

Gruppo di Biologia Redox e Oncologia Molecolare

Contesto Scientifico e Linee di Ricerca

Il gruppo di *Biologia Redox e Oncologia Molecolare* diretto dal Prof. Giuseppe FILOMENI, studia come lo stress ossidativo e nitrosativo regoli la funzione delle proteine e influenzi la fisiologia cellulare attraverso modificazioni post-traduzionali (PTMs) redox, ovvero quelle che interessano i residui di cisteina. Tali modificazioni comprendono eventi di ossidazione indotta da specie chimiche reattive come il perossido di idrogeno (H_2O_2) o ossido nitrico (NO), inducendo formazione di ponti disolfuro o S-nitrosilazione. Le PTMs redox agiscono come meccanismi di controllo reversibili dell'attività proteica (Fig. 1), della segnalazione intracellulare, del metabolismo e dell'espressione genica .

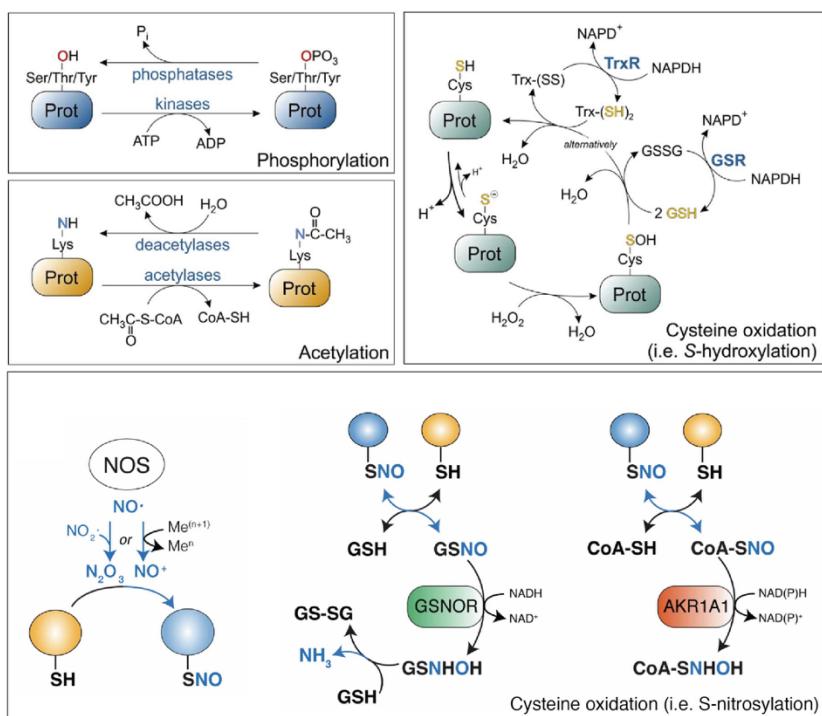


FIGURE 1. REDOX PTMs

Come tutte le modificazioni post-traduzionali (PTMs), ad es. acetilazione e fosforilazione, anche le PTMs redox a carico delle cisteine sono reversibili. Nel caso in cui la modificaione sia un'idrossilazione (S-OH)—spesso propedeutica alla formazione di un poste disolfuro—il sistema del glutatione/tioredoessina (GSH/Trx) ripristina lo stato ridotto delle cisteine. Nel caso in cui la cisteina sia nitrosilata attraverso la reazione che questa instaura con l'ossido nitrico (NO) prodotto dalle NO sintasi (NOS), la reversibilità è assicurata dall'azione degli enzimi denitrosilanti GSNOR (detto anche ADH5) o SCoR (detto anche AKR1A1). Questi non agiscono direttamente sulle proteine nitrosilate ma su nitrosotiolli a basso peso

molecolare come il glutatione nitrosilato (GSNO) o il coenzima A nitrosilato (CoA-SNO), a loro volta in equilibrio chimico con le proteine-SNO. Regolando i livelli di GSNO e SNO-CoA, ADH5/GSNOR e AKR1A1/SCoR controllano i livelli di nitrosilazione proteica e, di conseguenza, tutti i processi fisiologici in cui queste sono coinvolte.

Questi processi giocano un ruolo chiave nell'omeostasi cellulare. Per questo motivo, la loro alterazione è implicata nello sviluppo di patologie complesse, in particolare cancro e invecchiamento, che condividono numerosi tratti molecolari comuni: squilibrio redox, instabilità mitocondriale, disregolazione metabolica e alterazioni epigenetiche.

L'attività del gruppo si articola quindi attorno allo studio dei meccanismi redox che influenzano la **dynamica mitocondriale** (Fig. 2), la **plasticità metabolica**, la **risposta adattativa a condizioni di stress** (Fig. 4) e l'**integrazione tra segnali redox e processi oncogenici** (Fig. 5) in modelli di invecchiamento e trasformazione tumorale, utilizzando diversi modelli in vitro e in vivo di stress ossidativo e nitrosativo. In particolare, il gruppo del Prof. Filomeni, negli anni, ha generato diversi

modelli animali e cellulari mancanti, o sovra-esperimenti, gli enzimi deputati alla rimozione selettiva del gruppo NO dalle cisteine denominate **denitrosilasi** tra cui **ADH5/GSNOR** e **AKR1A1/SCoR**.

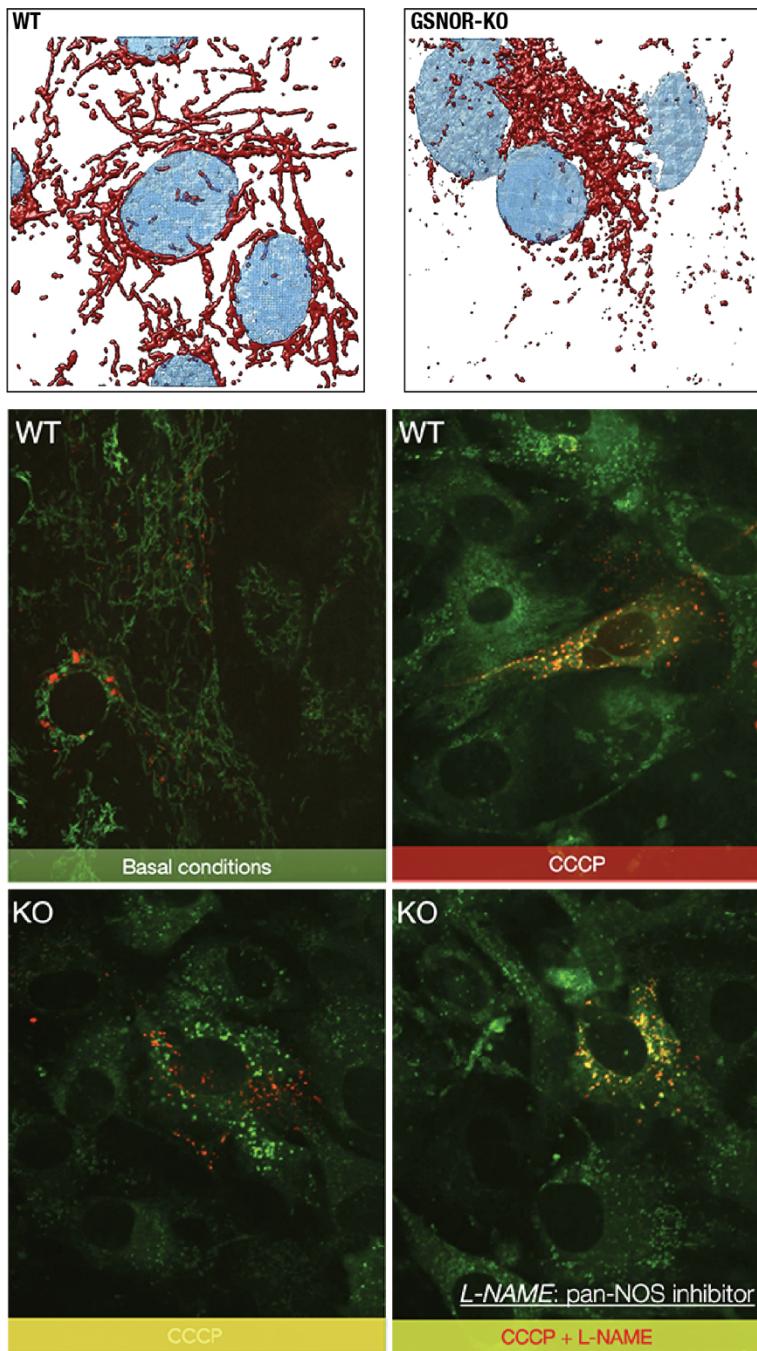


FIGURE 2. Rete mitocondriale e mitofagia in cellule WT o KO per la denitrosilasi GSNOR

Cellule derivanti da topi GSNOR-KO o rese KO attraverso la tecnica del *genome editing* CRISPR/Cas9 presentano una rete mitocondriale frammentata.

A differenza della controparte WT, in cui il danno mitocondriale (ad es. indotto dal CCCP) induce una rimozione selettiva dei mitocondri attraverso l'autofagia (mitofagia), le cellule GSNOR-KO hanno mitocondri frammentati e danneggiati (in verde) che non sono riconosciuti dagli autofagosomi (rossi). Soltanto dopo l'inibizione delle NO sintasi (NOS) che producono NO, il riconoscimento viene ristabilito e i mitocondri opportunamente rimossi (in giallo). Questo esperimento dimostra che la mancanza di GSNOR provoca una nitrosilazione aberrante delle proteine coinvolte nella frammentazione e targeting dei mitocondri danneggiati (Drp1 e Parkin) determinando un accumulo di mitocondri non funzionanti, deleteri per la corretta fisiologia cellulare. Questo fenomeno contribuisce alla senescenza cellulare e, se mantenuto nel tempo, la trasformazione neoplastica.

Approccio e Metodologie

La ricerca all'interno del gruppo si sviluppa attraverso un'integrazione di approcci sperimentali di tipo biochimico, molecolare, cellulare e traslazionale. Ovviamente, particolare enfasi è data allo studio delle modificazioni redox delle proteine, che viene effettuato attraverso tecniche specifiche e complementari tra cui:

- Il **biotin-switch assay** consente la rilevazione selettiva della S-nitrosilazione sulle proteine, grazie alla sostituzione del gruppo NO con una biotina (**Fig. 3**).

Biotin switch assay

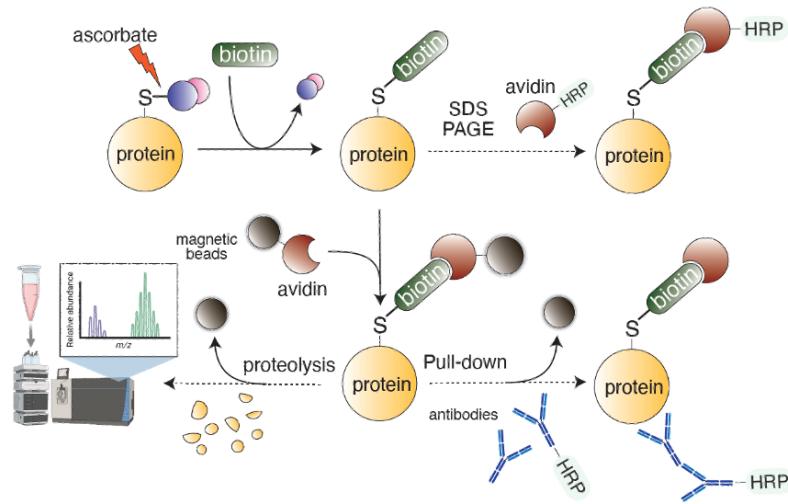


FIGURE 3. Biotin switch assay

Il *Biotin switch assay* è una tecnica usata per rivelare le proteine nitrosilate. Si basa sullo scambio di un gruppo NO con una biotina a livello della cisteina reattiva. Una volta generate, le proteine biotinilate possono essere analizzate in SDS-PAGE a seguito di legame con avidina per rivelare i livelli totali di proteine nitrosilate.

Alternativamente possono essere sottoposte a *pull down* per determinare l'identità di queste proteine, o proteolizzarle per rivelare i residui di cisteina modificati attraverso saggi di proteomica (nitroso-proteomica).

- Il **MAL-PEG assay** permette di mappare le modificazioni dei gruppi tiolici, distinguendo tra residui ridotti, ossidati e nitrosilati, grazie alla differenza di peso molecolare introdotta dal legame con polietilenglicole (**Fig. 4**).

MAL-PEG assay

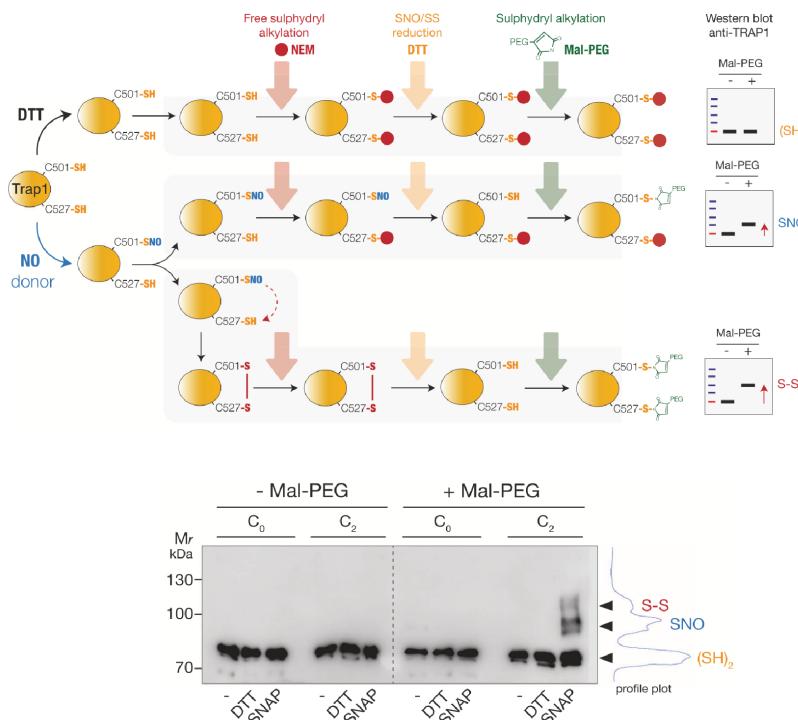


FIGURE 4. MAL-PEG assay

Similmente al Biotin switch assay, il *MAL-PEG assay* si basa sull'alchilazione delle cisteine libere con N-etilmaleimide (NEM), seguito da riduzione con DTT delle cisteine impegnate a ponte disolfuro (S-S) o nitrosilate (SNO). A questo punto la proteina viene fatta reagire con il MAL-PEG—una maleimide legata ad un gruppo polietilene-glicole (PEG) di 5 o 10 kDa che conferisce alla proteina la capacità di migrare su SDS-PAGE ad un peso apparente superiore. L'aggiunta di 1 o 2 gruppi MAL-PEG (rispettivamente identificativi di una modifica SNO o S-S) determina uno shift di peso molecolare della proteina di 5 o 10 kDa, e fornisce informazioni sulla modifica ossidativa a cui questa è sottoposta (vedi elettroforesi in basso).

- Queste metodologie vengono affiancate da:
- tecniche di **gene editing** (CRISPR/Cas9), **RNA interference**, trasfezione e mutagenesi sito-specifica;
- **analisi funzionali** su linee cellulari tumorali, modelli 3D (sferoidi, organoidi) e colture derivate da pazienti;
- esperimenti di **profilazione trascrittonica** (RNA-seq), **proteomica redox** (es. nitroso-proteomica) e **analisi di metabolomica**;
- modelli **in vivo** per la validazione preclinica in collaborazione con centri oncologici nazionali e internazionali.

Obiettivi Scientifici

Il gruppo mira a comprendere come lo squilibrio redox contribuisca all'instaurarsi e al mantenimento di un fenotipo tumorale aggressivo, resistente e metabolicamente adattabile. Parallelamente, si indagano i tratti condivisi tra **invecchiamento e cancerogenesi**, al fine di identificare meccanismi molecolari comuni e modulabili a fini terapeutici.

In sintesi, gli obiettivi principali sono:

- Identificare proteine chiave sensibili a modificazioni redox;
- Studiare gli effetti di queste modificazioni su metabolismo, espressione genica e rimodellamento della cromatina;
- Sviluppare strategie per la "modulazione farmacologica" delle PTMs redox in contesti oncologici e degenerativi.

Il gruppo

Il gruppo di Biologia Redox è un team dinamico, composto da giovani ricercatori e ricercatrici con background complementari e uniti da una forte amicizia, spirito di squadra e motivazione scientifica. Di seguito alcuni membri di ieri e di oggi (gli ultimi purtroppo ancora non ci sono..).

