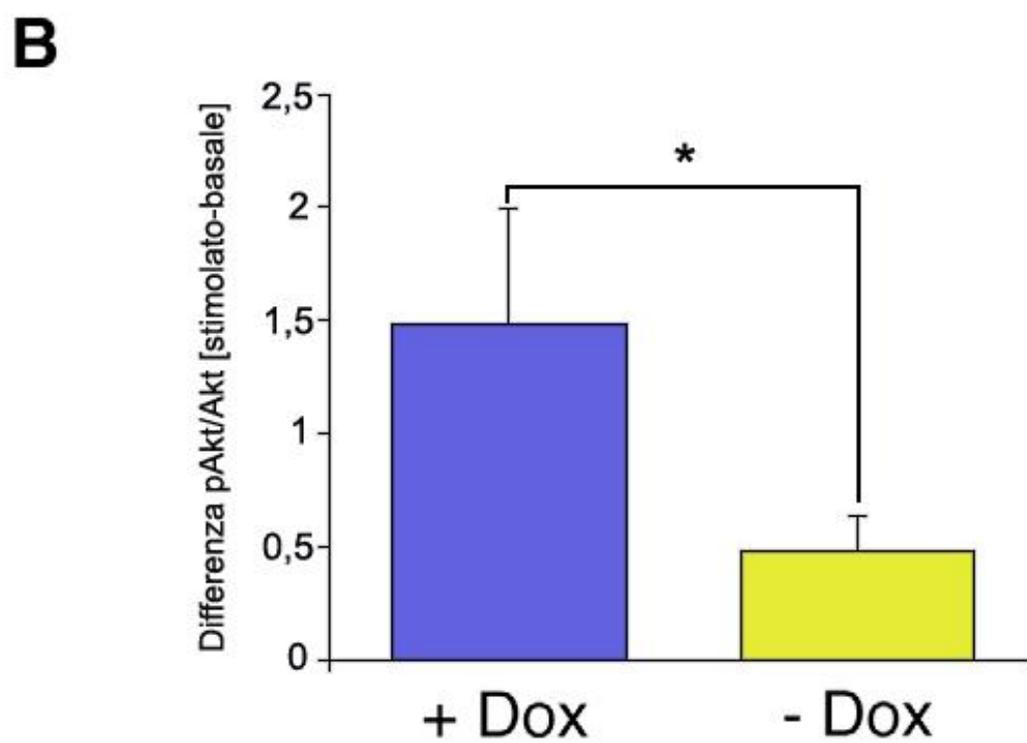
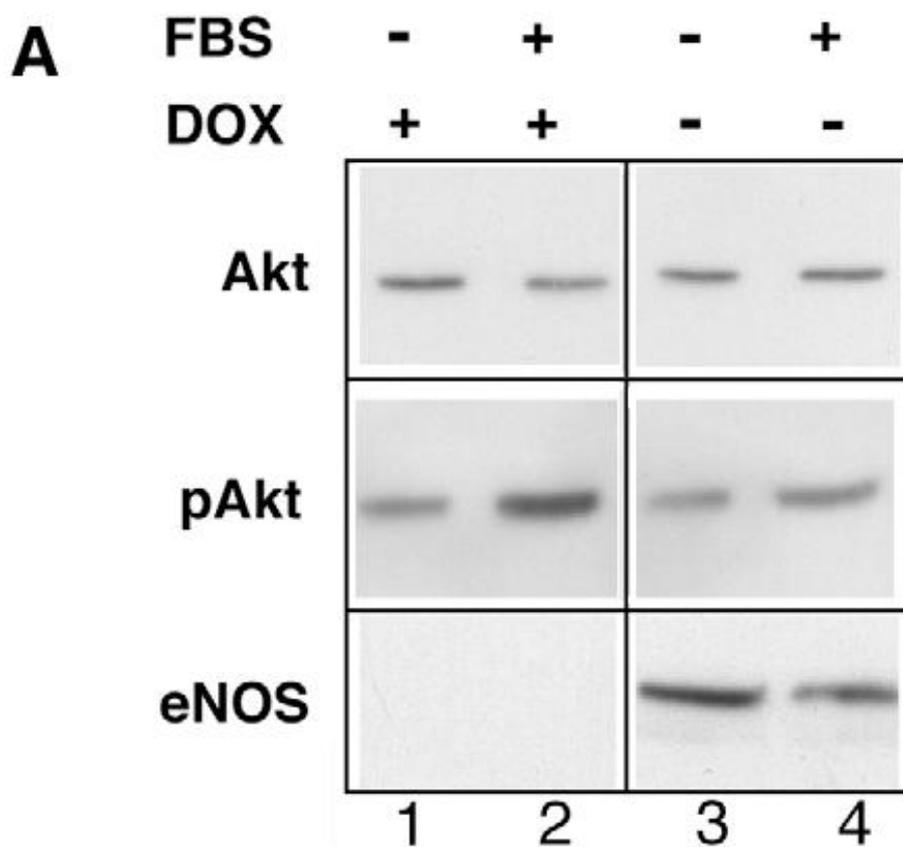
PI3K/Akt e ho perciò analizzato l'attivazione di questa via in risposta al siero in cellule indotte e non indotte ad esprimere la eNOS.

Per analizzare l'effetto della espressione della eNOS sulla attivazione della via PI3K/Akt in risposta al siero, ho mantenuto cellule eNOS-HeLa-TetOff, indotte o non indotte, in assenza di siero per 12 ore. Una piastra di cellule tenute in queste condizioni è stata sottoposta a lisi mentre ad un'altra piastra è stato aggiunto siero al 10% e le cellule sono state lisate dopo altri 15 minuti. I lisati sono stati analizzati mediante western blotting con anticorpi che riconoscono Akt, pAkt ed eNOS. Come mostrato ed atteso (Fig 31 pannello A e B), le cellule non indotte e private di siero (corsie 1, 2) in seguito ad esposizione al siero presentano un aumento significativo di circa 1,5 volte di pAkt. Invece, in accordo con la loro ridotta capacità migratoria, le cellule esprimenti la eNOS e private di siero hanno risposto in maniera significativamente minore alla riaggiunta di siero, con un aumento della fosforilazione di Akt di solo circa 0,5 volte (Fig. A, corsie 3, 4; quantificazione in pannello B).

3.5.6. Effetto di concentrazioni nanomolari di DETA-NO sulla fosforilazione di Akt in risposta al siero

Per chiarire il meccanismo molecolare attraverso cui l'esposizione cronica a NO riduce la responsività della via PI3K/Akt ho esteso l'analisi a cellule HeLa-TetOff NT trattate con bassa concentrazione di DETA-NO (0,1 μ M) per 48 h. (Si noti che questa

Figura 31. L'espressione cronica della eNOS diminuisce la fosforilazione di Akt in risposta al siero. A: Le cellule cresciute in presenza o assenza di doxibicilina e poi incubate per tutta la notte in mezzo privo di siero, sono state lisate (corsie 1 e 3), o esposte per 15' a FBS prima di essere lisate (corsie 2 e 4) e poi analizzate mediante western blotting per Akt, pAkt ed eNOS. B: Analisi quantitativa di quattro esperimenti indipendenti condotti come illustrato nel pannello A. In ordinata è mostrato il rapporto, determinato per densitometria, tra pAkt/Akt nei campioni esposti a siero meno questo stesso rapporto nei campioni non esposti. Nel pannello è mostrata la media \pm SEM di 4 esperimenti; * indica la $P < 0,05$ calcolata con il Ratio t test accoppiato. Le cellule non indotte e private di siero in seguito ad esposizione al siero presentano un aumento di circa 1,5 volte di pAkt, mentre quelle esprimenti la eNOS presentano una fosforilazione di Akt minore.



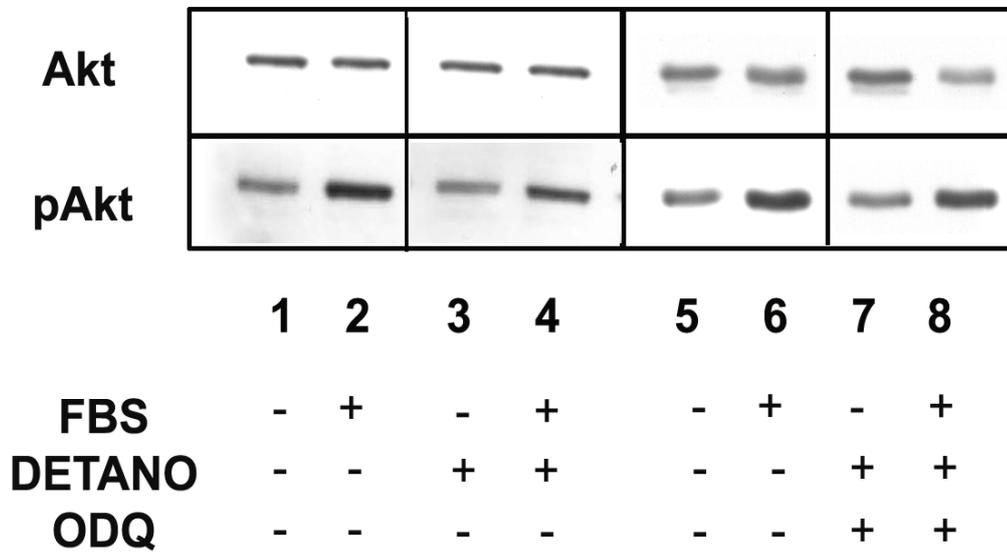
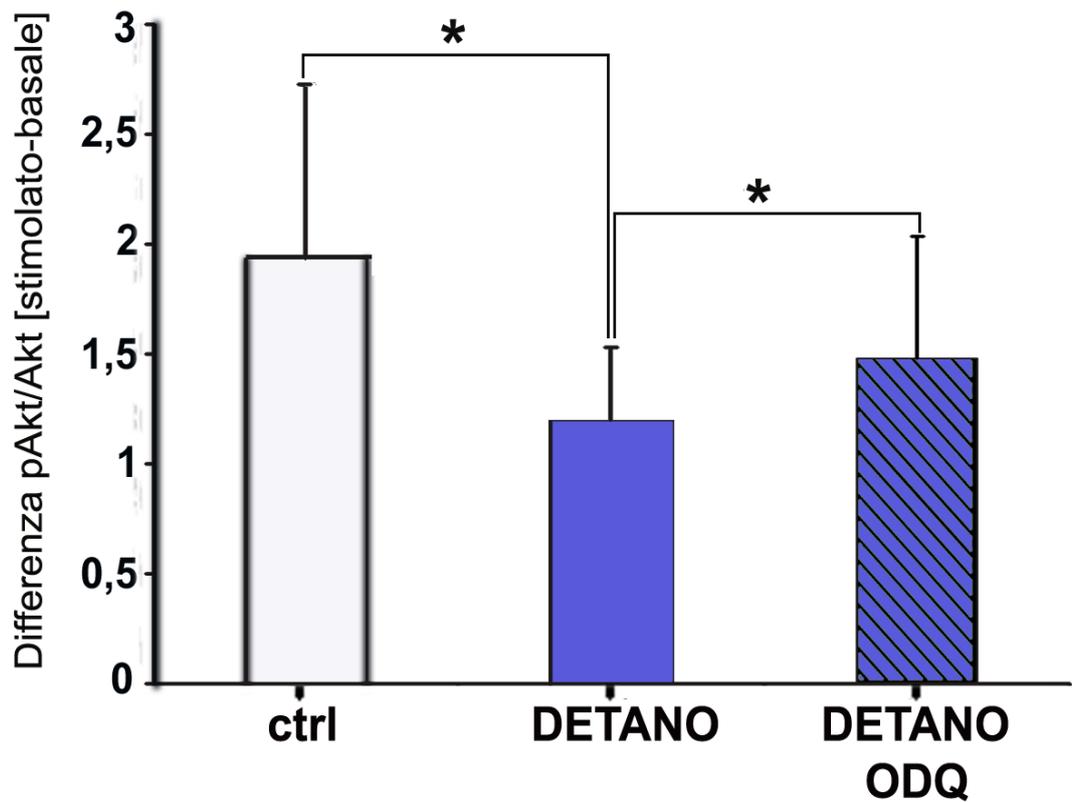
concentrazione è 10-100 volte minore di quelle utilizzate generalmente negli studi pubblicati).

Come si può osservare in figura 32 pannelli A e B, in accordo con i dati ottenuti con le cellule eNOS-HeLa-TetOff, le cellule trattate con DETA-NO e private di siero presentavano una ridotta fosforilazione di Akt in seguito alla riaggiunta di siero (corsia 4) rispetto alle cellule HeLa-TetOff NT non trattate (corsia 2). Inoltre, per chiarire le vie di *signalling* coinvolte ho condotto esperimenti nelle stesse condizioni ma trattando le cellule simultaneamente con DETA-NO e ODQ (1 μ M). La co-incubazione delle cellule con DETA-NO e ODQ (corsia 8) riduce l'effetto del DETA-NO (corsia 4), in accordo con quanto osservato negli esperimenti di migrazione (sezione 3.3).

3.6. Analisi proteomica delle cellule esposte a NO basale

Per generare un quadro globale degli effetti del NO basale sul fenotipo cellulare, ho deciso di avvalermi di tecniche proteomiche. Ho dunque analizzato mediante elettroforesi bidimensionale estratti ottenuti da cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte [-dox o +dox 0,05 ng/ml (con un'espressione minore della eNOS (Bulotta et al., 2001)] o non indotte (+dox) ad esprimere la eNOS, e da cellule HeLa-TetOff NT trattate o non trattate con DETA-NO 0.1 μ M per 48 ore. Ciascun campione è stato sottoposto a due elettroforesi separate. I gel bidimensionali ottenuti in una delle due analisi sono mostrati in figura 33 e 34. Questo lavoro è stato eseguito in collaborazione con la

Figura 32. Concentrazioni nanomolari di DETA-NO diminuiscono la fosforilazione di Akt in risposta al siero. A: Le cellule HeLa-TetOff NT trattate o non trattate con DETA-NO o simultaneamente con DETA-NO e ODQ, come indicato sotto le corsie, sono state incubate per tutta la notte in mezzo privo di siero e poi lisate (corsie 1, 3, 5, 7), oppure esposte per 15' a siero FBS prima di essere lisate (corsie 2, 4, 6, 8). I lisati sono stati analizzati mediante western blotting per Akt, pAkt. B: Analisi quantitativa di esperimenti condotti come illustrato nel pannello A. In ordinata è mostrato il rapporto, determinato per densitometria, tra pAkt/Akt nei campioni esposti a siero meno questo stesso rapporto nei campioni non esposti. Nel pannello è mostrata la media \pm SEM di 5 esperimenti; * indica la $P < 0,05$ calcolata con il Ratio t test accoppiato. Le cellule trattate con DETA-NO presentano una fosforilazione di Akt minore rispetto alle cellule non trattate, effetto diminuito dal trattamento simultaneo con ODQ. La differenza tra cellule controllo e quelle trattate con DETA-NO + ODQ non è significativa.

A**B**

dott.ssa Chiara Verpelli dell'Istituto di Neuroscienze del CNR, Milano.

Mediante l'ausilio del software Image master 2D Platinum dopo aver allineato tutte le mappe 2D tra loro, ho normalizzato l'intensità di ogni *spot* in base all'intensità totale degli *spot* presenti in ogni gel. Quindi, ho effettuato le analisi quantitative allo scopo di individuare gli *spot* proteici che presentavano una differente intensità mettendo a confronto, come segue, le seguenti mappe:

- +dox vs -dox;
- +dox (0,05 ng/ml) vs -dox;
- dox vs DETA-NO;
- DETA-NO vs ctrl.

Inoltre, mediante l'analisi con il software Proteom Weaver si è cercato di individuare *spot* proteici *unmatched* (cioè presenti in un campione ed assenti in un altro) mettendo a confronto le seguenti mappe:

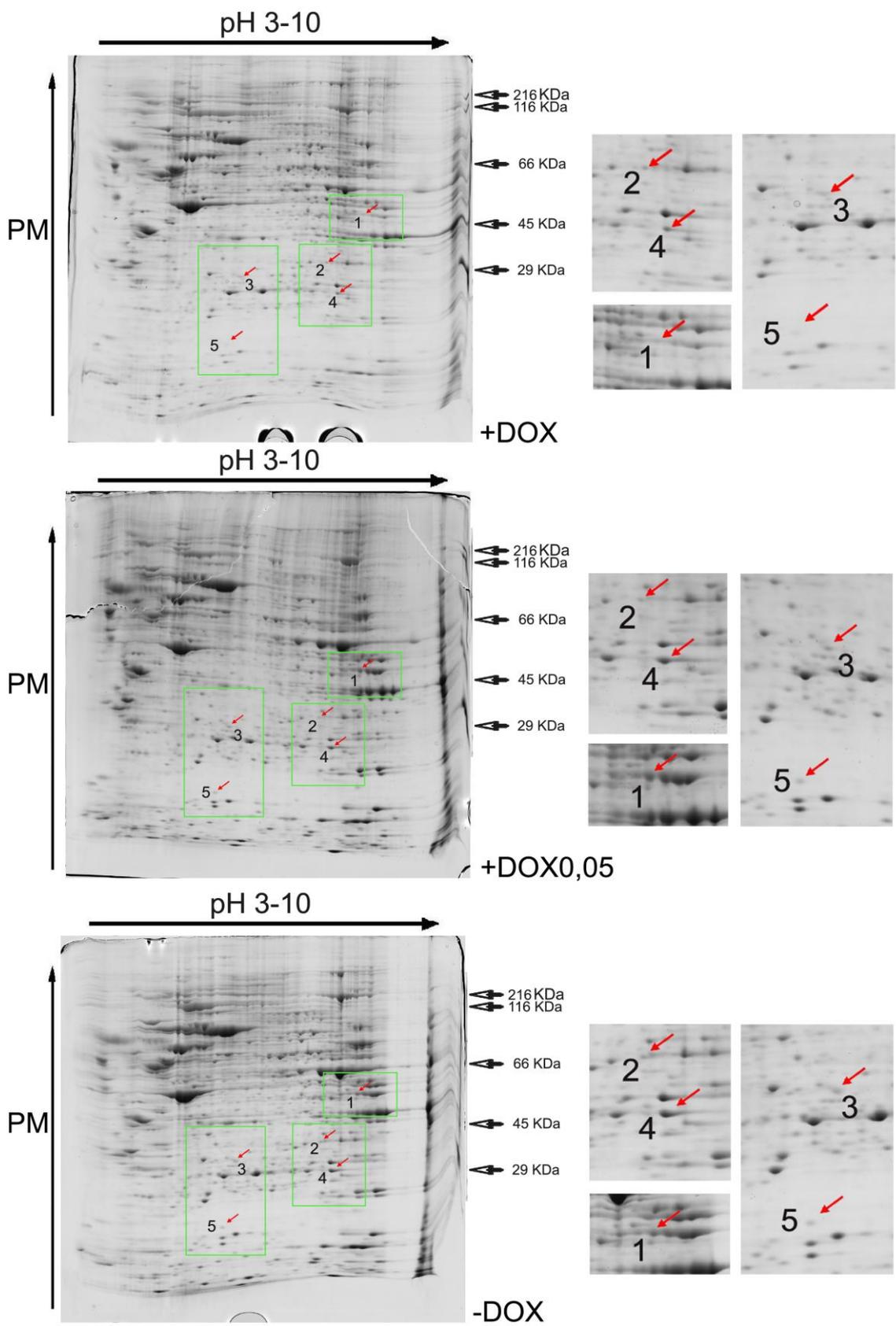
- +dox vs -dox;
- DETA-NO vs ctrl

Come si può osservare nelle figure 33 e 34 tra tanti *spot* individuati da entrambi i programmi sono riuscita ad individuare cinque *spot* in cui l'intensità aumenta in ambedue le analisi, con l'aumentare dell'espressione della eNOS nelle cellule eNOS-HeLa-TetOff, e che, concordemente, aumentano nelle cellule HeLa-TetOff NT esposte a DETA-NO rispetto alle cellule di controllo (ctrl) non trattate.

Sto adesso ripetendo l'analisi su lisati ottenuti da un esperimento indipendente. In caso di conferma dei risultati ottenuti,

procederemo alla identificazione degli *spot* mediante spettrometria di massa.

Figura 33. Gel ottenuti attraverso analisi bidimensionale. Come indicato le mappe sono ottenute da cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte (-dox o +dox 0,05 ng/ml) o non indotte (+dox) ad esprimere la eNOS. Le frecce rosse indicano gli *spot* numerati da 1 a 5 che sono di minore intensità o assenti nei campioni eNOS-HeLaTetOff non indotti. I contorni verdi delimitano le aree che sono mostrate ingrandite di due volte nella parte destra della figura.



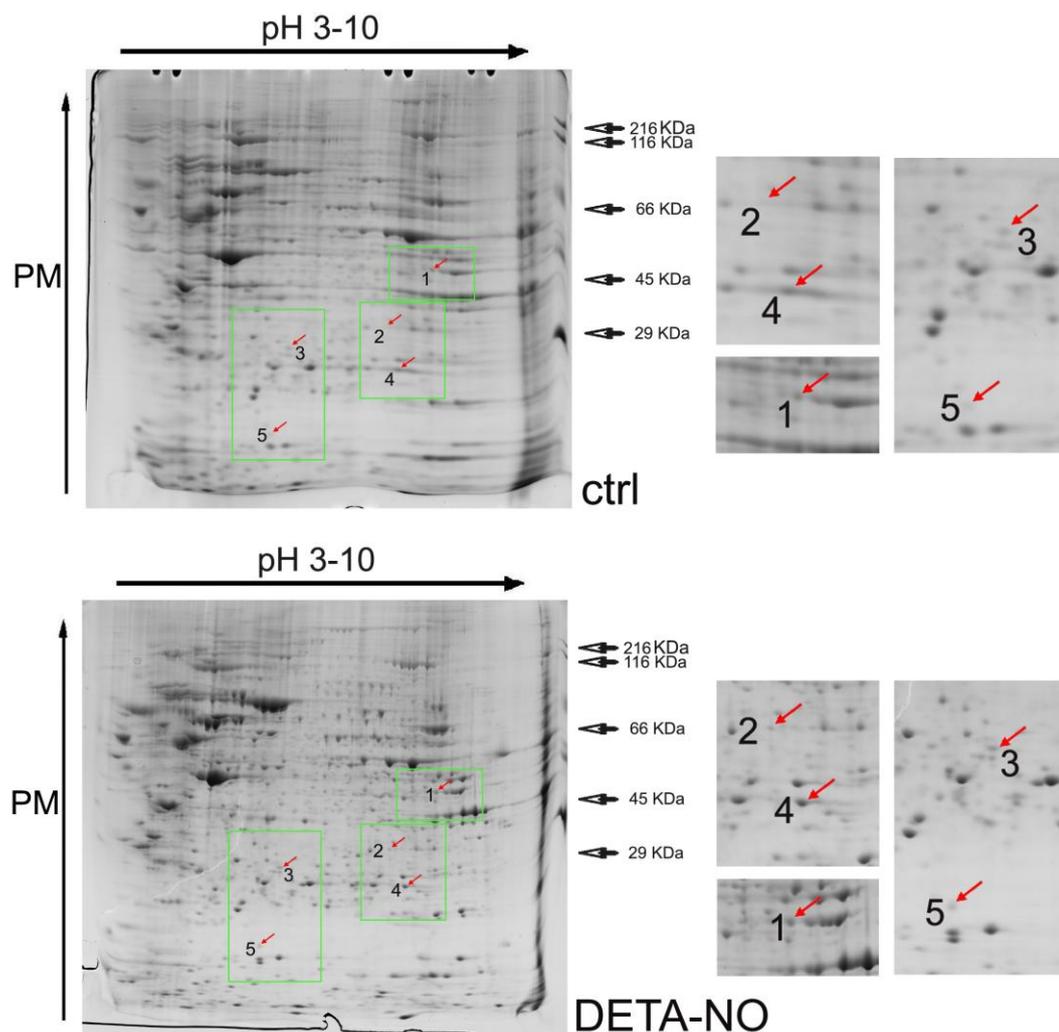


Figura 34. Gel ottenuti attraverso analisi bidimensionale. Come indicato le mappe sono ottenute da cellule HeLa-TetOff NT non trattate (ctrl) o trattate (con DETA-NO). Le frecce rosse indicano gli stessi *spot* numerati della figura precedente, di minore intensità nel campione di controllo. I contorni verdi delimitano le aree che sono mostrate ingrandite di due volte nella parte destra della figura.

4. DISCUSSIONE

4.1. L'esposizione cronica a basse concentrazioni di NO attenua la capacità migratoria di cellule HeLa ed endoteliali

Con poche eccezioni (Lau et al., 1996), è stato generalmente riportato che il NO ha un effetto permissivo sulla migrazione delle cellule endoteliali (Lamalice et al., 2007) ed anche di altri tipi cellulari (Noiri et al., 1997; Noiri et al., 1996; Sciorati et al., 2006). Nel lavoro di questa tesi, ho osservato invece che l'espressione della eNOS riduce la capacità delle cellule di rispondere a stimoli chemiotattici e che tale effetto risulta essere mediato dal NO.

La differenza tra il risultato del mio studio e quelli di precedenti lavori potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni sperimentali. Nella maggior parte degli studi, sono stati osservati gli effetti dovuti a somministrazione del NO durante la chemiotassi (Babaei and Stewart, 2002; Isenberg et al., 2005; Noiri et al., 1996; Pyriochou et al., 2007) così come quelli dovuti all'inibizione della eNOS durante la migrazione (Goligorsky et al., 1999; Morales-Ruiz et al., 2000; Noiri et al., 1997; Pyriochou et al., 2007; Ziche et al., 1994), oppure sovraesprimendo la eNOS (Kawasaki et al., 2003). Lo scopo del mio lavoro invece è stato quello di studiare, in condizioni fisiologiche, l'esposizione cronica a concentrazioni basse di NO. A questo fine ho utilizzato una linea cellulare (HeLa-TetOff) stabilmente transfettata con il cDNA della eNOS bovina sotto il controllo di un promotore doxiciclina-responsivo (Bulotta et al., 2001), in modo da poter paragonare il comportamento di cellule che differiscono fra loro solo per i livelli di espressione dell'enzima. Dagli esperimenti eseguiti è emerso che l'espressione della eNOS non influenza la proliferazione cellulare, l'adesione e la motilità bidimensionale nel saggio della

ferita, ma ha un forte effetto inibitorio sulla migrazione cellulare indotta dai fattori motogeni contenuti nel siero. Questa osservazione mi ha indotto a studiare l'effetto dell'esposizione cronica al NO utilizzando il DETA-NO quale donatore di NO su cellule HeLa NT. Il DETA-NO rilascia il gas lentamente a concentrazioni definite e l'esposizione prolungata di cellule a questo composto può quindi mimare l'effetto del NO rilasciato dalla eNOS in condizioni basali. In accordo con i dati ottenuti con le cellule eNOS-HeLa-TetOff, ho osservato che la preincubazione delle cellule con basse concentrazioni di DETA-NO (1-100 nM) inibiva la successiva chemiotassi in assenza del donatore; è da sottolineare che tale effetto inibitorio era smorzato a più alte concentrazioni del donatore. Infine, ho dimostrato che anche l'attività basale della eNOS endogena delle cellule endoteliali inibisce la migrazione: infatti ho osservato un aumento della migrazione nelle HUVEC, verso il siero o VEGF, dopo inibizione cronica della eNOS. Così, in tre sistemi diversi, ho dimostrato un inatteso effetto inibitorio del NO cronico a bassi livelli sulla migrazione in risposta a fattori motogeni del siero.

I risultati da me ottenuti sembrerebbero in apparente contraddizione con i dati presenti in letteratura che dimostrano nelle cellule endoteliali una riduzione della migrazione sia in topi *Knockout* per la eNOS (Lopez-Rivera et al., 2005) che in cellule trattate con oligonucleotidi antisense (Noiri et al., 1997). In realtà bisogna considerare che nelle cellule silenti o *Knockout* per la eNOS, l'attività dell'enzima è assente sia cronicamente che durante il saggio di migrazione. Perciò in questi sistemi potrebbe prevalere l'effetto negativo della assenza di attività della eNOS durante la migrazione.

Probabilmente la produzione di NO durante la migrazione delle HUVEC ha un effetto permissivo che domina su qualsiasi effetto negativo dovuto al rilascio basale del gas. Al contrario, nei nostri esperimenti con l'L-NAME, il farmaco è rimosso durante il saggio di migrazione, permettendo così di discriminare tra gli effetti cronici ed acuti dell'inibizione della eNOS.

Mentre l'alterazione del fenotipo migratorio delle cellule HeLa-TetOff NT trattate con DETA-NO, e di cellule HUVEC trattate con L-NAME è legata direttamente alla produzione di NO, i meccanismi alla base dell'attenuazione della migrazione nelle cellule eNOS-HeLa-TetOff, esprimenti la eNOS, sembrano essere più complicati. Infatti, in quest'ultime l'effetto dell'espressione della eNOS è solo parzialmente revertito dal L-NAME. E' probabile che questo effetto parziale sia dovuto alla non completa inibizione dell'enzima da parte del L-NAME, per la presenza nel mezzo di coltura del substrato competitivo (L-arginina). Tuttavia non posso escludere l'ipotesi che l'espressione dell'enzima alteri il fenotipo migratorio delle cellule eNOS-HeLa-TetOff anche attraverso meccanismi NO-indipendenti che potrebbero coinvolgere interazioni dirette proteina-proteina. Sfortunatamente le cellule, indotte e non indotte, mantenute in coltura in mezzo privo di arginina presentavano una capacità migratoria severamente ridotta, così non ho potuto saggiare gli effetti dell' L-NAME in condizioni ottimali per l'inibizione della eNOS. E' dunque possibile che entrambi i meccanismi, NO-dipendenti ed NO-indipendenti, operino nelle cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte. Ho successivamente focalizzato la mia attenzione sui possibili

meccanismi NO-dipendenti alla base dell'inibizione della migrazione chemiotattica.

4.2. Possibili meccanismi alla base dell'effetto del NO basale sulla migrazione

Alcuni studi hanno dimostrato che la produzione del NO sopra i livelli basali agisce positivamente sulla migrazione attraverso *pathway* sia cGMP-dipendenti (Isenberg et al., 2005; Kawasaki et al., 2003) che cGMP-indipendenti (Pyriochou et al., 2007). Per chiarire il meccanismo tramite cui basse concentrazioni croniche di NO attenuano la migrazione, ho valutato se il NO possa agire via cGMP. Nelle cellule HeLa-TetOff NT ho osservato che l'effetto del DETA-NO era quasi completamente revertito da parte dell'inibitore della sGC, ODQ; inoltre il trattamento con l'8-Br-cGMP aveva effetti sovrapponibili a quelli del DETA-NO. Questi dati indicano che, almeno in questo contesto, l'effetto di attenuazione del NO sulla migrazione è interamente mediato dal *pathway* sGC-cGMP. La reversione solamente parziale dell'ODQ sulle cellule eNOS-HeLa-TetOff suggerisce invece che in queste cellule l'effetto della eNOS sulla migrazione possa essere mediato anche da *pathways* cGMP-indipendenti. Per quanto riguarda le cellule endoteliali, sono adesso in corso esperimenti per valutare l'effetto della ODQ, ma al momento della stesura di questa tesi questi esperimenti non sono ancora stati completati.

Per quanto riguarda possibili meccanismi operanti a valle del

NO/cGMP, ho saggiato varie ipotesi, tra cui un coinvolgimento di HIF-1 α , una alterazione nella organizzazione della rete mitocondriale o della funzionalità energetica dei mitocondri e una alterazione della via di “*signalling*” PI3K-Akt. HIF-1 α è un fattore trascrizionale stabilizzato dalla carenza di O₂, la cui espressione stimola la migrazione cellulare (Kunz et al., 2003). I suoi livelli sono modulati anche dal NO, in modo diverso a seconda della concentrazione e dei tempi di esposizione al gas (Berchner-Pfannschmidt et al., 2010). Perciò è sembrato ragionevole indagare se nel nostro sistema il NO esercitasse i suoi effetti tramite alterazione dei livelli di questo fattore trascrizionale. Analogamente, il NO ha molteplici effetti sui mitocondri e sulla respirazione (si veda l’Introduzione di questa tesi), e inoltre è stato riportato che lo stato di interconnessione della rete mitocondriale influenza la capacità migratoria di alcuni tipi cellulari (Campello et al., 2006). Tuttavia, i miei esperimenti hanno escluso un coinvolgimento sia di HIF-1 α che dello stato morfo-fisiologico dei mitocondri nel cambiamento del fenotipo migratorio indotto da NO. Più interessanti invece sono stati i risultati ottenuti sul sistema PI3K/Akt.

Il *signalling* del NO e di Akt sono strettamente interconnessi, dal momento che Akt attiva la eNOS fosforilandola in Ser 1177 (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999) e l’NO, a sua volta, aumenta la fosforilazione di Akt (Kawasaki et al., 2003). Per chiarire il meccanismo attraverso cui l’espressione della eNOS riduce la capacità migratoria delle cellule HeLa, ho analizzato la fosforilazione di Akt in risposta al siero, in cellule indotte e non indotte. Ho osservato che l’esposizione di cellule non indotte e private di siero al

siero causa un aumento di 1,5 volte nella fosforilazione di Akt, come atteso. Al contrario, e in accordo con la loro capacità migratoria ridotta, la fosforilazione di Akt in risposta al siero era più bassa nelle cellule indotte.

Per confermare l'effetto attenuante sulla via PI3K/Akt del NO basale, ho eseguito esperimenti simili a quelli appena descritti su cellule HeLa-TetOff NT, trattate cronicamente con bassa concentrazione (100 nM) del donatore DETA-NO. In accordo con i risultati ottenuti con le cellule transfettate, ho osservato che le cellule trattate con il donatore e private di siero mostravano una minore fosforilazione di Akt in risposta alla riaggiunta di siero in confronto alle cellule non trattate con il donatore. Inoltre, il trattamento contemporaneo delle cellule con DETA-NO e ODQ ha soppresso l'effetto del DETA-NO, a indicare che l'effetto del NO sulla via PI3K/Akt è mediato da cGMP.

Cellule esprimenti endogenamente la eNOS sono capaci di attivare la cascata di segnalazione PI(3)K-Akt (Dimmeler et al., 2000), e nel mio laboratorio è stato precedentemente dimostrato che anche cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte attivano questo *pathway* in risposta al Fattore di Crescita Epidermico (EGF) ed al TNF- α (Barsacchi et al., 2003). Tuttavia l'attenuazione di questo *pathway* in risposta al siero 10% potrebbe fornire il nesso causale tra la produzione tonica di NO e la ridotta migrazione chemiotattica da me osservata.

Un problema non risolto è il meccanismo attraverso cui la eNOS riduce il *signalling* PI(3)K-Akt. L'esposizione acuta al NO aumenta la fosforilazione di Akt (Kawasaki et al., 2003), quindi è

plausibile che l'attività basale della eNOS possa indurre una precoce desensitizzazione, attualmente non riportata in letteratura, di questo *pathway* di segnalazione in risposta ai fattori motogeni. Chiaramente, data la complessità del *signalling* del NO e della regolazione della migrazione cellulare (Kolsch et al., 2008), altri effettori a valle della eNOS potrebbero essere coinvolti nel meccanismo descritto in questo studio.

4.3 L'effetto bifasico del NO

Un punto importante da discutere è l'andamento bifasico della curva dose-effetto del DETA-NO sulle cellule HeLa-TetOff esposte per due giorni al donatore. L'effetto bifasico del DETA-NO potrebbe spiegare la differenza tra i miei risultati e quello dell'unico gruppo che ha utilizzato un protocollo simile al mio (Sciorati et al., 2006). Gli autori hanno osservato con saggi di Boyden un aumento della migrazione di mesangioblasti in seguito al pre-trattamento di 12h con DETA-NO. In realtà questo dato è solo in apparente contraddizione con il nostro, dal momento che tale effetto è stato ottenuto con dosi più alte di DETA-NO (20 μM) rispetto alla concentrazione ottimale da me utilizzata (0,1 μM). Va sottolineato che concentrazioni di DETA-NO pari a 0,1 μM determinano una produzione di NO troppo bassa (al di sotto del 2 nM) da poter essere rilevata con le procedure sperimentali standard (Ridnour et al., 2005).

L'effetto bifasico del NO da noi riportato è stato precedentemente osservato in altri contesti. Per esempio, nelle cellule

umane di ghiandola mammaria MCF7, l'esposizione a concentrazioni di NO più basse di 50 nM portano alla fosforilazione della protein chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK). A concentrazioni più alte di NO, la fosforilazione di ERK è attenuata ed il fattore inducibile da ipossia (HIF-1 α) viene stabilizzato (Thomas et al., 2004). Analogamente, la secrezione di trombospondina-1 da parte di cellule endoteliali diminuisce dopo esposizione, a tempi lunghi, a DETA-NO a concentrazioni al di sotto di 0,1 μ M mentre aumenta a dosi più alte del donatore (Ridnour et al., 2005). Perciò l'effetto bifasico del NO sulla migrazione è probabilmente dovuto alla modulazione, concentrazione dipendente del gas, dell'espressione di proteine o di modificazioni post-traduzionali delle stesse, coinvolte in maniera opposta nei *pathways* di migrazione con conseguenti risultati opposti sul fenotipo migratorio.

4.4. Analisi del proteoma di cellule esposte cronicamente a NO basale

Nella maggior parte del lavoro di questa tesi, ho eseguito esperimenti suggeriti da ipotesi definite (hypothesis-driven). Vista la complessità delle vie di *signalling* coinvolte nei fenomeni da me studiati, ho voluto affrontare il problema anche con un approccio senza preconcetti (*unbiased*). Perciò, ho deciso di analizzare il proteoma di cellule eNOS-HeLa-TetOff, indotte e non indotte, in confronto a cellule HeLa-TetOff NT trattate cronicamente con bassa concentrazione (100 nM) di DETA-NO. Lo scopo di questo confronto

è stato quello di identificare cambiamenti nell'espressione genica dovuti alla generazione di NO basale, escludendo, almeno per il momento, altri cambiamenti che potrebbero essere dovuti all'espressione della eNOS ma non ascrivibili a NO nelle cellule eNOS-HeLa-TetOff indotte (si veda prima parte della Discussione). Abbiamo anche analizzato queste ultime coltivate in presenza di basse concentrazioni di DOX (104 nM), che permettono una debole espressione della eNOS (Bulotta et al., 2001), a livelli vicini a quelli osservati nelle cellule HUVEC.

L'analisi mediante elettroforesi bidimensionale ci ha permesso di identificare cinque *spot* che aumentano nelle cellule esposte a NO (eNOS-HeLa TetOff coltivate in assenza di dox o a basse concentrazioni dell'antibiotico e cellule HeLa-TetOff NT esposte a DETA-NO) rispetto a quelle non esposte (eNOS-HeLa TetOff coltivate in presenza di dox e cellule HeLa-TetOff NT e non trattate). Al momento della stesura di questa tesi i polipeptidi corrispondenti a questi *spot* non sono stati ancora identificati. Tuttavia, i dati finora ottenuti ci incoraggiano a ritenere che la loro identificazione ci possa aiutare a meglio comprendere la base dei cambiamenti fenotipici da noi osservati in cellule esposte cronicamente a basse concentrazioni di NO.

4.5. Conclusioni

La ricerca riportata in questa tesi ha prodotto dei risultati inattesi, in quanto fino ad adesso vi è era un consenso generale su un

ruolo positivo del NO nella migrazione e, al contrario, limitatissime osservazioni su un suo possibile effetto inibitorio. I miei esperimenti hanno dimostrato chiaramente una riduzione nella capacità migratoria chemiotattica in tre diversi sistemi cellulari e dimostrano una ancor maggiore complessità nell'azione del gas di quanto già apprezzato da precedenti lavori. Le nostre conclusioni sulla interazione tra NO, migrazione e PI3K/Akt *signalling* non vogliono mettere in dubbio l'ampia letteratura sull'argomento (si veda l'Introduzione di questa tesi) ma illustrano ancora una volta le complessità dell'azione del messaggero gassoso, i cui effetti dipendono sia dal tipo cellulare che dalla concentrazione e dai tempi di esposizione delle cellule.

L'effetto inibitorio del NO da me osservato potrebbe essere importante per la fisiologia sia delle cellule endoteliali che di altri tipi cellulari. L'attenuazione della migrazione determinata dal rilascio basale di NO potrebbe costituire un freno importante all'inappropriata migrazione cellulare e potrebbe prevenire esagerate risposte angiogeniche delle cellule endoteliali. I miei risultati inoltre dovrebbero essere tenuti presenti in studi finalizzati a modulare la migrazione cellulare attraverso il potenziamento o l'inibizione del *signalling* del NO.

PRODUZIONE SCIENTIFICA DEL LAVORO DI TESI

Bulotta S, Ierardi MV, Maiuolo J, Cattaneo MG, Cerullo A, Vicentini LM, Borgese N. (2009). Basal nitric oxide release attenuates cell migration of HeLa and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 744-9.

BIBLIOGRAFIA

Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC. (2005). Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* 115: 2119-27.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition Garland Science, New York.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
Angelin (2007).

Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. (2004). Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 963–9.

Anderson RG. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.

Angelin A, Tiepolo T, Sabatelli P, Grumati P, Bergamin N, Golfieri C, Mattioli E, Gualandi F, Ferlini A, Merlini L, Maraldi NM, Bonaldo P, Bernardi P. (2007). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 991-6.

Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG. (1994). Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1381–8.

Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, Lowenstein CJ. (1996). Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. *J Biol Chem* 271: 15069–73.

Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S, Katayama S. (2004). Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 2184-90.

Babaei S, and Stewart DJ. (2002). Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model, *Cardiovasc Res* 55: 190-200.

Barsacchi R, Perrotta C, Bulotta S, Moncada S, Borgese N, Clementi E. (2003). Activation of endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor- α : a novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, phosphatidylinositol-3' kinase, and Akt. *Mol Pharmacol* 63: 886-95.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. (1995). Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 896-900.

Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. (2003). Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 278: 14841-9.

Bauer PM, Yu J, Chen Y, Hickey R, Bernatchez PN, Looft-Wilson R, Huang Y, Giordano F, Stan RV, Sessa WC. (2005). Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 204-9.

Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ. (1991). Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 198: 219-21.

Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Kirsch M, Fandrey J. (2010). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell Signal* 22: 349-56.

Bjelloqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Huger GJ, Hochstrasser D. (1993). Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*,14: 1375-8.

- Blair A**, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. (1999). Oxidized Low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274: 32512-9.
- Bolotina VM**, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-3.
- Boo YC**, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H. (2002a). Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 283: H1819–28.
- Boo YC**, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. (2002b). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 3388–96.
- Boo YC**, Sorescu GP, Bauer PM, Fulton D, Kemp BE, Harrison DG, Sessa WC, Jo H. (2003). Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radic Biol Med* 35: 729–41.
- Braam B** and Verhaar MC. (2007). Understanding eNOS for pharmacological modulation of endothelial function: a translational view. *Curr Pharm Des* 13: 1727-40.
- Brouet A**, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. (2001). Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 89: 866-73.
- Bucci M**, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6: 1362-7.
- Bulotta S**. (2005). DOTTORATO DI RICERCA“*Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare*”. XVI Ciclo.

Bulotta S, Cerullo A, Barsacchi R, Palma CD, Rotiroti D, Clementi E, Borgese N. (2006). Endothelial nitric oxide synthase is segregated from caveolin-1 and localizes to the leading edge of migrating cells. *Exp. Cell Res* 312: 877–89.

Bulotta S, Barsacchi R, Rotiroti D, Borgese N, Clementi E. (2001). Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha. A novel feedback mechanism regulating cell death. *J Biol Chem* 276: 6529-36.

Busconi L and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. (1993). N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268: 8410-3.

Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (Type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 275: 5179–87.

Campello S, Lacalle RA, Bettella M, Manes S, Scorrano L, Viola A (2006). Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J Exp Med* 203: 2879-86.

Cao S, Yao J, Shah V. (2003). The proline-rich domain of dynamin-2 is responsible for dynamin dependent in vitro potentiation of endothelial nitric-oxide synthase activity via selective effects on reductase domain function. *J Biol Chem* 278: 5894–901.

Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-95.

Carreras MC, Franco MC, Finocchietto PV, Converso DP, Antico Arciuch VG, Holod S, Peralta JG, Poderoso JJ. (2007) The biological significance of mtNOS modulation. *Front Biosci* 12: 1041-8.

Carreras MC and Poderoso JJ. (2007) Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 1569-80.

Cattaneo MG., Chini B., Vicentini LM. (2008). Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J. Pharmacol* 153: 728–36.

Chen JX, Lawrence ML, Cunningham G, Christman BW, Meyrick B. (2004). HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J Appl Physiol* 96: 612-20.

Chen Z-P, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443: 285–9.

Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. (1992). Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71: 1093-102.

Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. (2002). Nitric oxide as a pro apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 35: 116-26.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1075-9.

Church JE and Fulton D. (2006). Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *J Biol Chem* 281: 1477-88.

Cieslik K, Zembowicz A, Tang JL, Wu KK. (1998). Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 273: 14885–90.

Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. (2003). Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 24: 91.

Clementi E, Brown GC, Foxwell N, Moncada S. (1999). On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1559-62.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-21.

Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Hewett P, Ahmed S, Ahmed A. (2006). VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1275-82.

Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89: 1073-80.

de Frutos T, Sánchez de Miguel L, Farré J, Gómez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nuñez A, Rico L, López-Farré A. (2001). Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor-alpha and during myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 37: 800-7.

Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W. (2001). NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J* 15: 79-89.

De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, Lièvremon JP, Sciorati C, Barsacchi R, Moncada S, Meldolesi J, Clementi E. (2000). Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5480-5.

De Silvestris M, D'Arrigo A, Borgese N. (1995). The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Lett* 370: 69-74.

Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-62.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-5.

Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449–52.

Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, Kingwell BA. (2004). High density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6999–7004.

Duda DG, Fukumura D, Jain RK. (2004). Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 10: 143–5.

Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. (1995). Nitric oxide inhibits angiotensin II induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. *J. Clin. Invest* 96: 141–9.

Dudzinski DM and Michel T. (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75: 247-60.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 235-76.

Duval M, Le Boeuf F, Huot J, Gratton JP. (2007). Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. *Mol Biol Cell* 18: 4659-68.

Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, Singh BB, Garrett S, Shavali S, Sharma SK. (2005). Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res* 134: 67–75.

Erwin PA, Lin AJ, Golan DE, Michel T. (2005). Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280: 19888–94.

Erwin PA, Mitchell DA, Sartoretto J, Marletta MA, Michel T. (2006). Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 281: 151–7.

Fabbri F, Brigliadori G, Ulivi P, Tesei A, Vannini I, Rosetti M, Bravaccini S, Amadori D, Bolla M, Zoli W. (2005). Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis* 10: 1095-103.

Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB. (1999). VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 192–7.

Fernandez-Hernando C, Fukata M, Bernatchez PN, Fukata Y, Lin MI, Bredt DS. (2006). Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Biol* 174: 369–77.

Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. (2001). Hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103: 113–8.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. (1999). Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 103: 897–905.

Feron O, Michel JB, Sase K, Michel T. (1998). Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37: 193-200.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 88: E68-E75.

Fleming I and Busse R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1-R12.

Folkman J and Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-4.

Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. (2002). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90: 866-73.

Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. (2003). Caveolin, Caveolae, and Endothelial Cell Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 729-36.

Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin cell Biol* 15: 590-7.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2604-9.

Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC. (2005). Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem* 280: 35943-52.

Fulton D, Babbitt R, Zoellner S, Fontana J, Acevedo L, McCabe TJ, Iwakiri Y, Sessa WC. (2004). Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release. *J Biol Chem* 279: 30349-57.

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC. (2002). Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide

in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 277: 4277–84.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. (2001). Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299: 818-24.

Fulton D, Ruan L, Sood SG, Li C, Zhang Q, Venema RC. (2008). Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ Res* 102: 497-504.

Galbiati F, Razani B, Lisant MP. (2001). Emergin themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106: 403-11.

Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA. (1999). Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem* 274: 30101–8.

García C, Aranda J, Arnold E, Thébault S, Macotela Y, López-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernández-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM, Clapp C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118: 2291–300.

García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821–4.

García-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6448-53.

Garg UC and Hassid A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-7.

Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martínez C, Boscá L. (1995). Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 95: 1884-90.

Ghfourifar P and Cadenas E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 26: 190-5.

Ghfourifar P and Richter C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418: 291-6.

Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ. (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem* 273: 22267-71.

Gibbs SM. (2003). Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol* 27: 107-20.

Giustiniani J, Couloubaly S, Baillet A, Pourci ML, Cantaloube I, Fourniat C, Paul JL, Poüs C. (2009). Basal endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation on Ser(1177) occurs in a stable microtubule- and tubulin acetylation-dependent manner. *Exp Cell Res* 315: 3509-20.

Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. (1999). Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2788-93.

Goligorsky MS, Abedi H, Noiri E, Takhtajan A, Lense S, Romanov V, Zachary I. (1999). Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol* 276: C1271-81.

Golstein P, Ojcius DM and Young JD. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121: 29-65.

Gonzalez E, Kou R, Lin AJ, Golan DE, Michel T. (2002). Subcellular targeting and agonist-induced site-specific phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277: 39554-60.

Govers R, van der Sluijs P, van Donselaar E, Slot JW, Rabelink TJ. (2002). Endothelial nitric oxide synthase and its negative regulator caveolin-1 localize to distinct perinuclear organelles. *J Histochem Cytochem* 50: 779-88.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. (2000). Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin-stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275: 22268-72.

Greif DM, Kou R, Michel T. (2002). Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* 41: 15845-53.

Gruber HJ, Bernecker C, Lechner A, Weiss S, Wallner-Blazek M, Meinitzer A, Höbarth G, Renner W, Fauler G, Horejsi R, Fazekas F, Truschnig-Wilders M. (2009). Increased nitric oxide stress is associated with migraine. *Cephalalgia*.

Grumbach IM, Chen W, Mertens SA, Harrison DG. (2005). A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor κ -B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J Mol Cell Cardiol* 39: 595-603.

Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA. (2001). Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 291-5.

Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. (2005). Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 280: 19704-10.

Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. (1996). Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 32: 2386-93.

Hansen CG and Nichols BJ. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 122: 1713-21. Review.

Harris MB, Bartoli M, Sood SG, Matts RL, Venema RC. (2006). Direct interaction of the cell division cycle 37 homolog inhibits endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 98: 335–41.

Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, Kemp BE, Venema RC. (2004). Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H560–6.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC. (2000). Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol* 35: 165-70.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC. (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 276: 16587–91.

Hemmens B, Goessler W, Schmidt K, Mayer B. (2000). Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 275: 35786-91.

Hernández-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. (1998). Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric

oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101: 2711–9.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150-66.

Ho FM, Lin WW, Chen BC, Chao CM, Yang CR, Lin LY, Lai CC, Liu SH, Liau CS. (2006). High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- κ B and c-Jun NH₂-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cellular Signalling* 18: 391–9.

Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S. (2001). Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res* 89: 709–15.

Icking A, Matt S, Opitz N, Wiesenthal A, Muller-Esterl W, Schilling K. (2005). NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. *J. Cell Sci* 118: 5059–69.

Igarashi J, Bernier SG, Michel T. (2001). Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 12420-6.

Igarashi J, Thatte HS, Prabhakar P, Golan DE, Michel T. (1999). Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12583-8.

Ignarro LJ. (1989). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65: 1–21.

Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. (2005). Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13141-6.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-56.

Jagnandan D, Sessa WC, Fulton D. (2005). Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. 289: C1024-33.

Jiang J, Cyr D, Babbitt RW, Sessa WC, Patterson C. (2003). Chaperone dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 278: 49332-41.

Jiang X and Wang X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73: 87-106.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. (1997). Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272: 18522-5.

Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J. (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14126-31.

Kawasaki K, Smith RS, Jr., Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. (2003). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 5726-37.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. (1999). Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 84: 253-256.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272: 31138-48.

Kim YM, Bergonia H, Lancaster JR. (1995). Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 374: 228-32.

Klatt P, Schmidt K, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, Mayer B. (1995). Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J* 14: 3687-95.

Kolsch V, Charest PG, Firtel RA. (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* 121: 551-9.

Kou R, Greif D, Michel T. (2002). Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem* 277: 29669–73.

Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. (2000). NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* 406: 633-636.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651–5.

Kunz M, Moeller S, Koczan D, Lorenz P, Wenger RH, Glocker MO, Thiesen HJ, Gross G, Ibrahim SM. (2003). Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 278: 4561-60.

Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P, Feron O. (2004). Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1435-41.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an

integral component of trans-Golginetwork- derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118: 1003-14.

Labarca C. and Paigen K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344–52.

Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 14: 334-47.

Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100: 782-94.

Lau Y-T and Ma W-C. (1996) Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 670–674.

Lee CH, Wei YW, Huang YT, Lin YT, Lee YC, Lee KH, Lu PJ. (2010). CDK5 phosphorylates eNOS at Ser-113 and regulates NO production. *J Cell Biochem* 110: 112-7.

Levine YC, Li GK, Michel T. (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK → Rac1 → Akt → endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem* 282: 20351-64.

Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. (1995). Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270: 319–24.

Li C, Ruan L, Sood SG, Papapetropoulos A, Fulton D, Venema RC. (2007). Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 47: 257-64.

Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T, Förstermann U. (2006). Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 47: 2536-44.

Li H and Forstermann U (2000). Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244–54.

Li H, Raman CS, Glaser CB, Blasko E, Young TA, Parkinson JF, Whitlow M, Poulos TL. (1999). Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 274: 21276-84.

Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG. (2001). Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 114: 1397-408.

Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Flemming I, Busse R, Pritchard Jr KA, Sessa WC. (2003). Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem* 278: 44719–26.

Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 23: 1141-7.

Liu J and Sessa WC. (1994). Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 11691-4.

Liu J, García-Cardena G, Sessa WC. (1995). Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34: 12333-40.

Liu J, Hughes TE, Sessa WC. (1997). The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J Cell Biol* 137: 1525-35.

- Liu X**, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster Jr JR. (1998). Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2175–9.
- Lizarbe TR**, García-Rama C, Tarín C, Saura M, Calvo E, López JA, López-Otín C, Folgueras AR, Lamas S, Zaragoza C. (2008). Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J* 22: 3207–15.
- Lopez-Ongil S**, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M, Lamas S. (1996). Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: H1072–8.
- Lopez-Rivera E**, Lizarbe TR, Martinez-Moreno M, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Barbero A, Rodrigo J, Fernandez AP, Alvarez-Barrientos A, Lamas S, Zaragoza C. (2005). Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 102: 3685–90.
- Lowenstein CJ** and Michel T. (2006). What's in a name? eNOS and anaphylactic shock. *J Clin Invest* 116: 2075–8.
- Luetterforst R**, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Way M, Parton RG. (1999). Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J Cell Biol* 145: 1443-59.
- Majno G** and Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- Manning BD** and Cantley LC. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261–74.
- Manucha W** and Vallés PG. (2008). Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide* 18: 204-15.
- Marletta MA**, Tayeh MA, Hevel JM. (1990). Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* 2: 219-25.

Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Ángeles Higeuras M, Tarín C, Rodríguez-Crespo I, Vázquez J, Lamas S. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8525–30.

Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem (Tokyo)* 133: 773–81.

Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. (2007). SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14855-60.

Mattsson EJ, Kohler TR, Vergel SM, Clowes AW. (1997). Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2245–9.

McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “calcium-independent” eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 6123–8.

Meng W, Ayata C, Waeber C, Huang PL, Moskowitz MA. (1998). Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am J Physiol* 274: H411–5.

Miao RQ, Fontana J, Fulton D, Lin MI, Harrison KD, Sessa WC. (2008). Dominant-negative Hsp90 reduces VEGF-stimulated nitric oxide release and migration in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 105-11.

Michel T, Li GK, Busconi L. (1993). Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6252-6.

Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. (1997). Caveolin versus calmodulin. *J Biol Chem* 272: 25907–12.

Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. (2001). Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 276: 17625-8.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. (1999). The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 9: 845-8.

Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 277: 42344-1.

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. (2002). Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58-65.

Mombouli JV and Vanhoutte PM. (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31: 61-74.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharm Rev* 43: 109-42.

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. (2001). Insulin stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser1179. *J Biol Chem* 276: 30392-8.

Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, Sessa WC. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 86: 892-6.

Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S, Gratton JP, Scotland R, Shiojima I, Walsh K, Hla T, Sessa WC. (2001). Sphingosine 1-

phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 19672-7.

Morbidelli L, Pyriochou A, Filippi S, Vasileiadis I, Roussos C, Zhou Z, Loutrari H, Waltenberger J, Stössel A, Giannis A, Ziche M, Papapetropoulos A. (2010). The soluble guanylyl cyclase inhibitor NS-2028 reduces vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and permeability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R824-32.

Moreno JJ and Pryor WA. (1992). Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 5: 425-31.

Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 31629-39.

Mount PF, Kemp BE, Power DA. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Molec and Cell Cardio*. 42: 271-9.

Munro S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-88.

Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. (1999). Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1156-61.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101: 2567-78.

Musicki B, Ross AE, Champion HC, Burnett AL, Bivalacqua TJ. (2009). Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis. *J Androl* 30: 352-62.

Myers PR, Minor RL Jr, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161–3.

Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, Michel JB, Soubrier F. (1996). Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ Res* 79: 857–63.

Naruse I and Keino H. (1995). Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol* 47: 135-55.

Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS. (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 274: C236-44.

Noiri E, Hu Y, Bahou WF, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS. (1997). Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 1747-52.

Noiri E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou WF, Peunova N, Goligorsky MS. (1996). Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelia cells. *Am J Physiol* 270: C794-802.

Okayasu T, Tomizawa A, Suzuki K, Manaka K, Hattori Y. (2008). PPARalpha activators upregulate eNOS activity and inhibit cytokine-induced NF-kappaB activation through AMP-activated protein kinase activation. *Life Sci* 82: 884-91.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87: 315-424.

Palacios-Callender M, Hollis V, Mitchison M, Frakich N, Unitt D, Moncada S. (2007). Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: A possible explanation for hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18508–13.

Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131–9.

Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. (1998). Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273: 4220-6.

Parton RG and Simons K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 185-94.

Payne GW, Madri JA, Sessa WC, Segal SS. (2003). Abolition of arteriolar dilation but not constriction to histamine in cremaster muscle of eNOS^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H493–8.

Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276: 73–81.

Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C. (1999). The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology* 29: 1848-57.

Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152: 1057-70.

Pollock JS, Klinghofer V, Forstermann U, Murad F. (1992). Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett* 309:402-4.

Prabhakar P, Cheng V, Michel T. (2000). A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric-oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 275: 19416-21.

Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273: 27383-88.

Pratt WB. (1997). The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 297-326.

Pritchard JrKA, AckermanAW, Gross ER, SteppDW, ShiY, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. (2001). Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276: 17621-4.

Pyriochou A, Vassilakopoulos T, Zhou Z, Papapetropoulos A. (2007). cGMP-dependent and -independent angiogenesis-related properties of nitric oxide. *Life Sci* 81: 1549-54.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-46.

Rapoport RM and Murad F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52: 352-7.

Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. (2004). S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U SA* 101: 2619-24.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou HJ, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276: 38121-38.

Resh MD. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451: 1-16.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13147-52.

Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE. (1998). In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273: 34724-9.

Robinson LJ, Busconi L, Michel T. (1995). Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270: 995-8.

Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307: 1746–52.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-82.

Sato S, Fujita N, Tsuruo T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10832-10837.

Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lowenstein CJ. (2002). Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res* 91: 806–13.

Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, Oess S, Tikkanen R, Müller-Esterl W, Icking A. (2006). Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol Biol Cell* 17: 3870-80.

Schleicher M, Brundin F, Gross S, Müller-Esterl W, Oess S. (2005). Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 25: 8251–8.

Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P. (1998). Dynammin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* 10: 504-12.

Sciorati C, Galvez BG, Brunelli S, Tagliafico E, Ferrari S, Cossu G, Clementi E. (2006). Ex vivo treatment with nitric oxide increases mesoangioblast therapeutic efficacy in muscular dystrophy. *J Cell Sci* 119: 5114-23.

Searles CD. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C803-16.

Sellke FW, Quillen JE, Brooks LA, Harrison DG. (1990). Endothelial modulation of the coronary vasculature in vessels perfused via mature collaterals. *Circulation* 81: 1938-47.

Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, Hamik A, Atkins GB, Das H, Banerjee P, Kumar A, Jain MK. (2005). Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 112: 720-6.

Sessa WC, García-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM. (1995). The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 270: 17641-4.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74: 349-53.

Sessa WC. (2004). eNOS at a glance. *J Cell Science* 117: 2427-2429.

Shah V, Wiest R, García-Cardena G, Cadelina G, Groszmann RJ and Sessa WC. (1999). Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol* 277: G463-8.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271: 6518-22.

Sheseley EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13176–81.

Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12: 112-20.

Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* 127: 1185-97.

Snyder SH. 1993. Janus faces of nitric oxide. *Nature* 364: 577.

Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC. (1999). Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem* 274: 22524-31.

Sowa G, Pypaert M, Sessa WC. (2001). Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14072-7.

Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M., Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. (1998). Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase *FEBS Letters* 438: 161-16.

Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR and Block ER. (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1542-9.

Su Y, Zharikov SI, Block ER. (2002). Microtubule-active agents modify nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1183-9.

Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. (1999). Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 85: 288–93.

Sun J and Liao JK. (2004). Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2238-44.

Sun J and Liao JK. (2002). Functional interaction of endothelial nitric oxide synthase with a voltage dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13108-13.

Takahashi S and Mendelsohn ME. (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278: 30821-7.

Taylor CT and Moncada S. (2010). Nitric Oxide, Cytochrome C Oxidase, and the Cellular Response to Hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:643-7.

Thomas DD, Espey MG, Ridnour LA, Hofseth LJ, Mancardi D, Harris CC, Wink DA. (2004). Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci US A* 101: 8894-9.

Thompson CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-62.

Toda N, Nakanishi-Toda M. (2007). Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 26:205-38.

Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. (1996). Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10417-22.

Tran QK, Leonard J, Black DJ, Nadeau OW, Boulatnikov IG, Persechini A. (2009). Effects of combined phosphorylation at Ser-617 and Ser-1179 in endothelial nitric-oxide synthase on EC₅₀(Ca²⁺)

values for calmodulin binding and enzyme activation. *J Biol Chem* 284: 11892-9.

Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172: 269–79.

Turko IV and Murad F. (2002). Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 54: 619–34.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C1371–8.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220–5.

Walsh DA. (2007). Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Adv Clin Chem* 44: 187.

Wang H, Wang AX, Liu Z, Chai W, Barrett EJ. (2009). The trafficking/interaction of eNOS and caveolin-1 induced by insulin modulates endothelial nitric oxide production. *Mol Endocrinol* 23: 1613-23.

Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG, Searles CD. (2005). Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res* 96: 1161–8.

Wever RM F, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. (1997). Tetrahydrobiopterin Regulates Superoxide and Nitric Oxide Generation by Recombinant Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Biochemand Biophys Res Commun* 237: 340-4.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.

Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 273: 25804–8.

Xie QW, Leung M, Fuortes M, Sassa S, Nathan C. (1996). Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4891–6.

Ying L, Hofseth LJ. (2007). An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res* 67:1407-10.

Yoon HJ, Cho SW, Ahn BW, Yang SY. (2010). Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 131: 119-23.

Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. (2004). Nitric oxide induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem* 89: 812-21.

Zhang X, Jin Y, Xia L, Tao X, Bai M, Zhang J. (2009). Hsp90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion in the lungs of rats with acute pulmonary thromboembolism. *Int Immunopharmacol* 9: 43-8.

Zhang Q, Church JE, Jagnandan D, Catravas JD, Sessa WC, Fulton D. (2006). Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1015-21.

Zharikov SI, Sigova AA, Chen S, Bubb MR, Block ER. (2001). Cytoskeletal regulation of the L-arginine/NO pathway in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L465-73.

Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, Zhou XJ. (2008). Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *Am J Hypertens* 21: 28-34.

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99: 2625-34.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. (1994). Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036-44.

Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S. (2002). NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17167-72.