



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN
NEUROBIOLOGIA

Sede amministrativa: Università di Catania
Sedi consorziate: Università di Roma “La Sapienza” e di Pavia
XXII CICLO

TESI DI DOTTORATO

Dott.ssa Eleonora Guagliano

**“ MODULAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULARE ALLO
STRESS OSSIDATIVO NELL’INVECCHIAMENTO E NELLE
PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE ”**

**“MODULATION OF CELLULAR STRESS RESPONSE IN AGING
AND NEURODEGENERATIVE DISEASES”**

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. ROBERTO AVOLA

TUTOR:

Chiar.mo Prof. VITTORIO CALABRESE

COTUTOR:

Chiar.mo Prof. CARLO MINETTI

ANNO ACCADEMICO 2009-10

INTRODUCTION

HEAT SHOCK PATHWAY ON CELLULAR STRESS TOLERANCE: ROLE OF VITAGENES

In the last decade, cell equilibrium between oxidant and antioxidant factors has received much attention by scientific world, particularly concerning to brain aging aspects and aetiopathogenetic mechanisms of neurodegenerative disorders (1). Emerging evidence suggested that reduced expression and/or activity of antioxidant proteins lead to a reduced efficiency on reparative and degradative processes which caused oxidative stress, accelerated aging and neurodegeneration (2). It is generally accepted that excessive free radicals production, high electrophilic and oxidative species, has been implicated in mechanisms leading to cell injury in various pathological states, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), metabolic dysfunction, infections, cancer and physiological aging (1). Current clinical and experimental evidence sustained that extended oxidative damage to *target* biomolecules, such as nucleic acids, proteins and lipids, elicited by oxygen and nitrogen free radicals overproduction, is the main cause of biochemical and physiopathogenetic alterations leading to aging and neurological diseases (3). Moreover, increasing experimental observations reported that aggregated and *misfolded* proteins, protofibrils deposition, ubiquitin-proteasome system dysfunction, excitotoxic insults associated to oxidative and/or nitrosative stress conditions, mitochondrial damage and altered axonal transport represented integrated events of neurodegenerative disorders (4-6). The idea of the pervasive nature of free radicals has been firmly entrenched in the minds of scientists ever since the group of *Britton Chance* developed the basic biochemical techniques to show that in the resting state 2% of all oxygen consumed by cells is converted into ROS rather than water (7). Intermediate reactive oxygen species are continuously produced during normal aerobic metabolism following electrons "leakage" or "short circuiting" from biological sources represented primarily by mitochondrial respiration chain and by xanthine oxidase content, aradonic metabolism and autoxidation of catecholamines (8). Within the cell, reactive oxygen species (ROS) are physiologically present at minimal concentration as by-products of aerobic metabolism as well as *second messengers* in many signal transduction *pathways* and, in normal conditions, there is a steady-state balance between pro-oxidants and antioxidants which is necessary to ensure optimal efficiency of antioxidant defenses (4-7). However, when the rate of free radical generation exceeds the capacity of antioxidant defences, oxidative stress ensues with consequential severe damage to DNA, proteins and lipids (5, 9). There is growing evidence that the continuous presence of a small stimulus such as low concentrations of ROS is in fact able to induce the expression of antioxidant enzymes and other

defence mechanisms. In this context, radicals may be considered to be beneficial since they act as signals to enhance defences rather than deleterious as they are when cells are exposed to high levels of ROS (10-11). Moreover, several conditions including protein, lipid or glucose oxidation disrupt redox homeostasis and lead to accumulation of *unfolded* or *misfolded* proteins in the aging brain. Alzheimer's, Parkinson's diseases or Friedreich ataxia are neurological diseases sharing, as a common denominator, production of abnormal proteins, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which contribute to the pathogenesis of these so called "*protein conformational diseases*" (12-13). In general, conformational diseases are conditions that arise from the dysfunctional aggregation of proteins in non-native conformations. This often is associated with multiple metabolic derangements that result in the excessive production of ROS and oxidative stress (12). These ROS set in motion a host of redox reactions which can result in unstable nitrogen and thiol species that contribute to additional redox stress which trigger neuroinflammation. Mammalian cells have developed remarkably efficient protective mechanisms against both acute and chronic toxicities of electrophiles and reactive oxygen species that are the major causes of chronic disease. The ability of a cell to counteract stressful conditions, also known as *cellular stress response*, requires the activation of pro-survival *pathways* as well as the production of molecules endowed with antioxidant and antiapoptotic activities, which is under control of protective genes called *vitagenes* (1). This phenomenon, which includes *heat shock response* (HSR), represents an ancient and highly conserved cytoprotective mechanism. To adapt to environmental changes and survive different types of injuries, eukaryotic cells have evolved *networks* of different responses that detect and control diverse forms of stress. Efficient functioning of maintenance and repair processes seem to be crucial for both survival and physical quality of life. This is accomplished by a complex *network* of the so-called longevity assurance processes, under control of several genes termed *vitagenes*. Maintaining or recovering the activity of *vitagenes* can decrease the occurrence of age-related diseases with resulting prolongation of a healthy life span (1, 14-16). *Chaperone*-buffered silent mutations may be activated during the aging process and lead to the phenotypic exposure of previously hidden features and contribute to the onset of polygenic diseases, such as age-related disorders, atherosclerosis and cancer. The term *vitagene* has appeared one time in the past literature, where was used in a different sense, equivalent to "*longevity assurance genes*," with a role in determining the evolutionary natural lifespan. Among these, *heat shock proteins* form a highly conserved system responsible for the preservation and repair of the correct protein conformation (12). Recent studies have shown that the *heat shock response* contributes to establishing a cytoprotective state in a wide variety of human diseases, including inflammation, cancer, aging and neurodegenerative disorders (17). In *eukaryotes*, typical examples are genes such as heme

oxygenase, thioredoxin and detoxificant enzymes (Mn-SOD, glutathione S-transferase, NADPH: quinone reductase), cytokine immunoreceptors and growth factors **(2, 12)**.

The *heat shock response* is one possible cellular stress response, where a set of *heat shock* proteins (Hsps) are induced playing important roles in cellular repair and protective mechanisms. *Heat shock proteins* and molecular *chaperones* have been known to protect cells against a wide variety of toxic conditions, including extreme temperatures, oxidative stress, virus infection and exposure to heavy metals or cytotoxic drugs **(18)**. HSR is regulated at the transcriptional, translational and post-translational levels by a family of *heat shock* transcription factors (HSFs) that are expressed and maintained in an inactive state under non-stress conditions **(19)**. Given the broad cytoprotective properties of the *heat shock response* there is now strong interest in discovering and developing pharmacological agents capable of inducing the *heat shock response* **(15, 18-20)**. The strong evidence that the *vitagene network* operates as a defense system in the brain during oxidative and nitrosative stress open new perspectives in the treatment of neurodegenerative disorders. Therefore, the nutritional manipulation of endogenous cellular defense mechanisms represents an innovative approach to therapeutic intervention in neurodegeneration and propose potential novel therapeutic strategies relying upon the simultaneous activation of cytoprotective genes of the cell life program and down-regulation of proinflammatory and pro-oxidative genes involved in programmed cell death. Although the term *vitagene* was first proposed to indicate speculatively the existence of genes as opposed to gerontogenes, the first evidence based notion identifying *vitagenes* with stress responsive genes such as HO-1, Hsps and TrxR have been provided by our group **(17-19)**. Among these genes, heme oxygenase-1 (HO-1), is receiving considerable attention because of its major role in counteracting both oxidative and nitrosative stress and protecting neurons against brain oxidative injury. Moreover, involvement of the heme oxygenase *pathway* in antidegenerative mechanisms, especially those operating in Alzheimer's disease, has been demonstrated **(21)**. The heme oxygenases have been recognized as dynamic sensors of cellular oxidative stress and modulators of redox homeostasis throughout the phylogenetic spectrum **(22)**. HO induction, which occurs together with the induction of other Hsp during various physiopathological conditions by generating the vasoactive molecule CO and the potent antioxidant BR, represents a protective system potentially active against brain oxidative injury **(23)**. HO-1 induction is one of the early events in the cell response to stress. Heme oxygenase-1 exerts protective role, by degrading the intracellular levels of prooxidant heme and by producing biliverdin, the precursor of bilirubin, this latter being an endogenous molecule with potent antioxidant and anti-nitrosative features **(24-25)**. Heme oxygenases are located within the endoplasmic reticulum where they act in association with NADPH cytochrome P450 reductase to oxidize heme to biliverdin, free ferrous iron and carbon

monoxide (CO). Biliverdin reductase further catabolizes biliverdin to the bile pigment, bilirubin, a linear tetrapyrrole which has been shown to effectively counteract nitrosative stress due to its ability to interact with NO and RNS (24-25). Mammalian cells express at least two isoforms of HO, an inducible isoform (HO-1) and a constitutive isoform (HO-2). A third protein, HO-3, determined to be a retrotransposition of the HO-2 gene (pseudogene) has been found unique to rats (26). HO-1 can be induced by several stimuli associated with oxidative and/or nitrosative stress, such as heme, A β , dopamine analogues, H₂O₂, hyperoxia, UV light, heavy metals, prostaglandins, NO, peroxynitrite, Th1 cytokines, oxidized lipid products and lipopolysaccharide, as well as certain growth factors (12, 18, 27). Although HO-1 and HO-2 catalyze the same reaction, they play different roles in protecting tissues against injury. A convincing hypothesis suggests that HO-1 induction is one of the earlier cellular response to tissue damage and is responsible for the rapid clearance of the intracellular pro-oxidant heme and its transformation into CO and biliverdin the latter being the precursor of the antioxidant bilirubin. On the contrary, constitutively expressed HO-2 is primarily involved in maintaining cell heme homeostasis and in the sensing of intracellular levels of gaseous compounds including NO and CO. HO-1 gene expression is regulated by a variety of factors such as pro-oxidant states or inflammation (28). The molecular mechanism that confers inducible expression of HO-1 in response to numerous and diverse conditions has remained elusive. One important clue has recently emerged from a detailed analysis of the transcriptional regulatory mechanisms controlling the mouse and human HO-1 genes. The induction of HO-1 is regulated principally by two upstream enhancers, E1 and E2. Both enhancer regions contain multiple stress (or antioxidant) responsive elements (StRE, also called ARE) that also conform to the sequence of the Maf recognition element (MARE) (18, 29) with a consensus sequence (GCnnnGTA) similar to that of other antioxidant enzymes (18). Although it is generally agreed that increased HO-1 expression is a common feature during oxidative stress, recent papers demonstrated that HO-1 can be repressed during oxidative stress conditions. The importance of HO-1 repression has been corroborated by the discovery of Bach1/Bach2 as heme-regulated transcription factors for HO-1 gene (30). Current hypothesis suggests that HO-1 repression is useful for the cell because (i) decreases the energy costs necessary for heme degradation, (ii) reduces the accumulation of CO and bilirubin which can become toxic if produced in excess and (iii) increases the intracellular content of heme necessary for the preservation of vital functions such as respiration (30). Delineation of the diverse roles of HO-1 in brain senescence, aging-related human neurodegenerative disorders and other CNS conditions has progressed substantially in these last years (18, 20). Whereas the acute induction of this enzyme in neural and other tissues is predominantly cytoprotective in nature, protracted or repeated up-regulation of the Hmox1 gene in astrocytes, oligodendroglia and possibly

neurons may perpetuate cellular dysfunction and demise in many chronic degenerative and neuroinflammatory conditions long after provocative stimuli have dissipated (18, 20, 28). Because of its strong antioxidant properties and wide distribution within the CNS, HO-1 has been proposed as a key enzyme in the prevention of brain damage (28, 31). Particularly interesting is the role played by HO-1 in Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder which involves a chronic inflammatory response associated with both oxidative brain injury and β -amyloid associated pathology. Significant increases in the levels of HO-1 have been observed in AD brains in association with neurofibrillary tangles and also HO-1 mRNA was found increased in AD neocortex and cerebral vessels (32). HO-1 increase was not only in association with *neurofibrillary tangles* but also colocalized with *senile plaques* and glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes in AD brains. It is plausible that the dramatic increase in HO-1 in AD may be a direct response to an increase in free heme concentrations, associated with neurodegeneration, and can be considered as an attempt of brain cells to convert the highly toxic heme into the antioxidants CO and BR (22-23). The protective role played by HO-1 and its products in AD prompted investigators to propose natural substances, which are able to increase HO-1 levels, as potential drugs for the treatment of AD. Emerging interest is now focusing on exogenous small molecules that are capable of activating these systems as a novel *target* to minimize deleterious consequences associated with free radical induced cell damage, such as during neurodegeneration and in cancer (8, 11-12, 15, 18, 20). In this light, several studies *in vitro* have been focused on polyphenolic compounds contained in some herbs and spices, e.g. curcumin. This complex array of interactions is in agreement with the well known ability of curcumin to serve not only as an antioxidant but also as anti-inflammatory and anticarcinogenic molecule (8, 11-12, 15, 18, 20). Curcumin is the active anti-oxidant principle in *Curcuma longa*, a colouring agent and food additive commonly used in Indian culinary preparations. It has chemopreventive properties, which are mainly due to its ability to arrest cell cycle and to induce apoptosis. Study *in vitro* indicated that this polyphenolic substance has the potential to inhibit lipid peroxidation and to effectively intercept and neutralize ROS and RNS (33). Extensive research within the past two decades has shown that curcumin mediates its anti-inflammatory effects through the downregulation of inflammatory transcription factors (such as NF- κ B), enzymes (such as cyclooxygenase 2 and 5 lipoxygenase) and cytokines (such as TNF, IL-1 and IL-6), as well as upregulation of cytoprotective *vitagenes*. Particularly interesting is the interaction of curcumin with the *vitagene* system. Curcumin has been shown to significantly increase HO-1 in brain cells (33). This latter effect on HO-1 can explain, at least in part, the anti-oxidant properties of curcumin, in particular keeping in mind that HO-1-derived BR has the ability to scavenge both ROS and RNS (15, 18, 20). All this corroborates the hypothesis that Hsps system activation is a common

pathway through which phenolic compounds can exert neuroprotective effects. Furthermore, other dietary antioxidants, such as carnitines and carnosine (AH), have recently been demonstrated *in vitro* to be neuroprotective through the activation of hormetic *pathways*, such as those including *vitagenes* (17, 31, 34). In recent years, the occurrence of AH and its analogues homocarnosine (gaminobutyryl-L-histidine) and anserine (β-alanyl-L-methyl-L-histidine) in the CNS and their age-related alterations suggested a therapeutic potential in neurodegenerative diseases (34-35). Carnosine has been shown to be neuroprotective because of its capacity to counteract both oxidative and nitrosative stress related to several pathologic conditions, including ischemia (36). In addition to the well-documented antioxidant, antiglycating, aldehyde-scavenging, and toxic metal ion-chelating properties of carnosine, its ability to influence the metabolism of altered polypeptides, whose accumulation characterizes the senescent phenotype, also should be considered (37). Furthermore, carnosine has been shown prevent β-amyloid aggregation and toxicity and this effect can be due to the known ability of this peptide to inhibit protein *misfolding* and avoid the formation of advanced glycation end-products (36, 38). Carnosine has been shown to counteract peroxynitrite-dependent protein alterations such as tyrosine nitration and to inhibit the NO-dependent activation of guanylate cyclase (36). Recent evidence demonstrated that carnosine prevents the up-regulation of iNos and the induction of both HO-1 and Hsp-70 following strong nitrosative conditions (37). A new conjugate of trehalose with carnosine has been synthesised as a system with antioxidant, antiglycating, chelating and antiaggregant activity (39). The resistance of the new conjugate to brain dipeptidase and its antioxidant activity have been demonstrated *in vitro*. A large body of evidences have indicated a relevant protective properties of carnosine and trehalose against many antioxidative stress conditions (39-42). Taken together, these findings allow us to propose the metabolic *pathway* leading to carnosine formation as a potential *target* for the prevention and/or treatment of neurodegenerative disorders. In addition, new carnosine, homocarnosine and anserine derivatives have been synthesized and characterized, showing chelating and antioxidant properties similar to those of the parent dipeptides. In addition, these new compounds survive to attack by carnosinases and should be explored for their ability to suppress age-related neurodegeneration where increased zinc and copper could play a role (34, 36). Hsps are evolutionarily conserved and present in all cellular compartments (1, 31). Some of the major *chaperones* (Hsc70, Hsp90, small Hsps) are present at high concentrations in non-stressed cells reaching 1-5% of total cellular protein, consistent with an important role for *chaperones* in cellular homeostasis. Besides their role during stress, *chaperones* have multiple roles under normal conditions. They promote the transport of macromolecules (e.g., proteins or RNA) and participate in almost every remodeling event involving larger protein complexes, including *signaling*,

transcription, cell division, migration, and differentiation. Hsp70, the 70 kDa family of *stress proteins* is one of the most extensively studied. Included in this family are Hsc70 (*heat shock cognate*, the constitutive form), Hsp72 (the inducible form, also referred to as Hsp72) and GRP-75 (a constitutively expressed glucose-regulated protein found in the endoplasmic reticulum) (18, 31). Hsp70s function in co- and post-translational *folding* and the quality control of *misfolded* proteins. More specifically, Hsp70s participate in *folding* and assembly of newly synthesized proteins into macromolecular complexes; aggregation prevention; dissolution and *refolding* of aggregated proteins; as well as protein degradation (1, 18, 31). Recent studies indicate that the *heat shock response* declines in aging cells and becomes weaker as organisms live beyond the mature adult stage. Hsp70 has been extensively implicated in the pathogenesis of *misfolding disease* (43). Numerous studies indicate that Hsp70 and components of the ubiquitin-proteasome system associate with inclusion bodies/plaques characteristic of *misfolding* diseases. The availability of *transgenic* animals and gene transfer allowing over-expression of the gene encoding for Hsp70, has revealed that overproduction of this protein leads to protection in several different models of nervous system pathology (44). Increased expression of Hsp70 has been reported to be associated with a decrease in apoptotic cell death, an increase in the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2, a suppression of microglial/monocyte activation and a reduction in matrix metalloproteinases. Following focal cerebral ischemia, Hsp70 mRNA is synthesized in most ischemic cells except in areas of very low blood flow, due to scarce ATP levels. It has been suggested that this neuronal expression of Hsp70 outside an infarct can be used to define the ischemic penumbras, which means the zone of protein denaturation in the ischemic areas (45). Finally, Hsp90 are among the most abundant proteins of eukaryotic cells, comprising 1-2% of total proteins under nonstress conditions (18, 31). Evolutionarily conserved among species, they are essential for cell survival. Hsp90 are ATP-dependent chaperones. Hsp90 interacts with and stabilizes a number of kinases, such as key members of malignant transformation, ErbB2, Src, Met tyrosine kinases, Raf, Akt, and cyclin-dependent serine kinases (46). In addition, Hsp90 are necessary for the maturation of several transcription factors, such as the nuclear hormone receptors and the hypoxia-inducible factor-1 (47). Hsp90 is an emerging therapeutic *target* of interest for the treatment of cancer. It is responsible for modulating *cellular response* to stress by maintaining the function of numerous *signaling* proteins-known as “*client proteins*” that are associated with cancer cell survival and proliferation. Hsp90 exerts its *chaperone* activity together with a number of *cochaperones*, playing an important role in the *folding* of at least 200 specific proteins of various *signaling pathways* and in the *refolding* of denatured proteins after stress (31).

Recent evidence also suggests that nitric oxide may directly or indirectly be involved in neuronal death in AD and other neurodegenerative disorders. Nitric oxide plays multiple roles in the nervous system (18, 48). In addition to regulating proliferation, survival and differentiation of neurons, NO is also involved in synaptic activity, neural plasticity and memory function. NO exerts long-lasting effects through regulation of transcription factors and gene thus modulating cell differentiation and survival processes in the brain. *Signalling* by NO is also mediated by reactive nitrogen species through targeted modifications of critical cysteine residues in proteins, including *S*-nitrosylation and *S*-oxidation, as well as by lipid nitration (49). NO is involved neuroinflammation and neurodegeneration, such as in AD, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, multiple sclerosis, Friedreich's ataxia and Huntington's disease (18, 50). NO synthesis is catalyzed by the nitric oxide synthase (NOS) family of enzymes, present in three well characterised isoforms (a) neuronal NOS (nNOS, type I) (b) endothelial NOS (eNOS; type III) and (c) inducible NOS (iNOS, type II). The discovery of the role of NO as a *messenger* molecule has revolutionised the concept of neuronal communication in the CNS. NO is a gas freely permeable to the plasma membrane. Thus, NO does not need a biological receptor to influence the intracellular communication or *signaling* transduction mechanisms (51). Nitric oxide when produced in small quantities can regulate cerebral blood flow and local brain metabolism (16) neurotransmitter release and gene expression and play a key role in morphogenesis and synaptic plasticity (52). It is also generally accepted that NO is a major component in *signaling* transduction *pathways* controlling smooth muscle tone, platelet aggregation, host response to infection and a wide array of other physiological and pathophysiological processes (18, 50). Under conditions of excessive formation, NO is emerging as an important mediator of neurotoxicity in a variety of disorders of the nervous system (50, 53). A large body of evidence shows cytoprotection by NO in various models of cellular toxicity and death: i) direct scavenging of superoxide, as well as indirect action on the release of iron from ferritin stores through formation of iron-nitrosyl (54); ii) interaction of NO with cysteine residues on the NMDA receptor and inhibition of calcium influx (55); iii) signal for the induction of cytoprotective proteins, such as *heat shock proteins* (16, 18, 31, 51). Current opinion holds that the intracellular redox state is the critical factor determining whether in brain cells NO is toxic or protective (48). The mechanistic involvement of NO as pro-inflammatory or anti-inflammatory agent are dictated by the complexity of NO chemistry when applied to biological systems (56). As described in complete mechanistic details by Stamler, the reactivity of the NO depends on the oxidation state of the nitrogen atom, which makes this molecule prone to acquire different redox-active forms (56). Central to the biochemistry of NO is the reaction with sulphhydryl moieties to form *S*-nitrosyl derivatives or RSNO, a process termed *S*-nitrosation. Conceivably, RSNO, such as

S-nitroso-glutathione or nitroso-cysteine represent a chemical process for storage, stabilization and preservation of bioavailable NO *in vivo* (57). The intriguing aspect of the parallels between the effects mediated by increased RNS and ROS is the ability of cells to respond to these two types of stress, depending on the severity of the nitrosative/oxidative insult, this response may result in adaptation and resistance to toxicity (18, 51, 58). The heme oxygenases have been recognized as dynamic sensors of cellular oxidative/nitrosative stress and modulators of redox homeostasis. In the last 20 years, many research papers have demonstrated that bilirubin is an endogenous cytoprotective molecule and effectively counteracts nitrosative/oxidative stress due to its ability to interact with H₂O₂, NO and RNS (16, 36). Conceptually, the perception that HO-1 plays a key role in response to oxidative damage is paralleled by evidence showing high expression of HO-1 in a variety of cell systems challenged with nitric oxide (NO) or NO-derivatives, thus revealing a potential biological function for HO-1 against nitrosative stress (19). Oxidative/nitrosative stress in brain is emerging as a potential causal factor in aging and age-related neurodegenerative disorders (59-60). A large body of evidence shows that induction of endogenous antioxidative proteins seems to be a reasonable strategy for delaying the progression of cell injury. Upregulation of heme oxygenase-1 (HO-1) seems to attenuate the cell apoptosis induced by peroxynitrite or 3-morpholinopyridone hydrochloride (SIN-1) in primary cultured hippocampal neurons (61). Particularly, SIN-1 has been revealed as an effective inducer, like potential nitric oxide donor, of *heat shock system* in many model study of diseases (62). Furthermore, recent experimental data from our laboratory demonstrated that glial rat cell treatment with cytochine, such as LPS and INF- γ , increased significantly iNOS protein expression and nitrite+nitrate levels associated to HO-1 upregulation, suggesting a crucial role for NO redox *signaling* in the cytoprotective *vitagene system* induction (12, 16, 19, 22).

THIOREDOXIN SYSTEM (TRXr/TRX)

The thioredoxin (Trx) system (Trx protein and Trx reductase), has received a considerable attention in the last years, as a *stress responsive gene* (63) (Fig 1A). Trx is a ubiquitous thiol oxidoreductase system that regulates cellular redox balance and constitute a family of proteins all of which have a conserved catalytic site (Cys-Gly-Pro-Cys) which undergoes reversible oxidation of the cysteine pair while reducing disulfide bridges of various proteins (63-64). Originally identified in *Escherichia coli*, in 1964, as a hydrogen donor for ribonucleotide reductase required for DNA synthesis, Trx plays an essential role in cell function by limiting oxidative stress directly via antioxidant effects and indirectly by protein-protein interactions (65). Increased experimental

evidence demonstrates that, in mammalian, cellular redox regulation of many processes is provided by an interaction between the Trx and GSH systems (66). In fact, Trx and GSH systems are involved in a variety of redox-dependent *pathways* such as supplying reducing equivalents for ribonucleotide reductase, the first step in DNA biosynthesis and peptide methionine sulfoxide reductase, an enzyme involved in antioxidant defenses and regulation of the cellular redox state (63). Together, they form a powerful system controlling redox regulation of gene expression, *signal* transduction, cell proliferation, protection against oxidative stress, anti-apoptotic functions, growth factor and co-cytokine effects, as well as regulation of the redox state of the extracellular environment (67). Oxidative stress causes damage to multiple cellular components such as DNA, proteins, and lipids, and is implicated in various human diseases including cancer, neurodegeneration, inflammatory diseases, and aging. In response to oxidative attack, cells have developed an antioxidant defense system to maintain cellular redox homeostasis and to protect cells from damage. The thiol-containing small molecules (e.g. glutathione), reactive oxygen species-inactivating enzymes (e.g. glutathione peroxidase) and phase 2 detoxifying enzymes (e.g. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and glutathione-S-transferases) are members of this antioxidant system (68). Glutathione (GSH) is the most abundant antioxidant in a cellular system. Present in mM levels in most cells, GSH is a first line of defense in preventing the deleterious effects of oxidative stress. Elevation of glutathione (GSH) has been recognized as an important method for modulating levels of reactive oxygen species (ROS). Because GSH levels decrease with age, increasing the amount of GSH in the cell could prove to be an effective way to prevent oxidative stress associated with age-related neurodegenerative disorders (69-70). Moreover, GSH levels check storage and transport processes of the cysteine aminoacid, modulate DNA and proteins biosynthesis, regulate cellular cycle and differentiation, gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes, detoxification processes through conjugation of electrophiles and metals (71). Since ROS have defined roles in cell *signaling* events as well as in human disease pathologies, an imbalance in expression of GSH and associated enzymes has been implicated in a variety of circumstances. Cause and effect links between GSH metabolism and diseases such as cancer, neurodegenerative diseases, cystic fibrosis, HIV, alcoholism, xenobiotics toxicity and aging have been shown. Therefore, maintenance of adequate intracellular GSH levels is of relevant importance for the modulation and progression of various pathogenetic conditions (72-73). GSH is thought to be largely responsible for maintaining a low redox potential and free thiol levels inside cells and organelles due to its high intracellular concentration (1-10 mM). The Trx system, rather may play a critical role in the redox regulation of protein thiols involved in *signal* transduction and gene regulation (63, 74). Thioredoxin, a ubiquitous redox protein, is an essential cofactor electron

donor for ribonucleotide reductase, but also has many other cellular functions, including regulation of transcription factors, apoptosis, and antioxidant activity and can act exogenously as a redox active growth factor. The finding that Trx can be regulated by glutathionylation indicates the existence of *crossstalk* between the glutathione/glutaredoxin system and the Trx system through which Trx activity can be influenced by the GSH/GSSG ratio, an indicator of the redox state of the cell (75). The anti-oxidative effect of Trx is mediated by the dithiol-disulfide exchange in the active site. Trx 1 is able to interact with certain molecules, one of which is thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)/Vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1)/thioredoxin interacting protein (TXNIP). TBP-2 was originally identified as a negative regulator of Trx 1 and acts as a cell growth suppressor and a regulator in lipid/glucose metabolism (76). Therefore, thioredoxin is a key molecule in redox signaling. Redox regulation by thioredoxin is deeply involved in the cell proliferation and differentiation, in the neoplastic transformation, in the activation of transcriptional factors for the expression of *cellular responsive genes* against oxidative stresses and in the signal transduction of oxidative stress-induced apoptosis. It also been discuss the possibility of the TRX system serving as an index marker for cellular proliferation and senescence (34, 77). Trx, which behaves as a soluble protein after disruption of cells, exists as one of the cytoplasmic proteins (Trx-1) and a mitochondrial (Trx-2) isoform (64, 78). Molecular studies demonstrated that both *isoforms* preserve and promote cell survival against oxidative damage (79). Genetic mutation leading Trx gene ablation bring to lethal phenotype genesis (80). Trx, first identified as ATL-derived factor (ADF) or as an IL-2 receptor/Tac inducer homologous produced by EBV transformed cell (81), itself is kept in a reduced form by TrxR and NADPH, collectively known as the Trx system (82). Trx reductase belongs to the flavoprotein family of pyridine nucleotide disulfide oxydoreductases (83). It is homodimeric protein in which each monomer includes two prosthetic flavin adenine dinucleotide (FAD) groups and a NADPH binding site. All the TrxR *isoforms* contain a redox center consisting of two cysteines adjacent to the flavin ring of FAD in the N-terminal part of the protein. In contrast to the *prokaryotic yeast* and *Drosophila* TrxR, which do not contain selenium, the mammalian TrxR isoenzymes carry a second redox-active center formed by a cysteine-selenocysteine (Cys-Secys) located in the C-terminal part of the protein (63-64). These two redox centers are both essential for the catalytic activity of mammalian TrxR toward reduction of oxidized Trx, and various antioxidant molecules such as lipoic acid, ascorbic acid and ubiquinol (83). In addition, mammalian TrxR enzymes have the capacity to reduce lipid hydroperoxides and peroxyinitrite in the presence of selenocysteine protein complex (Secys) (84-85). Incorporated into proteins as biologically active selenocystein, Se is an essential element required for the enzymatic activity and function of 25-30 selenoproteins, which include key antioxidant enzyme isoforms of TrxR and GPx

(67). A growing number of studies report a striking association between Trx-1 up-regulation in the CNS and neuron survival following various injuries resulting in oxidative stress (86-87). Trx is one of the prominent *stress-inducible* protein (78). The promoter of the Trx gene contains a series of *stress-responsive* elements, various transcription factor binding sites, such as SP1, GCF and WT-ZFP conferring constitutive expression, inducible expression elements such as AP-1, AP-2, NF-kB, Oct-1, PEA-3, Myb and the antioxidant-responsive element (ARE) (88). ARE mediated Trx-1 induction involves the transcription factor Nfr2. Moreover, it has been reported that Trx is constitutively present as a surface-associated sulfhydryl protein in plasma membrane of a wide range of cells (64). Many physicochemical stimuli including UV irradiation and hydrogen peroxide have been shown to induce Trx expression and secretion, as a redox sensitive molecule with cytokine-like and chemokine-like activities to prevent cell injury against oxidative stress (63-64). In addition to UV irradiation, treatment of cell culture with PMA, H₂O₂, hypoxia, the cancer drug cisplatin and hemin has been reported to cause the translocation of Trx from the cytoplasm to the nucleus, where it regulates the redox-activation and DNA binding activity of critical transcription factors, such as the AP-1 family members, NF-kB, Jun, Fos, p53, CREB, PEBP2/CBF, Myb, all involved in fundamental processes, such as gene expression, cell growth and apoptosis (63-64). Plasma levels of Trx in normal individuals vary between 10 and 80 ng/ml; level is elevated in certain human diseases including HIV infection and cancer (63). Of note, several studies reported increased Trx-1 expression in many human primary cancers and tumor cell lines, including astrocytomas. Elevated Trx levels may contribute to increased cancer cell proliferation and resistance to chemotherapy by several mechanisms, including stimulation of DNA synthesis, activation of redox-modulated transcription factors that regulate cell growth and inhibition of apoptosis (78, 89). Recent work suggests that Trx-1 play a key role in NGF *signaling* pathways (90). NGF, a neurotrophic factor regulating development, maintenance and function of the CNS, has been shown to activate Trx-1 expression via cyclic AMP (cAMP)-response elements (CREs) present in the Trx-1 gene promoter, and also to induce nuclear translocation of Trx1 (90). Recent data suggest that, beyond its ability to regulate the function of proteins through thiol-disulfide exchange reactions, Trx may also have beneficial effects during oxidative stress by transcriptionally upregulating HO-1, with important cytoprotective pleiotropic effects deriving from heme degradation, biliverdin and bilirubin formation, as well as carbon monoxide generation (91). Besides the role as a source of reducing equivalents, Trx by itself acts as antioxidant or ROS *scavenger*. Thioredoxin (TRX) is a small protein having strong antioxiradical quenching capabilities and other multiple functions depending on the cellular redox state. In fact, Trx eliminates singlet oxygen, hydroxyl radical and hydrogen peroxide (92). Another family of proteins

acting in conjunction with Trx is the peroxide *scavenger* Peroxiredoxin (Prx). The Prxs, also called thioredoxin peroxidases, are a relatively newly discovered family of antioxidant enzymes, most of which use the reducing activity of Trx, or other electron donors, to catalyze the reduction of peroxides, including H₂O₂ and alkyl peroxides (93). As for cytosolic Trx (Trx-1), the induction of Prx-1 appears to involve the transcription factor Nrf2 (87). A number of studies have shown that several Prx isoforms can be induced in brain in response to various insults, which has suggested neuroprotective function(s) for these proteins in the CNS (94). Recent studies have revealed aberrant *patterns* of Prx expression in the CNS of patients affected by neurodegenerative disorders (94). A second, slightly larger Trx *isoform* (Trx-2), is also present in mammalian cells, where exhibits characteristics consistent with a mitochondrial translocation *signal*, as confirmed by *Western blotting*. Trx-2 inactivation studies in DT-40 chicken cells suggest that this mitochondrial Trx isoenzyme is essential for cell survival. The homozygous disruption of Trx-2 generates a lethal embryonic phenotype in mice (80). Mitochondrial *isoform*, Trx2, is abundant and widely distributed in rat brain. Brain regions showing highest expression of Trx-2 at the RNA and protein levels include the olfactory bulb, frontal cortex, some hypothalamic and thalamic nuclei, cerebellum and the brainstem nuclei (95). The expression *pattern* of Trx2 appears to be associated with brain regions producing high levels of ROS (95).

ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder with cognitive and memory decline, speech loss, personality changes due to both cell and synapse loss (96). It is characterized pathologically by deposition of amyloid β -peptide (A β) in *senile (neuritic) plaques* and the presence of *neurofibrillary tangles*. Gross examination of the brain in AD shows a variable degree of cortical atrophy, with narrowed gyri and widened sulci most apparent in the frontal, parietal and temporal lobes. Microscopically, the features include *neurofibrillary tangles* (NFTs) characterized by phosphorylated protein *tau* deposition, *neurite (senile) plaques*, the central core of which is amyloid- β peptide, derived from the transmembrane amyloid precursor protein (APP), amyloid angiopathy, granulovacuolar degeneration, and Hirano bodies (1, 18, 97). Importantly, all of these changes are present in the brains of non-demented older individuals but to a much lesser extent. The finding that choline acetyl transferase is decreased by 40-90% in the cerebral cortex and hippocampus of patients with AD has led to the hypothesis that AD is consequence of a *deficit* in the cholinergic system (98). Increasing evidence indicates that factors such as oxidative stress and disturbed protein handling interact and contribute to the pathogenesis of AD (99-101). AD brain has

been reported to be under oxidative stress that may play an important role in the pathogenesis and progression of AD. Several lines of evidence now support a fundamental role for free radical-mediated event, chronic inflammatory response and apoptosis in the pathogenesis of the disease, as documented by increased DNA and protein oxidation levels and lipids peroxide content (100-102). Alzheimer's disease (AD) affects more than 2 million Americans and is the major cause of admission to nursing homes. AD, which rarely occurs before the age of 50 years, usually becomes clinically apparent as subtly impaired cognitive function or a disturbance of affect (103). Amyloid- β peptide (1-42) has been shown to induce protein oxidation in both *in vitro* and *in vivo* studies. As a result, amyloid- β -peptide (1-42) has been proposed to play a central role in the pathogenesis of AD (104-105). Although the specific mechanism of neurotoxicity induced by amyloid- β peptide (1-42) remains unknown, the chemistry of the single methionine residue at position 35 in the amyloid- β peptide (1-42) has been proposed as one of the mechanisms associated with neurotoxicity (96, 106). Oxidative stress is thus emerging as a critical factor in AD. We recently demonstrated that brain from patients with mild cognitive impairment (MCI) demonstrated increased protein oxidation and lipid peroxidation relative to aged-matched control brain (1, 18, 36, 96, 107-108). Proteomic analysis showed high levels of some oxidative proteins, including ENO1, GLUL, PKM2, PIN1 in hippocampus area of patients with mild cognitive impairment (MCI) relative to aged-matched control brain (108). It has been established that these alteration of specific protein *target* contribute to cognitive *deficit* characterized MCI patients brain through alteration of cell processes, including bioenergetic metabolism, mitogenesis/proliferation and neuroplasticity (107-108). Because many researchers consider MCI to be the transition zone between normal cognition and the dementia of early AD, these findings suggest that oxidative stress is fundamental to the progression of AD and not simply a consequence of AD. Therefore, it is imperative to develop *biomarkers* of oxidative stress in easily accessible tissue in living individuals to learn more about AD, to monitor drug efficacy, and to follow disease progression. Recent evidence also suggests that nitric oxide may directly or indirectly be involved in neuronal death in AD and other neurodegenerative disorders (5, 18, 36, 96, 50-51). Neurotoxic effects of NO might be mediated by oxidative damage as well as by the activation of intracellular *signaling* cascades. In particular, peroxynitrite, generated by the reaction of nitric oxide (NO) with superoxide at sites of plaques, is a strong oxidant capable of inducing neuronal cell damage. Strong evidence suggests that both p21ras and p21ras-dependent MAP-kinase *pathways* are strongly induced in AD, and an aberrant expression of p21 is highly colocalized with an aberrant expression of NOS in this condition (109). Experimental data indicated that amyloid- β peptide induced iNOS expression in a model of study represented by a hybrid cell line of substantia nigra/neuroblastoma (110). *Postmortem* analysis of AD brain showed high

nitrotyrosine immunoreactivity, a particular *biomarker* index of tyrosine residues nitration processes of *target* proteins mediated by peroxynitrite agent (ONOO⁻) (1, 18, 36, 96). Although NO metabolism is activated in Alzheimer's disease, analysis of nitrite+nitrate levels (stable end-products derived from peroxynitrite degradation) in the cerebrospinal liquid (CSF) of AD patients showed comparable values to those of healthy individuals (111). Increasing experimental observations reported oxidative stress as crucial pathogenetic factor for AD onset and progression. Amyloid β -peptide (A β) deposition has been demonstrated to be toxic toward neuronal culture through free radicals production (50-51, 96). A large body of biochemical pathogenetic events is correlated to Alzheimer's disease, including microglia activation and proinflammatory cytokine-mediated release associated to iNOS activation and peroxynitrite overproduction (50-51, 96), neuronal cytoskeletal abnormalities with iron accumulation, selective inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV by amyloid β -peptide (A β) deposition and consequently energetic depletion associated to increased free radicals formation (50-51, 96, 112). AD brain is undergone to various metabolic disturbances and injuries, including the presence of *misfolding* and aggregating proteins, classically associated to "*cellular stress response*" characterized by stress-induced protein belonged to *pathway heat shock* (1-2, 5, 8, 12, 17-18, 36). Both A β oligomers and phosphorylated *tau* are toxic to neurons and trigger a variety of protective mechanisms, such as induced *chaperones*, which may prevent more toxic conformational changes of the protein and ubiquitination, clearing *misfolded* proteins to the proteasome and segregation of *tau* aggregates from the cellular machinery and recruitment of *chaperone* pairs, including Hsp70 and Hsp27, endowed with antiapoptotic properties (113). Binding of phosphorylated *tau* to Hsp70 implies that the complex may be a substrate for the E3 ligase carboxyl terminus of *heat shock cognate* (Hsc)70-interacting protein (CHIP) (114). CHIP's is a ubiquitin E3 ligase that can collaborate with molecular *chaperones* to facilitate protein *folding* and prevent protein aggregation. Expression of the human A β peptide in *transgenic Caenorhabditis elegans* can lead to the formation of intracellular immunoreactive deposits as well as the formation of intracellular amyloid (115). Mass spectrometry analysis of proteins that specifically coimmunoprecipitate with A β has identified *chaperone* proteins, such as Hsp70 and alpha B-crystallin-related small Hsp (Hsp16). These results suggest that *chaperone* function can play a role in modulating intracellular A β metabolism and toxicity (116). Recently, the involvement of HO-1 in the antidegenerative mechanisms operating in AD has received considerable attention, as it has been demonstrated that the amyloid precursor protein (APP) decreases HO activity thus reducing the intracellular levels of bilirubin with following decrease in the cellular antioxidant defense (12, 17-18, 31, 36). Heme oxygenase is a stress-induced protein that has been implicated in defense mechanisms against agents that may

induce oxidative injury, and its induction represents a common feature in a number of neurodegenerative diseases. HO-1 induction, which occurs together with the induction of other stress proteins during various physiopathological conditions, represents a strong protective system potentially active against brain oxidative injury. Significant increases in the levels of HO-1 have been observed in AD brains in association with *neurofibrillary tangles* and also HO-1 mRNA was found increased in AD neocortex and cerebral vessels (32, 117). Interestingly, the spatial distribution of HO-1 expression in diseased brain is essentially identical to that of pathologic expression of *tau* (32). In AD cortex and hippocampus, HO-1 has been shown to be overexpressed and colocalized to *senile plaques* and *neurofibrillary tangles*. This result demonstrates that expression of *tau* protein and HO-1 may be regulated by oxidative stress in a coordinated manner, thus enforcing the finding that this enzyme plays a pivotal role in the cytoprotection of neuronal cells (12, 96, 115). Taken together all these findings do not allow to single out a product of HO activity as the main neuroprotective factor; rather a complex puzzle of regulatory interactions between heme degradation products and cellular *pathways* involved in cell death/survival is hypothesized. In addition, another protein, thioredoxin reductase (TRXr), is emerging as critical *vitagene* involved in brain stress tolerance (12, 17-18, 77-78, 96). As such, it has been demonstrated that TRXr plays an important role in protecting against oxidative stress and in regulating cell growth and cell death (77-78). Interestingly, study showed that treatments of primary rat hippocampal cell cultures with exogenous Trx enhanced their survival against β -amyloid cytotoxicity (63). Thus, it has been suggested that Trx might play a protective role in AD, and Trx-1 *deficit* might eventually contribute to increased oxidative stress and subsequent neurodegeneration in AD. In contrast to low Trx-1 protein levels, TrxR activity was significantly elevated in the amygdala and cerebellum of AD brain (96, 118). Among the very few studies available on the expression of Trx cycle enzymes in neurodegenerative processes, one report indicated increased Trx1 protein and RNA levels in the grey and white matter of AD brains (119). Consistently, recent data from our laboratory has provided clear evidence in the inferior parietal brain of AD patients, of a significant increase in the expression of HO-1 and TRXr, whereas this latter was not increased in the cerebellum of AD brains, compared to controls (96). Plasma content of GSH was decreased in AD patients, compared to the control group and was associated with a significant increase in oxidative stress markers, i.e. GSSG, hydroxynonenal, protein carbonyl content and nitrotyrosine. In addition, AD lymphocytes showed an increased expression of inducible nitric oxide synthase, HO-1, Hsp72, Hsp60 and TrxR (96). It is likely that the expression of the Trx cycle enzymes must be tightly regulated in order to maintain optimal brain cell function and to mount appropriate defenses in response to stress conditions. These observations strongly support a role for nitrosative stress in

the pathogenesis of AD and indicate that the *stress responsive genes*, such as heme oxygenase and thioredoxin reductase, may represent important *targets* for novel cytoprotective strategies (12, 17, 36, 96). Given the broad cytoprotective properties of the *heat shock response*, there is now strong interest in discovering and developing pharmacological agents capable of inducing the *heat shock response*, preventing or slowing the main pathophysiological aspects associated to AD (17-18, 20, 31, 33, 36). Stimulation of various maintenance and repair *pathways* through exogenous interventions (mild stress or compounds targeting the *heat shock signaling pathway*), might have biological significance as a novel approach to delay the onset of various age-associated disorders (12, 17-18, 20, 31, 33, 36), opening intriguing perspectives with possible impact on cell survival during times of oxidative stress, hence contributing to the activation of cell life programs and to the extent of cellular stress tolerance and resistance to neurodegenerative insult. Therefore, the nutritional manipulation of endogenous cellular defense mechanisms represents an innovative approach to therapeutic intervention in neurodegeneration and propose potential novel therapeutic strategies relying upon the simultaneous activation of cytoprotective genes of the cell life program and down-regulation of proinflammatory and pro-oxidative genes involved in programmed cell death (12, 17-18). From a molecular point of view, the cell is able to fight against oxidant stress using many resources, including vitamins (A, C, and E), bioactive molecules (glutathione and flavonoids), enzymes (*heat shock protein* (HSP)-32, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidases, thioredoxin reductase) and redox-sensitive protein transcriptional factors (AP-1, NFkB, Nrf2, HSF) (20, 36) (Fig 1A). Increasing evidence from many laboratories indicates that AD brain is under oxidative stress, with strong evidence of protein oxidation, lipid peroxidation and peroxynitrite damage. Vitamin E should modulate A β -induced oxidative damage and neurotoxicity in brain cells. Clinical *trials* indicated that vitamin E or its constituent such as α -tocopherol (α -T) was able to attenuate the effects of several pathogenetic factors in AD (120). A lipid-soluble free radical *scavenger* like vitamin E is predicted to protect synaptosomal membranes and hippocampal neuronal cells in culture against A β -associated free radical oxidative damage (121). Moreover, it has been observed that *Trolox* treatment, a soluble compound of vitamin E, abolished protein peroxidation produced by A β -deposition in astrocytes culture (122). Emerging evidence indicated that vitamin E supplementation blocked A β -induced inhibition on transmembrane proteins function, including glucose and glutamate transporter, ionic-channel of ATPasi pump, G-protein involved in *signal* transduction and CK enzyme associated to energetic metabolism (123). Taken together these observations encouraged daily dose assumption of antioxidants agents useful for the treatment of central and peripheral oxidative damage, including neurodegeneration and brain aging (123-124). Finally, a growing body of literature has unraveled the antioxidant and anticarcinogenic activities of

polyphenolic compounds, such as curcumin (33). Curcumin, a well-known spice used commonly in India to make foods colored and flavored, is also used in traditional medicine to treat mild or moderate human diseases. Based on the ability of this compound to regulate a number of cellular *signal transduction pathways*, it is emerging as a potential therapeutic drug for the treatment of devastating neurodegenerative disorders. So, also curcumin supplementation is considered by many researchers an original and alternative nutritional approach, of possible clinic application, able to delay and/or modulate chronic and oxidative insults correlated to neurodegeneration and aging processes (12, 18, 33, 125).

MENIERE'S DISEASE

Meniere's disease (MD) is a complex, multifactorial idiopathic disorder characterized by the triad of fluctuating hearing loss, episodic vertigo, tinnitus, by fullness and endolymphatic hydrops found on *post-mortem* examination (126). The histopathological *hallmarks* of the disease, at the bone level, are endolymphatic hydrops, atrophy and erosion of the endolymphatic sac (127). In 1861, Prosper Menière described a syndrome consisting of continuous or intermittent head noises accompanied by diminution of hearing and intermittent attacks of vertigo, uncertain gait and falling, accompanied by nausea, vomiting and syncope. The essence of Meniere's hypothesis was that the association of auditory and vestibular symptoms suggested the ear as the anatomical location of the disorder, as opposed to the central nervous system as previously thought (128). The cause of Meniere's disease remains unclear. Numerous factors play a role in the development of hydrops and in the pathogenesis of related cochleovestibular dysfunction (129). Recent advances in the understanding of the pathophysiology of symptom development in Meniere's disease underlined the role of various aetiopathological components including genetics, autoimmunity, alterations of ionic homeostasis, excitotoxicity, oxidative stress, metabolic and hormonal disequilibrium, cellular apoptosis, viral infections, vascular disorder and trauma (126, 130). Endolymphatic hydrops (ELH) is generally accepted as the decisive histological characteristic of Meniere's disease. Surgical closure of the endolymphatic duct (ED) was used to induce endolymphatic hydrops in *guinea pigs*, an animal model of Meniere's syndrome with hearing loss. It has been traditionally assumed that endolymphatic hydrops is the result of blockage of longitudinal flow of endolymph from the cochlea to the endolymphatic sac (129). Therefore, it has been hypothesized that surgical obstruction of the endolymphatic duct altered the cytochemistry of the perilymph resulting in cellular stress and dysfunction of fibrocytes of the spiral ligament. Clearly, much remains to be clarified regarding the underlying cytologic changes and biochemical perturbations that lead to the

induction of hydrops. The key point is that there is a pressing need for a search for the cellular and molecular bases of the various symptoms of Meniere's syndrome, because current evidence indicates that hydrops per sé is not the cause. Hypothesis of hydrops as being the final common *pathway* has not been proven conclusively. Recent findings include the immunolocalization of aquaporins in the inner ear of mouse, rat and human to cell types that are likely to undergo high ionic perturbances (e.g. potassium flux) and to putative areas of endolymph resorption or cycling, suggesting a critical role for aquaporins expression in inner ear water homeostasis and in the pathogenesis of Meniere's disease (**127, 132**). The burden of Meniere's syndrome (MS) is substantial, especially when considering the significant impact on the quality of life of patients affected. The prognosis of Meniere's disease and the emergence of concomitant symptoms are highly relevant for patients of both sexes and their physicians (**133**). Meniere's syndrome is multifactorial disorder and the interaction of several genes with the environment is probably involved. Familial Meniere's disease (FMD) represents 2.6-12% of MD. *Linkage* analysis has pointed to chromosome 14 and several mutations have been described in the coagulation factor C homology (COCH) gene (14q12-13) (**130, 134**), which cause the autosomal dominant sensorineural hearing loss DFNA9 and a high prevalence of symptoms of Meniere's (**130, 135**). Various aetiopathological mechanisms have been postulated to be at the root of Meniere's disease (MD) and some data suggest that there may be also an underlying autoimmune factor. In fact, Meniere patients manifest certain characteristics that are typical of autoimmune involvement association of particular human leucocyte antigen haplotypes, the presence of antibodies against internal ear antigens. Previous studies have shown a highly significant association between sporadic and one of the human leukocyte antigen, HLA-C genotypes (**130**). Current studies have reported that oxidative stress may play a crucial role in the pathogenesis of a variety of inner ear diseases, such as noise-induced hearing loss, ischemic impairment and age-related hearing loss (**126, 136-137**). Concerning MD, it has been suggested that oxidative insult, represented by oxygen and nitrogen free radicals, was likely to contribute to the pathology associated with endolymphatic hydrops and therefore free radical scavengers might be useful in the treatment of MD patients (**126, 136-138**). Scientific observations reported that hearing loss and cochlear degeneration in the *guinea pig* model of endolymphatic hydrops (ELH) result, in part, from toxic levels of excitatory amino acids (EAAs) such as glutamate, which in turn cause changes in the expression of genes linked to intracellular glutamate homeostasis and apoptosis, leading to neuronal cell death (**137**). Moreover, iNOS-generated NO could be involved in the pathophysiology of vestibular dysfunction in Meniere's disease (**126, 136, 139-140**). It has been reported that endolymphatic hydrops (ELH) induced a chronic activation of nitric oxide synthetase type II (iNOS) enzyme in ganglion cells which in turn

determined an up-regulation of NMDA receptors leading to neuronal damage and death, probably as a consequence of excitotoxic overactivation of glutamate receptor (140-141). The mammalian cochlea provides a useful model for the study of factors that may modulate mechanisms of glutamate handling at glutamatergic synapses. In particular, the cochlea exhibits systematic variations in the number and activity of glutamatergic synapses between afferent fibers and the two types of hair cell (139, 141). Additionally, degeneration of the sensory cells and the supporting tissue, e.g., the stria vascularis has been described histomorphologically (137). The glutamate/aspartate transporter GLAST is known to occur in the plasma membrane of supporting cells and their glia-like processes around the synaptic region of inner hair cells of the mammalian cochlea. Its function there is presumably to take up glutamate following the release of this putative aminoacid neurotransmitter from the inner hair cells (142). Interestingly, scientific studies showed increased GLAST mRNA levels in pathological condition of ear. These findings suggest that GLAST plays an important role in keeping the concentration of glutamate in the perilymph at a nontoxic level during acoustic overstimulation (143) and open new perspectives for innovative therapeutic strategies of pathologies characterized by sensorineural hearing loss associated to endolymphatic hydrops (ELH). Apoptosis is a normal physiological cell death which plays a critical role in maintaining tissue homeostasis. It has been proven that this particular *pattern* is of great importance to hearing system reorganization and maturity. Caspase-3 has been suggested to be the primary executioner in most cellular apoptosis during both normal developmental cell death and the removal of damaged cells. Immunocytochemistry analysis of *guinea pig* cochlea, an animal model of endolymphatic hydrops, revealed high levels of expression of some oxidative and/or nitrosative *biomarkers* and of proapoptotic factors, including caspase-3 protein, in the spiral ganglion cells, in the blood-vessels and fibrocytes of the lateral wall, as well as in supporting cells of the organ of Corti (140, 144). Further immunohistological examinations of the inner ear with specific antibodies to 8-isoprostane (8-iso) and nitrotyrosine (NT) showed increased expression levels for both oxidative stress *markers* in spiral ganglion cells, in the blood-vessels and fibrocytes of the lateral wall, as well as in supporting cells of the organ of Corti, suggesting a possible role for oxidative and/or nitrosative insults of Meniere's syndrome pathogenic determinism (137). Moreover studies demonstrated that H₂O₂-evoked inhibition of gap junctional coupling of *Hensen cells* is closely related to pathophysiological conditions such as noise-induced hearing loss, aminoglycoside-related ototoxicity and presbycusis, which are known to be associated with production of free radicals gap junctional conductance (Gj) of isolated pairs of cochlear supporting *Hensen cells* of *guinea pig* under control conditions and in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂) (145). Increasing evidence suggests that oxidative stress is involved in the development of endolymphatic hydrops

and that cellular damage and apoptotic cell death might contribute to the sensorineural hearing loss found in later stages of MD (126, 137). Furthermore, it is well known that reduced expression and/or activity of antioxidant proteins lead to oxidative stress, accelerated aging and neurodegeneration (12, 125, 146-147). The ability of a cell to counteract stressful conditions, known as *cellular stress response*, requires the activation of pro-survival *pathways* and the production of molecules with anti-oxidant, anti-apoptotic or pro-apoptotic activities (12, 18, 31, 33, 36). Among the cellular *pathways* conferring protection against oxidative stress, a key role is played by *vitagenes*, which include *heat shock proteins* (Hsps) heme oxygenase-1 and Hsp70, as well as the thioredoxin/thioredoxin reductase system (34, 146-147). When appropriately activated, cellular stress response has the capability to restore cellular homeostasis and rebalance redox equilibrium. Activation of antioxidant *pathways* is particularly important for neural cells with relatively weak endogenous antioxidant defenses, such as spiral ganglion neurons which are centrally involved in the pathogenesis of MD (126). Perturbation of redox status, overloading of the product of polyunsaturated fatty acid peroxidation (hydroxynonenals, HNE) or protein carbonyls (PC) can disrupt redox homeostasis. Moreover it is known that normal auditory function depends on maintenance of the unique ion composition in the endolymph. Hence, carbonic anhydrase in the inner ear has been suggested to play an important role in maintaining the ion concentration and regulating fluids of the inner ear (18, 31, 148). In this study we tested the hypothesis that neurotoxicity is an important primary mediator of injury in Meniere's disease and that in MD patients measurable increases in *markers* of *cellular stress response* and oxidative stress in peripheral blood are present. This study also explores the hypothesis that changes in the redox status of glutathione, the major endogenous antioxidant, associated with abnormal expression and activity of carbonic anhydrase can contribute to increase oxidative stress and to disruption of systemic redox homeostasis which can be associated to possible alterations on vulnerable neurons such as spiral ganglion neurons and consequent cellular degeneration.

MOLECULAR-GENETIC STUDY OF NF1 GENE IN PEDIATRIC CLINIC CASES

With the term “Neurofibromatoses” (NF) is indicated a wide group of inherited syndromes defined “*neurocutaneuos*” characterized by a broad array of clinical manifestations, variable and heterogeneous, including tumors, osseous dysplasia, learning disorders and cardiovascular disease (149). The last decade has been fundamental for clinical and molecular characterization of Neurofibromatoses diseases. Conventionally, they are classified in seven different types of neurogenetic disorders, of which the most common inherited syndromes are Neurofibromatosis type 1 (NF1) or *von Recklinghausen* diseases and Neurofibromatosis type 2 (NF2) or bilateral vestibular schwannomas (149-151). Others neurocutaneous genetic diseases include segmental Neurofibromatosis, Watson, Noonan and Legius syndromes (152). Neurofibromatosis 1 (NF1) is one of the most common autosomal dominant conditions occurring with an estimated incidence of 1 in 2500 to 3000 live births (153) and with an approximately prevalence of 1 in 10000, that afflicts all ethnic groups, equally affects males and females and all age groups (153-154). Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a relatively common autosomal-dominant multisystem disorder caused by a spectrum of inactivating mutations NF1 gene, which is located on the pericentromeric portion of human chromosome 17 (17q11.2). The offspring of an affected individual have a 50% risk of inheriting the altered NF1 gene, even though there is a considerable variability in the clinical features of this particular cancer predisposition syndrome, both inter- and intra-familially and a complete penetrance (155-156). Moreover, half of clinic cases have NF1 as the result of a *de novo* NF1 gene mutation. Although recent advances in genetic testing may permit the laboratory diagnosis in as many as 95%, for the majority of patients, the diagnosis is made on the basis of clinical manifestations (149). The often extreme variability in the presentation of extent and severity of NF1 clinical signs and symptoms, even within the same family, affected by the same mutation has meant that establishing definitive clinical diagnostic *criteria* has often been problematic. Recognition of this issue led the *National Institute of Health* (NIH) in 1988 to issue a “*Consensus Statement*” which defined the standard diagnostic *criteria* for NF1 to help clinicians to be able to distinguish it from other related disorders (157). Generally, diagnosis is clinic and requires the presence of 2 or more major *criteria*, established by the *National Institute of Health* (NIH), including: 6 or more café-au-lait spots, axillary or inguinal *freckling*, 2 or more cutaneous neurofibromas, 1 plexiform neurofibroma, characteristic bony lesions (pseudarthrosis, sphenoid wing hypoplasia), an optic glioma, 2 or more iris *Lisch nodules*, or a first-degree relative with NF1. Those *criteria* are useful for clinical diagnosis and examination, but they doesn't play any prognostic role on severity of the disease's development (157) (Fig A,B). Neurofibromatosis type 1

is a multisystem neurogenetic disorder characterized by the progressive appearance of the main clinical manifestations age-related (158-160). Café-au-lait spots are generally the heralding feature of NF1. Café-au-lait spots are hyperpigmented flat spots that are oval or rounded with fairly smooth borders. They must be at least 0.5 cm in diameter in prepubertal individuals and 1.5 cm in postpubertal patients. They are present at birth in many individuals and increase in size and number over the first 5 to 7 years of life (158-161). These skin manifestations can occur anywhere on the body, but frequently they can develop on the trunk and limbs. Diffuse skinfold *freckling* (*Crowe's sign*) is the most specific of the cardinal *criteria* for NF1 and is considered nearly pathognomonic. It is second only to CALMs in terms of age-related frequency. Axillary and inguinal *freckling* is detected most frequently between 3 and 5 years of age (158). Additional sites for *freckling* include the area above the eyelids, around the neck, and under the breasts. In some affected individuals, *freckling* may extend beyond these regions. *Lisch nodules* are small, dome-shaped hyperpigmented macules of the iris that cause no impairment of vision (158, 162). They typically present in patients between 5 and 10 years of age and are most reliably identified on slit-lamp examination by an experienced ophthalmologist. *Lisch nodules* are pathognomonic of NF1 and should be distinguished from iris nevi observed in the general population. Retinal hamartomas are a common finding (by age 6, 15-20% have them, 95% of adults have them) and are included as one of the cardinal NIH diagnostic *criteria* (158-163). The neurofibroma is considered another one of the *hallmark* signs of NF1 (158, 160-161). Neurofibromas can occur anywhere on the body and there is a wide variation in their shape and size. Cutaneous or dermal neurofibromas are tumors of the nerve sheath comprised of Schwann cells, fibroblasts, perineural cells, mast cells, axons and blood vessels (164). Analogously to melanocytes, the neurofibroma-derived Schwann cell, believed to be the primary tumor cell in neurofibromas, has been shown to have both a germline and second-hit mutation in the NF1 gene (164-165). They may appear in childhood but more commonly develop in *teenagers* or adults. The total number of neurofibromas seen in adults with NF1 varies from a few to hundreds or even thousands. Additional cutaneous and subcutaneous neurofibromas continue to develop throughout life, although the rate of appearance may vary greatly from year to year (158, 161). Plexiform neurofibromas (PNs) are distinct from the cutaneous neurofibroma in that they are usually congenital. They often arise from the dorsal spinal roots, nerve plexi, large nerve trunks, or sympathetic chains (158, 161, 166). Plexiform tumors may be discrete, homogeneous and well circumscribed or diffuse, heterogeneous and infiltrative (166). They occur in at least 25% of patients and are probably present at birth. The rate of growth is thought to be unpredictable and episodic, but early childhood, puberty, and childbearing age are considered to be the periods of greatest risk for disease progression (166). In addition, plexiform neurofibromas have a potential for

transformation into highly malignant peripheral nerve sheath tumors, which occur in approximately 5% of patients (166-167). The *management* of plexiform neurofibromas is limited to surgical resection, but complete tumor removal is rarely possible, due to the size, location and infiltrating nature of tumors (158, 161, 166-167). Considering the high impact of these tumors on morbidity, mortality and quality of life in patients with neurofibromatosis 1, development of new therapies is urgent. Clinical *trials* with a variety of pharmacological agents are ongoing to discover and test medical treatments for the various manifestations of NF1, primarily progressive or disabling plexiform neurofibromas. Pirfenidone (trade name, Deskar; Solanan, Inc., Dallas, TX), 5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone, is a broad-spectrum oral antifibrotic drug. It has been recently demonstrated that oral pirfenidone significantly inhibits survival of human neurofibroma xenografts in mice with severe combined immune deficiency (168). These data suggested that pirfenidone interferes with neural tumor survival and might be a good candidate for clinical *trials* in patients with neurofibromatosis and plexiform neurofibroma. A phase II clinical study of pirfenidone for adults with neurofibromatosis 1 and extensive plexiform neurofibromas has been conducted (169). A large body of clinical evidences reported other clinical manifestations associated to this particular multisystem genetic disorder, including optic glioma, orthopedic abnormalities (scoliosis, pseudarthrosis, hypoplasia of the sphenoid), neurologic clinical signs (language disorders, learning difficulties and cognitive *deficit*, visuospatial and visuomotor alteration), short stature, macrocephaly, T2 hyperintensities on brain MRI, headaches and essential hypertension, development of malignancy (150, 158, 161, 170-173). Optic gliomas are one of the most common pilocytic astrocytomas present in 15-20% of pre- or school age patients with NF1 (170). It is a slow-growing tumor and can present clinically with proptosis, decreased visual acuity, strabism, optic nerve thickening, ipothalamic dysfunction, ophthalmologic abnormalities, headache or precocious puberty (174). Yearly neuroophthalmologic observation is the accepted *management* protocol for lesions that present asymptotically. The current first-line therapy for aggressive NF1-associated optic gliomas includes a baseline MRI for characterization of growth rate, surgical intervention, radiation therapy or chemotherapeutic treatment. Clinical findings showed a high incidence, about 30-50%, of skeletal complication and osseous lesions represented by vertebral anomalies (dystrophic scoliosis, lordoscoliosis, cifoscoliosis) correlated to Neurofibromatosis type 1 (150, 171, 175). Of particular clinical relevance and interest, is tibial and perone pseudarthrosis as orthopedic complication (176). Moreover, sphenoid wing dysplasia is generally considered a distinctive osseous lesion of Neurofibromatosis type 1 (150, 158). Malignancy is primarily a complication of young adults with NF1. The overall incidence of cancer is 3% more than the general population. Also, early tumor burden are more common in patients with large gene

deletions, but, as yet, there is no clear genotype/phenotype correlation. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) are a particularly devastating complication associated to this genetic disorder (177). Molecular investigation of MPNSTs showed genetic aberrations, including NF1 gene deletion, p16 gene homozygous suppression (178) and membrane glycoprotein CD44 expression (179). Unusual tumors occur with increased frequency in NF1, including carcinoid, pheochromocytoma, brain tumors, chronic myeloid leukemia and xantgranuloma tumors all can manifest in NF1 patients (150, 158, 180). In addition to the physical manifestations of NF1, learning disabilities and attention *deficit* occur in as many as 60% of patients. Early reports overestimated the degree and prevalence of this impairment or suggested a nonverbal learning disability profile (173, 181). Although many studies have found academic and neuropsychological *deficits* in NF1, the degree and type of *deficit* have often been inconsistent. More rigorous studies conducted over the last 20 years suggest only a slightly increased incidence of mental retardation, intellectual abilities that are generally in the low average range but remain within one *standard deviation* of the normal population, and an equivalent prevalence of language and nonverbal based *deficits*. No specific learning disability is characteristic of NF1, but visual spatial difficulties are common. An increased incidence of learning disabilities is also reported, with frequencies reported to range between 30 and 65% (173, 182). A fair amount of research has shown that children with NF1 perform slightly lower than their typically developing peers on intelligence tests and that the mean IQ scores of the NF1 children appear to cluster around the low average to average range (183). Recently, neuropsychological aspects are considered of high clinic and clinic interest. Visuospatial *deficits* have long been considered to be one of the “*hallmark*” characteristics of the cognitive profile of individuals with NF1 (173, 181). Finally, other clinic complications occurred in about less 5% of affected patients included epilepsy, intracranial tumors, hydrocephalus, renal artery stenosis, vasculopathy and cardiovascular abnormalities (150, 158). Cerebrovascular abnormalities are serious but underrecognized complications of neurofibromatosis type 1 (NF1) associated to stenocclusive arteropathy (184). In addition, NF1 patients have an increased incidence of cardiovascular diseases, including obstructive vascular disorders. One of the more common vascular lesions in NF1 is renal artery stenosis with consequent hypertension (185). The pathogenesis of these vascular lesions in NF1 is not clear. However, because NF1 is normally expressed in endothelial and vascular smooth muscle cells and can regulate cell growth through Ras regulation, its loss from one or both of those tissues could contribute to the pathogenesis of obstructive vascular disease in NF1 (185). Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a genetic disorder associated with cognitive *deficits*, learning problems, medical complications and cosmetic disfigurement. Despite the wide-ranging impact of NF1, very few studies have examined the

psychosocial adjustment of individuals with NF1, and in particular, *self-concept* (186). Children with NF1 have poorer *self-concept* for physical abilities and adolescents with NF1 have poorer *self-concept* for physical abilities, mathematics and general self when compared with normative mean values. In addition, comportamental and social problems are reported (187). Finally, a focus of investigation explored the relationship between NF1 and *attention deficit hyperactivity disorder* (ADHD) (173). The cognitive phenotype of NF1 is marked by a higher incidence of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorders, behavioral abnormalities and psychosocial issues. Taken together, these observations highlights the importance of genetic counseling, regular eye examinations, complete neuropsychological evaluation with intellectual testing and careful physical exams. Regular medical appointments to a multidisciplinary clinic are also essential. The current aim of neurofibromatosis specialists is to provide cohesive *standards* of care for everyone with neurofibromatosis and to devise standardised protocols for assessment and *management* within a multidisciplinary setting (150, 159). Neurofibromatosis type 1, an inherited complex multi-system disorder, is caused by from heterozygous inactivating mutations of the NF1 tumor suppressor gene and spanning over 280 kb of genomic DNA. The NF1 gene is one of the largest human genes located at chromosome 17 (17q11.2), contains 60 exons, of which 3 are alternatively spliced and encodes a 12 kb mRNA transcript (150, 159, 188) (Fig C). The protein product of the NF1 gene (neurofibromin) is a cytoplasmic protein that is 2818 amino acids long (189). Moreover, intron 27 b of the NF1 gene contains three embedded genes (OMGP, EVI2B and EVI2A), which are all transcribed in the opposite orientation to the NF1 gene (190) (Fig C). Neurofibromin, the NF1 gene protein product, is a tumor suppressor expressed in many cells, primarily in neurons, glial, Purkinje and Schwann cells, early in melanocyte development, blood vessels, muscles and scheletric apparatus (189, 191). The most highly conserved region of the protein is the NF1 GAP-related domain (GRD), which is encoded by NF1 exons 20-27a and functions by downregulating Ras (192). Two additional domains of neurofibromin have been described: the cysteine-serine rich domain (CSRD) and the Sec14p domain (189). The protein product of NF1 has extensive homology with the catalytic domain of GTPase-activating proteins (GAPs), such as p120GAP, that are known to accelerate the intrinsic GTPase activity of p21ras proteins (191). Neurofibromin, by means of its NF1-GRD domain, increases the GTP hydrolysis rate and functions as a tumor suppressor by reducing the activity of p21ras (193). p21ras play an important role in the growth and differentiation cellular processes. During the formation of the p21ras-NF1 complex, activated p21ras binds in a groove of the central catalytic domain of NF1 by residues including the *switch* regions I and II on p21ras and an arginine finger on NF1 (193). Once p21ras activated, ERK phosphorylates a variety of *targets*, including other kinases and transcription

factors, such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) *response* element-binding protein (CREB), transmitting signals for the expression control of genes involved in cell cycle, apoptosis, cell differentiation or migration. Oncogenic mutations of the RAS genes and reduced or absent neurofibromin favor the active status of p21ras, resulting in a permanent stimulation of the Raf-MEK-ERK or MAPK *signaling cascade* that leads to cell proliferation **(191) (Fig D)**. Another function of neurofibromin is related to its association to microtubules by region of NF1-GRD **(194) (Fig D)**. This function may be important in neurons for *signal transduction* events and the neuronal differentiation **(194-195) (Fig D)**. Another binding partner is *syndecan*, a transmembrane heparin sulfate proteoglycan **(196)**. *Syndecans* are supposed to function as coreceptors in different receptor tyrosine kinase *signaling pathways* and are implicated in cell matrix adhesion, cell movement and tissue morphogenesis. Neurofibromin and *syndecans* show overlapping distribution at synaptic junctions, suggesting a potential role of NF1 in adhesion and *signaling* at neuronal synapses **(196)**. Recently, Boyanapalli et al. demonstrated that neurofibromin also binds to caveolin-1 (Cav-1), an integral membrane protein implicated in regulating several *signaling* molecules, including p21ras, protein kinase C and growth factor receptors **(197)**. These authors speculated that neurofibromin and Cav-1 might inactivate p21ras-GDP and modulate p21ras/MAPK, PI3K/Akt and other *signaling pathways*, affecting cell proliferation and differentiation **(197) (Fig D)**. There are indications that neurofibromin modulates the activity of adenylyl cyclase, an enzyme that is crucial to the cAMP *signaling pathway*. Evidence regarding the participation of neurofibromin in the cAMP *pathway* came from studies carried out in *Drosophila* **(198)**. It has been observed that in *Drosophila*, neurofibromin is essential to the processes related to learning and memory, via the activation of cAMP **(198)**. Four alternatively splicing exons (9a, 10a-2, 23a and 48a) are responsible for the production of five human and murine neurofibromin *isoforms* (II, 3, 4, 9a and 10a-2), which exhibit differential expression in distinct tissues and are detected by specific antibodies **(191, 199-202)**. Normal neurofibromin type I is an excellent regulator of p21ras, observed predominantly in the brain **(191)**. Neurofibromin type II, named GRD2, is the result of the insertion of exon 23a and is expressed in Schwann cells. These findings show that this *isoform* is essential to the normal brain function and that the GAP-related domain must modulate learning and memory **(191, 199)**. Neurofibromins types III and IV are expressed in muscle tissue, mainly in cardiac and skeleton muscles. The identification of types III and IV in muscle tissues represents an unexpected finding due to the small number of muscle abnormalities present in NF1 patients **(201)**. Neurofibromin 9a (also called 9br) is the result of the inclusion of exon 9a. This *isoform* shows limited neuronal expression and may be involved, like *isoform* II, in the learning and memory mechanisms **(202)**. Recently, an *isoform* with insertion of the alternative exon 10a-2 was described,

which introduces a transmembrane domain. This variant was observed in the majority of human tissues analyzed and therefore seems likely to perform a *housekeeping* function in intracellular membranes, such as the endoplasmatic reticulum **(200)**. There is evidence that neurofibromin is critical for normal histogenesis during embryologic development and during wound healing **(191)**. This protein has been found to be expressed in chondrocytes, osteocytes, osteoclasts and osteoblasts **(203)**. Several studies have observed decreased bone mineral density and altered bone quality in NF1 patients, which may also present bone deformities such as scoliosis, cervical spine disorders and short stature **(150, 158, 204)**. Because of the large size of the NF1 gene, the lack of mutation *hotspots* and the presence of a wide range of genetic polymorphism associated to alternative *splicing* process, today as yet there is no clear genotype/phenotype correlation **(150, 159, 188)**. Generally, NF1 patients with whole gene deletion present a severe phenotypic clinic picture associated to a very large neurofibroma burden, more severe cognitive impairment, large hands and feet, dysmorphic facial features and a higher lifetime risk of developing malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) **(205-206)**. Hundreds of mutations have been reported in the NF1 gene, although no clear genotype-phenotype correlation has been identified to date **(205, 207)**. The only exceptions are deletions of the entire NF1 gene, which are present in approximately 4% of patients with NF1, generally associated with a severe form of the disease **(205)**. Since the NF1 gene was discovered in 1903, mutational analysis has become available on a clinical basis and is useful for diagnostic confirmation in individuals who do not fulfill diagnostic *criteria* or when prenatal diagnosis is desired **(150, 161)**. Mutation detection is complex due to the large size of NF1 gene, the presence of *pseudogenes* and the great variety of lesions. Due to the large number of coding exons and the considerable mutational heterogeneity, the determination of the NF1 mutational spectrum has been complex. However, despite no true “*hotspots*” have been found in NF1, recent data suggest that recurrence of several mutations are not so uncommon in NF1 patients **(205)**. Most of the NF1 mutations (90-95%) are intragenic mutations (point mutation, splice mutation, small deletion, insertion, or duplication). The remaining NF1 mutations (5-10%) are microdeletions encompassing the entire NF1 gene and its neighbouring genes **(207-208)**. Consequently, the development of sensitive, reliable and easy to use methods to differentiate between different type of mutation has important clinical implications for the *management* of patients with NF1. It also has been suggested that NF1 heterozygosity may be sufficient for development of benign neurofibromas (*haploinsufficiency*), with full loss of NF1 function being restricted to the progression to MPNSTs **(209)**. *Chimeric mice* composed in part of NF1^{-/-} cells demonstrates that loss of the *wild-type* NF1 allele is rate-limiting in tumor formation. In addition, mice that carry linked germ line mutations in NF1 and p53 develop malignant peripheral nerve sheath tumors

(MPNSTs) **(210)**. Zhu and collaborators reported that in *mice haploinsufficiency* of NF1 fosters a permissive tumorigenic environment for the development of neurofibromas, suggesting a role for *haploinsufficiency* itself in tumor formation **(211-212)**. A comprehensive *screening* approach to the NF1 gene found mutations in greater than 95% of tested subjects (including both spontaneous and inherited mutations) fulfilling NIH diagnostic *criteria* **(157)**. Usually, NF1 diagnostic *screening* strategies employ PCR based *screening* multi-step methods such as protein truncation test (PTT), single-strand conformational polymorphism (SSCP) or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) with varying degrees of sensitivity for each method **(205, 213)**. Direct DNA sequencing is then used to confirm and characterise mutations detected by each of these approaches and fluorescence in situ hybridisation (FISH) is used to detect large NF1 deletions **(214)**. Also, microarray based combinatorial sequencing-by-hybridization (cSBH) is employed for genetic diagnosis of NF1 patients **(215)**. These techniques detect whole gene deletions and small intraexonic deletions/insertions or point mutations. However, they are rarely able to detect deletions and duplications encompassing >1 NF1 exons. Only recently we performed molecular-genetic test based on reverse transcriptase PCR in combination with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to identify frequency of single and multi-exon copy-number changes, genomic rearrangements characterized by wide deletions/duplications, in the NF1 population **(207)**.

AIM OF THE STUDY

Aim of the present study have been to emphasized the role performed by free radicals species as *signaling-molecules* involved in the gene expression regulation and in the *cellular stress response in vivo* and *in vitro* models, with regards to the biochemical mechanisms ensuring cellular oxidoreductive homeostasis and *brain stress tolerance*. Data obtained from our laboratory assign high scientific value to the cytoprotective *vitagene network*, including HO-1 system, TRX/Trx redox system and others Hsps, in the modulation of the main age-related disorders. Furthermore, increasing evidence underscores the high potential of the Hsp system as a *target* for new neuroprotective strategies, especially those aimed at minimizing deleterious consequences associated with oxidative stress, such as in neurodegenerative disorders, systemic diseases and brain aging. This chapter also reviews evidence for the emerging role of redox-dependent mechanisms in the regulation of *vitagenes* through nutritional modulators, including carnosine, as a potential therapeutic intervention in neurodegeneration and aging processes.

Objectivies of the present clinical and experimental study are to investigate and to enlarge knowledge spectrum of NF1 gene mutations in pediatric patients, through the application of sensitive genetic tests based on amplification and direct sequencing analysis, in order to establish a possible genotype/phenotype correlation. Furthermore, negative clinic cases for point mutations are examined by another molecular-genetic test based on reverse transcriptase PCR in combination with *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) to identify frequency of single and multi-exon copy-number changes, genomic rearrangements characterized by wide deletions/duplications, in the NF1 population. Our study enlarge knowledge and spectrum of NF1 gene mutations and underlie the importance of molecular-genetic tests on the basis also of the Neurofibromatoses clinic field characterization.

METHODS

ALZHEIMER'S DISEASE

Ethical permission

The study was approved by the *local Ethics Committee* and informed consent was obtained from all patients.

Patients

Brain samples. Frozen inferior parietal and cerebellum samples were obtained from six AD patients and six age-matched controls for the present study from the Rapid Autopsy Program of the *University of Kentucky Alzheimer's Disease Research Center (UK ADRC)* that provided autopsy samples with average *postmortem* intervals (PMIs) of 2.1 h for AD patients and 2.9 h for control subjects (**Table 1**). All AD patients displayed progressive intellectual decline and met *NINCDS-ADRDA Workgroup criteria* for the clinical diagnosis of probable AD (**96, 216**). Hematoxylin-eosin, modified Bielschowsky staining, and 10-D-5, and α -synuclein immunohistochemistry were used on multiple neocortical, hippocampal, entorhinal, amygdala, brainstem, and cerebellum sections for diagnosis. Some patients were also diagnosed with AD plus dementia with *Lewy bodies*, but the results of this study showed no difference between AD patients with or without the presence of *Lewy bodies*. Control subjects underwent annual mental status testing and semiannual physical and neurologic examinations, as a part of the *UK ADRC* normal volunteer longitudinal aging study and did not have a history of dementia or other neurologic disorders. All control subjects had test scores in the normal range. Neuropathologic evaluation of control brains revealed only age-associated gross and histopathologic alterations.

Plasma and lymphocytes samples

Eighteen patients (nine men and nine women), with an average age of 62-83 years were used in the present study. All the patients had progressive cognitive *deficits*, for at least 18 months. The diagnosis of probable AD was established by following the *criteria* of the *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRADA)* (**96, 216**). The evaluation of the stage of dementia was assessed by *Mini Mental State Examination (MMSE)*, following the Italian law to receive free cholinesterase inhibitor drugs. All patients of this group were administered drugs under the supervision of specialized outpatient clinics for dementia. Five patients were classified as mild, and 13 patients, as moderate. The diagnosis was also confirmed by computed tomography (CT) or magnetic resonance

imaging (MRI) scan that showed a cortical atrophy in all patients. Eighteen subjects without dementia (6 men and 12 women), between 64 and 80 years were recruited as controls.

Sampling

Blood (6 ml) was collected after an overnight fast by venopuncture from an antecubital vein into tubes EDTA. Immediately after sampling, two blood aliquots were separated: first 2 ml were centrifuged at 10.000 g for 1 min at 4°C to separate plasma from red blood cells; the remaining aliquot (4 ml) was utilized for lymphocytes purific. All samples were stored at -80°C until analysis.

Lymphocytes Purification

Lymphocytes from peripheral blood were purified by using the *Ficoll Paque System* following the procedure as suggested by the manufacturer (*GE Healthcare, Piscataway, NJ*).

Western blot analysis

Samples of control and AD patients were analyzed for HO-1, Hsp60, Hsp72 iNOS and TRXr protein expression, as well as carbonyls (DPNH), hydroxynonenals (HNE) and nitrotyrosine protein, by using a *Western immunoblot* technique, as described previously (217-218). In brief, an equal amount of proteins (40 µg) for each sample was separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred overnight to nitrocellulose membranes and the nonspecific binding of antibodies was blocked with 3% nonfat dried milk in phosphate-buffered saline. Immunodetection of iNOS and protein nitrotyrosine were performed by using a polyclonal rabbit anti-iNOS antibody (sc-651, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA); 1:500 dilution in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5) and polyclonal rabbit anti-nitrotyrosine antibody (06-284, Upstate, Charlottesville, VA, USA), respectively. Immunodetection of HO-1, HO-2, and Hsp72 was performed by using, respectively, a polyclonal rabbit anti-HO-1 (SPA-895) and anti-HO-2 (OSA-200) antibodies (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA, 1:2,000 dilution in PBS, pH 7.5) and a monoclonal mouse anti-Hsp70 antibody (SPA-810, Stressgen). When probed for Hsp60 and TRXr proteins, a polyclonal goat anti-HSP60 antibody (sc-1052, Santa Cruz; 1:1,000 dilution in PBS, pH 7.5), and a polyclonal rabbit anti-TRXr-1 antibody (07-613, Upstate) were used, respectively. For immunodetection of HNE, membranes were incubated for 2 h at room temperature with anti-HNE (anti-4-hydroxy-2-Nonenal Michael adducts, 393205 Calbiochem, San Diego, CA). Carbonyl groups were estimated with a rabbit anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (V0401, DAKO, Glostrup, Denmark; 1:1,000 dilution in PBS; pH, 7.5). All blots were then visualized by using a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG. A goat polyclonal antibody

specific for β -actin was used as a loading control (sc-1615 product of Santa Cruz; 1:1,000 dilution in PBS; pH, 7.5). Immunoreactive bands were scanned by a laser densitometer (*LKB Ultrosan XL, Pharmacia, Uppsala, Sweden*). Molecular weights of the proteins were determined by using a standard curve obtained with proteins of known molecular weight.

Glutathione and glutathione disulfide assay

GSH and GSSG were measured by the NADPH-dependent GSSG reductase method, as previously reported (218). Lymphocytes were homogenized on ice for 10 s in 100 mM potassium phosphate, pH 7.5, which contained 12 mM disodium EDTA. For total glutathione, aliquots (0.1 ml) of homogenates were immediately added to 0.1 ml of a cold solution containing 10 mM DTNB and 5 mM EDTA in 100 mM potassium phosphate, pH 7.5. The samples were then mixed by tilting and centrifuged at 12,000 g for 2 min at 4°C. An aliquot (50 μ l) of the supernatant was added to a cuvette containing 0.5 U of GSSG reductase in 100 mM potassium phosphate and 5 mM EDTA, pH 7.5 (buffer 1). After 1 min of equilibration, the reaction was initiated with 220 nmol of NADPH in buffer 1 for a final reaction volume of 1 ml. The formation of a GSH-DTNB conjugate was then measured at 412 nm. The reference cuvette contained equal concentrations of DTNB, NADPH and enzyme, but not sample. For assay of GSSG, aliquots (0.5 ml) of homogenate were immediately added to 0.5 ml of a solution containing 10 mM N-ethylmaleimide (NEM) and 5 mM EDTA in 100 mM potassium phosphate, pH 7.5. The sample was mixed by tilting and centrifuged at 12,000 g for 2 min at 4°C. An aliquot (500 μ l) of the supernatant was passed at 1 drop/s through a SEP-PAK C₁₈ Column that had been washed with methanol followed by water. The column was then washed with 1 ml of buffer 1. Aliquots (865 μ l) of the combined eluates were added to a cuvette with 250 nmol of DTNB and 0.5U of GSSG reductase. The assay then proceeded as in the measurement of total GSH. GSH and GSSG standards in the ranges between 0 and 10 nmol and 0.010 and 10 nmol, respectively, added to control samples, were used to obtain the relative standard curves, and the results were expressed in nmol of GSH or GSSG, respectively, per mg protein.

HO activity assay

HO activity was determined at the end of each treatment, as described previously (219). In brief, microsomes from harvested cells were added to a reaction mixture containing NADPH, glucose-6-phosphate dehydrogenase, rat liver *cytosol* as a source of biliverdin reductase and the substrate hemin. The reaction mixture was incubated in the dark at 37°C for 1 h and was terminated by the addition of 1 ml of chloroform. After vigorous vortex mixing and centrifugation, the extracted

bilirubin in the chloroform layer was measured by the difference in absorbance between 464 and 530 nm ($\epsilon = 40 \text{ mM/cm}$).

Nitric oxide synthase assay

NOS activity assay was performed spectrophotometrically by exploiting the reaction of NO with oxyhemoglobin (HbO_2) to form methemoglobin, according to **(220)**. The reaction mixture contained in a final volume of 1 ml: 1 mM L-arginine, 1 mM CaCl_2 , 0.1 mM NADPH, 12 μM THB_4 , 5 μM HbO_2 , 4 μM FAD, 100 mM HEPES (pH 7.5) and 0.3 ml plasma sample. The enzyme activity was monitored by absorption spectrophotometry by following the controlled oxidation of HbO_2 to methemoglobin. The oxidation of HbO_2 to methemoglobin sensitive to L-NMMA (1 mM) inhibition and in the presence of 1 μM SOD and catalase was followed at 401 nm in a double-beam spectrophotometer (*Perkin-Elmer 559*) with a multiple wavelength program at 22°C. NOS activity was measured in the absence and presence of (a) 0.1 mM aminoethyl-isothiourrea (ITU), which is a specific iNOS inhibitor **(221)**, and (b) 1 mM methyl-L-arginine (LNMMA), a nonspecific NOS inhibitor that inhibits all three NOS isoforms **(222)**.

MENIERE'S DISEASE

Patients

We enrolled 39 patients (20 males and 19 females, with an average age of 49.5 years) with Meniere's disease according to the diagnostic scale of the *Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* published in 1995 for MD **(223)**, including: two or more definitive spontaneous episodes of vertigo 20 min or longer, audiometrically documented hearing loss on at least one occasion, tinnitus or aural fullness in the treated ear, and 34 age-matched healthy subjects. This control group, including 15 males and 19 females, with an average age of 39.5 years, had no cochleo-vestibular disorders and no systemic diseases. *Criteria* of exclusion were determined by audiometric and clinical examinations, for those patients showing tympanic membrane perforation, otosclerosis, infectious or neoplastic diseases of the ear and of the acoustic nerve. All patients were administered the *Profile of Mood States (POMS)*, which evaluates emotions and stress of past weeks: Tension-Anxiety (T-A), Depression-Dejection (D), Anger-Hostility (A-H), Vigor-Activity (V), Fatigue (F), Confusion-Bewilderment (C). The *Profile of Mood States* original scale contains 65 self-report items using the 5-point Likert Scale. Participants can choose from 0 (not at all) to 4 (extremely) **(224-225)**. In addition all subjects were given a tinnitus questionnaire consisting of 40 multiple choice questions to define the impact

of symptoms on the patient life. In the group of patients with diagnosis of Meniere's disease, the grade of severity for each patient (**Table 1**) was established on the basis of the vertigo attack frequency over a year (from 2 to 8 crisis), the intensity and the duration of symptoms (from a few days, to some weeks, to a month in the most severe case) (**226-227**). In this study group, the hearing loss degree was assessed instrumentally allowing staging of the disease in MD patients, as reported in **Table 2**.

Western Blot Analysis

The lymphocyte *pellet* was homogenized and centrifuged at 10,000 g for 10 min and the supernatant was used for analysis after dosage of proteins. Aliquot (40 µg) of protein extract was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (**217-218**), transferred overnight to nitrocellulose membrane and the non specific binding of antibodies was blocked with 3% non-fat dry milk in PBS. Membrane were then probed with a monoclonal mouse anti-Hsp72 antibody (SPA-810, Stressgen) that recognizes only the inducible form. Instead, carbonic anhydrase II (CAII), DPNH, HNE, and Trx were performed using polyclonal rabbit antibodies: (ab6621, Abcam, Cambridge, UK), (SPA-895, Stressgen), (V0401, DAKO), (HNE11-S Alpha Diagnostic International), (07-613, Upstate Biotechnology), respectively. Then, a goat polyclonal antibody specific for β -actin was used for loading control (1:1,000). For detection, blots were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) when probing CAII, DPNH, HNE and Trx, whereas a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (IgG) was used in the case of Hsp70 and horseradish peroxidase-conjugated anti-goat (IgG) for detection of β -actin followed by ECL chemiluminescence (*Amersham*). Immunoreactive bands were quantified by scanning Western blot imaged films with a laser densitometer (*LKB-Ultrascan, XL model*). Several blots were prepared with all samples and each sample was immunoblotted 3-4 times to check variability in the immunodetection signal. Molecular weights of the proteins detected were determined by using a *standard* curve obtained with proteins of known molecular weight.

AGING

Animals

All animal protocols were approved by the *University of Catania Laboratory Animal Care Advisory Committee*. Male *Wistar* rats purchased from Harlan (*Udine, Italy*) were maintained in a temperature- and humidity- controlled room with a 12-h light = dark cycle. Rats 12 months old (aged) and 28 months old (senescent) (n = eight per each age group), were fed *ad libitum* a certified

diet prepared according to the recommendations of the AIN. After the animals were killed, brains were quickly removed and dissected into the cerebral cortex, hippocampus, septal area and striatum, according to a *standardized procedure*, in a cold anatomic chamber and by following a protocol that allows a maximum of 50-s time variability for each sample across animals. Substantia nigra (SN) was dissected from the deepest part of the interpeduncular fossa. To exclude the possibility that the small size of nigral or septal samples could affect results, we analyzed pooled samples from SN or septum, to have a protein content comparable to that measured in cortex or striatum, and lipid peroxidation products as well as thiols, enzymes, and trace metals measured. In all these cases, we did not find significant differences between pooled samples and those coming from a single experimental animal.

Free and protein-bound sulfhydryl groups assay

Protein and non-protein sulfhydryl (SH) compounds in different brain regions were estimated by the DTNB-based method of *Sedlak and Lindsay (228)*. The content of SH groups was expressed in nanomoles per milligram of protein.

Western blot analysis

The tissue homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min, and the supernatant was used for HO-1, Hsp72, Hsp90, TRX1, TRX, carbonyls and HNE levels determination, after dosage of proteins as described **(217-218)**. Aliquots (30 µg) of protein extract were separated with SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and then probed with primary antibodies. Appropriate secondary antibodies were used, and the immunoreactivity was visualized by using ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The following primary antibodies were used: anti-HO-1, anti-TRX, anti-TRX1, and anti-Hsp90 antibodies (Stressgen, Victoria, BC, Canada) (1:1,000 dilution in Tris-buffered saline, pH 7.4) or with a monoclonal anti-Hsp72 antibody (RPN 1197; Amersham) that recognizes only the inducible form. When probed for HNE, membranes were incubated for 2 h at room temperature with anti-HNE (anti-4-hydroxy-2-nonenal) Michael adducts; (B 4067; Calbiochem, San Diego, CA). A rabbit-anti DNPH polyclonal primary antibody (Chemicon, Rosemont, IL) specific for DNP-protein adduct (1:100) was used to detect 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-derivative carbonyl groups. Goat polyclonal antibody specific for β-actin was used as loading control (1:1,000). For detection, the membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin G (IgG), followed by ECL chemiluminescence (Amersham). The amounts of inducible HO-1, Hsp72, Hsp90, TRX1, TRX, carbonyls, and HNE were quantified with scanning Western blot-imaged films with a laser

densitometer (*LKB-Ultroscan, XL model*). Multiple exposures of each blot were used to ensure the linearity of the film response.

STUDY IN VITRO

Neuroblastoma SH-SY5Y cell culture and treatments

Neuroblastoma SH-SY5Y cells were purchased from *ATCC* (LGC Promochem Teddington, U.K. CRL-2266). Undifferentiated Neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured in 75 cm² flasks with 50% of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 50% of Nutrient F-12 HAM, then incubated with 5% CO₂ at 37°C. A fraction of confluent SH-SY5Y cells was incubated with 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) at different concentrations 0.5mM, 1.0mM e 2.0mM for 7h and 24h of exposure, in order to evaluate HO-1, DPNH and 4-HNE protein levels expression. A second fraction of confluent SH-SY5Y cells was treated with 1.0mM SIN-1 in the presence or absence of carnosine (CRNS) (300µM, 1.0mM, 10mM) or 1.0mM carnosine-trehalose (CRNS-T) for 7h of exposure, in order to evaluate Hsp72 protein levels expression. After treatments, cells were harvested by using PBS 1X buffer containing 1mM EDTA, 10mM di Tris (pH 7.4), 0.5 mM di fenil-metil-sulfonilfluoride (PMSF) and washed twice in PBS by centrifugation at 1,500 rpm at 4°C. Cell *pellets* and cell-culture medium were collected as necessary and used for *Western blotting*, after dosage of proteins as described **(217-218)**.

Neuroblastoma SH-SY5Y MTT Assay after treatment with SIN-1 in presence and absence of CRNS and CRNS-T

Undifferentiated Neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured in *microplate* of 96 wells containing 50% of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 50% of Nutrient F-12 HAM. SH-SY5Y cells were treated with 1.0mM 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), in presence and absence of carnosine (CRNS), at different concentrations (300µM, 1.0mM e 10mM) and 1.0mM carnosine-trehalose (CRNS-T), for 4h and 7h of exposure. *Cell viability* was defined as the reduction in MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Living, metabolically active cells reduce the soluble yellow tetrazolium salt MTT, yielding dark blue water-insoluble formazan crystals **(229)**. MTT was dissolved at a concentration of 5 mg/mL in phosphate-buffered saline (PBS). To obtain cell lysis and to dissolve the formazan crystals, an extraction *buffer* containing 2-propanol and sodium dodecyl sulfate (SDS) at a final concentration of 3% (v/v) was used. After treatments, the cells were washed twice with PBS and then incubated for 3 hr in 400 µL of MTT solution per *well*. This

solution was then replaced with 400 μ L of extraction buffer per well and incubated for 1 hr at 37°C to dissolve the formazan crystals. Finally, absorbance at 570 nm was measured by a microplate reader spectrophotometer (BIO-RAD *Ultramark Microplate*). Values are expressed as % of cell viability (\pm S.E.M.) of different experiments including treated samples and controls.

Determination of protein

Proteins were estimated by the BCA protein assay method (230) by using *bicinchoninic acid* (BCA) reagent.

Statistical Analysis

Results were expressed as means \pm SEM of n=39 experiments, each of which were performed, unless otherwise specified, in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by inspection of all differences by *Duncan's* new multiple-range test. Differences were considered significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

MOLECULAR-GENETIC STUDY OF NF1 GENE IN PEDIATRIC CLINIC CASES

Patients

We screened the entire coding region of NF1 transcript in a total of 50 patients by amplification PCR and direct sequencing of 24 cDNA overlapping fragments. Negative clinic cases for point mutation were tested with another molecular method based on MLPA technique. Clinical features of the study population were typical with respect to NF1 phenotype and almost all patients fulfilled the *NIH Consensus Criteria* (157). Informed consent was obtained from all participants following ethical practices approved by local *Ethics Committee*. Blood samples for genetic analysis were taken from patients and eventually family members following *standard* medical protocols and procedures. Control samples were taken from healthy donors. In 33 patients genetic analysis has been completed detecting 21 different heterozygous mutation of the NF1 gene, including aberrant *splicing* mutation, microdeletion *in frame* and *frameshift*, microinsertion *frameshift*, *missense* and *nonsense* mutation, single-exon deletion and finally genomic deletion. These mutations were distributed across the gene, ranging from exon 1 to 57, resulting in neurofibromin molecules of different length and potentially affecting function in differently ways. Mutations were subsequently confirmed in DNA genomic from patient's lymphocytes. Subjects who tested negative for NF1 point mutations and intragenic insertions/deletions were analysed using MLPA assay (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) for NF1 copy-number changes (Fig E).

NF1 mutation analysis

Our comprehensive NF1 gene mutations screen protocol involves: (1) a direct cDNA sequencing of all amplified 24 cDNA fragments (*Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*); (2) a *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) analysis to identify small deletions or duplications involving adjacent exons (NF1 gene-specific MLPA Assay kits: *SALSA P081/P082, MRC Holland, Amsterdam, NL*).

Total RNA or genomic DNA were extracted from blood lymphocytes using the QIAamp RNA or DNA Blood kit (*Qiagen, Hilden Germany*) following the manufacturer's instructions. Otherwise RNA was extracted using PAXgene Kit (*PreAnalytiX, PAXgene Blood RNA Kit*) for blood samples collected into PAXgene tube. RNA (~1 µg) was reversed transcribed using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System (*Invitrogen, Carlsbad U.S.A.*) in order to synthesize cDNA. Reaction mixture for cDNA synthesis included: RNA (~1 µg), DNTs mix 10mM, Oligo(dt) 0.5µg/µL, Random Primers (*Hexamer*) 50ng/µL, DEPC-H₂O sterile, RT buffer 10x, MgCl₂ 25mM, DTT 0.1M, Rnase OUT 40U/µL, RT Superscript (SS2) 50U/µL, RNAase H (2U/µL). Multi-step thermocycler incubation was performed as described: 65°C 5min, 42°C 90min, 70°C 15min, 4°C 5min. Final step included a thermocycler incubation with RNAase H at 37°C 20min. Both RNA and genomic DNA were assayed spectrophotometrically and visualized through gel-red 0,8-1% TBE1x buffer (*Biotium*) (**Fig E**).

PCR amplification

PCR amplification was performed for cDNA (*Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*) or genomic DNA *target* using a *standard procedure*. A set of primers for 24 overlapping cDNA fragments and mutated exons of gDNA was constructed with Primer 3 *website*. Briefly, PCR reaction mixture consist of cDNA or gDNA (~100ng/µL), primers (5µM), H₂O, HotMasterMix 2.5x in a final of 25µL reaction mixture. Amplification was achieved using the following protocol in thermocycler: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing with 60°C for 1 min, elongation at 70°C for 1 min, then another 10 cycles of further amplification with a final extension step at 70°C for 8 min. After PCR amplification, all PCR products were purified with PCR_{µ96} Millipore microplate on *Vacuum Manifold* with the application of 20-25mmHg pressure. Lyophilized PCR products were resuspended in 26µL of H₂O using a *shaker microplate* (**Fig E**).

Sequencing analysis

Mutation screening was performed using bidirectional DNA sequencing of purified PCR products with the ABI BigDye terminator sequencing kit (*Applied Biosystems*) on the ABI Prism 3130 automatic DNA sequencer (*Applied Biosystems*). Reaction mixture (final volume 10 μ L) for cDNA fragments or DNA included: Primers Fw o Rev 2 μ M (*Invitrogen o TIB*), Buffer Sequencing 5X (*BigDye Terminator V1.1, V3.1*), Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing RR-100, H₂O. Amplification of sequencing reaction was obtained using a *standard* termic profile: 96°C 10sec, 50°C 5sec, 60°C 4min, 4°C ∞ . After bidirectional DNA sequencing, products were purified with *MontageTM Seq₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit* (*Millipore*) on *Vacuum Manifold* with the application of 20-25mmHg pressure. Liophylized sequencing products were then resuspended in 26 μ L of denaturing *Injection Solution* using a *shaker microplate*. Purified sequencing products were then electrophoresed on a *ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Electropherograms were analyzed by Seqscape 4.0 software. Sequences were aligned and compared with the corresponding reference sequence for genomic DNA (*Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*) (**Fig E**).

MLPA analysis (Multiple ligation-dependent probe amplification)

Genomic DNA was purified from peripheral blood leucocytes as previously described. Screening for NF1 single and multi-exon deletions was performed using the *SALSA P081/082 NF1 MLPA assay* (*MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands*), as instructed by the manufacturer (**207**). This assay consists of two reaction mixes containing probes for all constitutive NF1 exons and *reference*. Briefly, genomic DNA of proband was diluted with TE to 5 μ L and heated at 98 °C for 5min. After addition of 1.5 μ L SALSA Probe-mix mixed with 1.5 μ L MLPA buffer, samples were heated for 1 min at 95 °C and then incubated for 16 hrs at 60 °C. Ligation of annealed probes was performed by diluting the samples to 40 μ L with Ligase-65 dilution mix containing Ligase-65 enzyme, and incubation for 15 min at 54 °C. The ligase enzyme was inactivated by heating at 98 °C for 5 min and ligation products were amplified by PCR. 10 μ L of the ligation reaction was added to 30 μ L PCR *buffer*. While at 60 °C, 10 μ L of a buffered solution containing the SALSA PCR-primers, SALSA Enzyme Dilution *buffer* and SALSA Polymerase were added. PCR was for 33 cycles (30 sec at 95°C, 30sec at 60°C and 60sec at 72°C). MLPA products were then loaded onto an *ABI Prism 3130XL Genetic analyzer* and spectrum obtained were analyzed with *Genemapper 3.2 software*. For each sample the average peak areas of NF1 exons and control loci were determined. The average relative peaks areas were calculated by comparing test and control averaged peaks area using the *Coffalyser 6 software* (*MRC Holland*). This program identifies a peak as normal when showing a 0.7-1.3 ratio

with normal controls, deleted when showing a ratio <0.7 and duplicated when showing a ratio >1.3 (**Fig E**).

RESULTS

MENIERE'S DISEASE

Accordingly to many experimental evidence which reported increased oxidative stress levels associated to modified thiolic status and reduced plasmatic antioxidant defences in MD patients (126), our results exhibited a significantly decreased expression levels of thioredoxin reductase (TRX) in peripheral lymphocytes of MD patients (Fig 1) ($p > 0.01$), highlighting the emerging involvement of thioredoxin system in the regulation of oxidoreductive equilibrium and cellular homeostasis (63-64,77-78, 89). Together with increased scientific evidence indicating clear oxidative processes of many biological proteins *target* on the basis of the most important neurodegenerative disorders (1, 4-5, 8-9, 12, 17-18, 36, 130, 132), including systemic diseases such as syndrome of Menieré, our experimental data demonstrated a significantly increase on the carbonyl groups content (DPNH), a crucial biological indicator of oxidative damage of many cellular components including proteins, in lymphocytes of MD patients respectively to healthy individuals (Fig 2) ($p > 0.01$). Amongst the products of lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal (4-HNE) has received considerable attention for its possible contributions to the pathogenesis of several major disorders including cardiovascular, renal and neurodegenerative diseases (18, 96, 136). Examination of HNE levels in lymphocyte samples has shown a significant elevation ($p > 0.01$) of protein-bound HNE in MD patients respect to control subjects (Fig 3). Finally, consistent with the idea of *heat shock system* cytoprotective role at the base of antidegenerative mechanisms, we observed an increased expression of cytoprotective proteins Hsp72 in lymphocytes of MD patients compared to controls ($p > 0.01$) (12, 17-18, 31, 36, 126) (Fig 4). Moreover, it is known that normal auditory function depends on maintenance of the unique ion composition in the endolymph. Hence, carbonic anhydrase in the inner ear has been suggested to play an important role in maintaining the ion concentration and regulating fluids of the inner ear. Consistent with this notion, we report that in MD patients a significant ($p > 0.01$) increase of carbonic anhydrase type II expression occur in comparison with controls levels (Fig 5).

ALZHEIMER'S DISEASE

Thiols, particularly GSH, serve an important role in maintenance of redox balance of cells (2, 69, 217). Consistent with others who showed oxidative stress and altered thiol status in AD brain (231-233), we demonstrated that peripheral lymphocytes from AD patients showed significantly

decreased GSH levels ($p < 0.05$) and corresponding significantly increased GSSG levels ($p < 0.05$) (**Fig 6A,B**). These changes significantly decreased the GSH/GSSG ratio in AD lymphocytes compared with controls (**Fig 6C**, $p < 0.01$). Our laboratory previously demonstrated upregulation of protective proteins in cells exposed to oxidative stress (**234-235**). Consistent with these prior findings, in the present study, we observed an increased expression of both the antioxidant proteins HO-1 (**Fig 7A,B**) and TRXr ($p < 0.01$) (**Fig 8A,B**) in the inferior parietal lobule, a region that showed elevated oxidative and nitrative stress (**232, 236**) of AD brains compared with control brains. The increased expression of these two proteins seemed to be consequent to a strong oxidant environment because the constitutive form of heme oxygenase, HO-2, is not increased but reduced in AD brain (**Fig 9A,B**), and TRXr is not elevated in cerebellum (**Fig 8C,D**), a brain area that is devoid of protein oxidation and amyloid β -peptide-containing *senile plaques* in AD (**96, 99**). Accordingly with the results described for brain, HO-1 expression has been found significantly elevated in AD plasma and lymphocytes compared with control samples (**Fig 10-11A,B**) and total HO activity was found to be significantly elevated (**Fig 11C**). Elevation of HO activity in AD lymphocytes is likely due to increased HO-1 expression (**Fig 11A,B**) occurring in response to a condition of elevated oxidative stress, because we found that HO-2 is not increased but reduced in AD lymphocytes (data not shown). Reactive nitrogen species (RNS) generation is associated with various pathologic events that contribute to the cell and tissue damage accompanying neuroinflammation and degenerative damage of the brain. The latter is continually exposed to both exogenous and endogenous sources of NO and NO derived species. Activated glia secrete RNS products of nitric oxide (NO) metabolism with superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) to form peroxynitrite anion ($ONOO^-$). One of the fastest reactions of $ONOO^-$ is with CO_2/HCO_3^- ($3-5.8 \times 10^4$ M/s at $37^\circ C$). Together with the high concentrations of CO_2 (~ 1.3 mM) and HCO_3^- (~ 25 mM), this reaction is the most probable *pathway* of $ONOO^-$ decomposition *in vivo*. As far as the contribution of nitrative stress in AD, **Fig 12** shows that NOS-2 expression and activity are significantly elevated in AD lymphocytes compared with controls. Furthermore, because peroxynitrite can, in further reactions, bind to tyrosine residues (**1, 16**), analysis of AD plasma and lymphocytes indicated elevated 3-nitrotyrosine levels compared with control (**Fig 13A,B**). As a corollary of the concept that during stressful conditions, proteins and lipids can undergo oxidative modifications (**234-235**), in **Fig 13C,D,E,F**, we show that protein carbonyls (assessed immunochemically by detecting the hydrazone product of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenylhydrazine) (**237**) as well as HNE, this latter considered a *marker* of lipid peroxidation, are elevated in AD plasma and lymphocytes compared with control. We have previously demonstrated in brain cells that during nitrative stress, the induction of cytoprotective Hsp72 occurs. In view of the evidence indicating that thioredoxin

reductase is functional for induction of HO-1 under conditions of nitrate stress (238), we investigated in our experimental conditions the expression of other Hsps, such as Hsp72 and Hsp60, as well as TRXr. As shown in **Fig 14A,B**, both Hsp72 and Hsp60 are significantly elevated in AD lymphocytes compared with control, whereas TRXr is elevated either in AD lymphocytes or plasma, compared with control (**Fig 15A,B**).

AGING

When different brain regions were examined for thiols, total SH groups and GSH levels, as a function of age, all brain regions but the cerebellum showed a decrease in total SH groups (**Fig 16**) as well as GSH in senescent compared with aged animals (**Fig 17A**). Conversely, the level of oxidized glutathione (GSSG) increased in senescent compared with aged rats (**Fig 17B**). To test the hypothesis that these changes of redox status in the aging brain would trigger a *heat shock response* (1, 12, 17), we measured the expression of inducible Hsp70 (Hsp72) and HO-1 in different brain regions in aged and senescent rats. **Figs 18-19A** showed that protein expression of Hsp72 and HO-1 was significantly elevated in senescent compared with aged rats in all brain regions examined. Representative *Western blots* of samples from the hippocampus are shown in **Figs 18-19B**, respectively. A positive correlation ($r=0.87$) between the decrease in GSH and the increase in Hsp72 expression was observed in all brain regions examined during aging. This is consistent with the notion that the thiol redox switch acts as a *signal* for induction of cytoprotective genes modulating *cellular stress tolerance* (66, 69, 72, 75, 125). We also evaluated levels of expression of Hsp90, thioredoxin (TRX) and thioredoxin reductase (TRX-Red) in the brains of aged and senescent rats. Senescent rats showed, compared with aged rats, a significant decrease of Hsp90 in the cortex and hippocampus, an increase in the SN, but no significant changes were found in the septum, striatum, and cerebellum (**Fig 20A**). These changes were associated with a decrease in the thioredoxin protein expression in all brain regions, particularly in the substantia nigra and in the hippocampus, except in the cerebellum (**Fig 21A**). Consistently, TRX-Red expression was elevated in senescent rats compared with aged rats in all brain regions examined (**Fig 22A**). Representative *Western blot* analysis of Hsp90, TRX and TRXRed proteins of samples from hippocampus are shown in **Figs 20-21-22B**, respectively. One measure of oxidative stress in brain aging is protein oxidation (231-232). However, lipid peroxidation, indexed by HNE, also can occur in the brain under oxidative stress (101, 231). HNE, formed from arachidonic acid or other unsaturated fatty acids after free radical attack, binds by *Michael addition* to proteins, particularly at cysteine, histidine or lysine residues. Examination of HNE levels in different brain regions in aged and

senescent rat brains showed elevation of protein-bound HNE in all brain regions, except in the cerebellum, consistent with higher level of GSH found in the same region (**Fig 23A**). In addition, a significant increase in the amount of protein carbonyls ($p < 0.005$), an *index* of protein oxidation (**239**), was found in senescent compared with aged animals in all brain regions examined, but not in the cerebellum, confirming HNE data. Representative *Western blot* analysis of HNE and protein carbonyls of samples from the hippocampus are shown in **Figs 23C and D**, respectively.

STUDY *IN VITRO*: CYTOPROTECTIVE EFFECT OF CARNOSINE (CRNS) AND CARNOSINE-TREHALOSE (CRNS-T) ON HUMAN NEUROBLASTOMA CELL CULTURE (SH-SY5Y) TREATED WITH PEROXYNITRITE DONOR (SIN-1)

To test the antioxidant potential of carnosine (CRNS) and carnosine-trehalose (CRNS-T) compounds in protecting against cytotoxic agents, such as SIN-1, as superoxide (O_2^-) and NO generator, we performed study *in vitro* with human neuroblastoma cell culture (SH-SY5Y). *Cell viability* studies with MTT assay demonstrated that undifferentiated human SH-SY5Y cell treated for 4 hrs with SIN-1 (1.0mM), a powerful peroxynitrite donor (**62**), produced a significant decrease of *cell viability* compared to untreated cell and exposed cell to different concentrations of carnosine (300 μ M, 1.0mM, 10mM) or carnosine-trehalose (1.0mM) (**Fig 24**). The significant decrease on *cell viability* was prevented by pretreatment (-1 hr) with CRNS or CRNS-T in combination with SIN-1 at the same concentration (**Fig 24**). **Fig 25** showed cytotoxic effects generated from exposure of undifferentiated human SH-SY5Y cell to nitrosative agent SIN-1 (1.0mM) for 4 hrs compared to untreated neuroblastoma cell or treated with different concentration of carnosine (300 μ M, 1.0mM, 10mM) or carnosine-trehalose (1.0mM), estimated as a reduction of neuronal *cell viability*. Treatment of human SH-SY5Y cell with CRNS (300 μ M, 1.0mM, 10mM) or CRNS-T (1.0mM), added 6 hrs prior to addition of SIN-1 (1.0mM), was able to prevent the decrease in *cell viability* promoted by this neurotoxic agent alone (**Fig 25**). Cytotoxicity of undifferentiated human SH-SY5Y cell was also induced by nitrosative damage mediated by the action of SIN-1 (1.0mM) treatment for 7 hrs (**Figs 26-27**) (**62**). Moreover, our experimental data demonstrated a cytoprotective effect induced by pretreatment of CRNS (300 μ M, 1.0mM, 10mM) or CRNS-T (1.0mM), added respectively 1 or 6 hrs prior to addition of SIN-1 (1.0mM), abolishing its oxidant effect and producing a significant restoration of neuronal *cell viability* (**Figs 26-27**) (**34, 39-40, 62**). According to previous studies which reported deleterious oxidative challenge mediated by particular NO donor, including oxidation of biomolecules, nitration of protein and processes of lipid peroxidation (**62, 125, 240-241**), our results showed a significant decrease of undifferentiated

human SH-SY5Y *cell viability* treated with SIN-1 (1.0mM), at different time of exposure (4, 7, 12, 24 hrs) (**Fig 28**). Particularly, **Fig 29** underlined a gradual increase, dose-dependent manner, of carbonyl content (DPNH) expression levels in undifferentiated human SH-SY5Y cell exposed to SIN-1 treatment (0.5mM, 1.0mM, 2.0mM), at different time of exposure (7, 24 hrs) and with the maximum effect at 24 hrs, compared to untreated neuronal cell. Moreover, **Fig 30** showed a significant increase in the 4-hydroxynonenal (4-HNE) expression levels of undifferentiated human SH-SY5Y cell exposed to different concentration of SIN-1 (0.5mM, 1.0mM, 2.0mM) and time (7, 24 hrs), with a high rate of immunoreactivity for 4-HNE at 24 hrs from SIN-1 treatment (1.0mM and 2.0mM). Efficient functioning of maintenance and repair process seems to be crucial for both survival and physical quality of life. This is accomplished by a *complex network* of the so-called longevity assurance processes, which are composed of several genes termed *vitagenes* (**12, 17-18, 31, 36, 126**). The involvement of the HO *pathway* in antidegenerative mechanisms has been demonstrated. As reported by Motterlini et al. (**62**), our results demonstrated a remarkable elevation in the HO-1 expression levels of SH-SY5Y cell after SIN-1 treatment at different dose (0.5mM, 1.0mM, 2.0mM), especially after 24hrs of treatment at 2.0mM of SIN-1 concentration (**Fig 31**). Finally, **Fig 32** showed a significant induction in the Hsp72 levels of undifferentiated SH-SY5Y cells after 7hr of SIN-1 treatment (1.0mM) in presence and absence of CRNS at different concentrations (300µM, 1.0mM, 10mM) and a gradual decrease of those protein levels after pre-treatment with CRNS (-1h) (**12, 17-18, 31**). These findings supported a crucial role played by antioxidant agents, such as carnosine, on the modulation of endogenous molecular mechanisms defence mediated by *heat shock pathway* against cytotoxic insults (**34**) (**Fig 32**).

MOLECULAR-GENETIC STUDY OF NF1 GENE IN PEDIATRIC CLINIC CASES

We screened the entire coding region of NF1 transcript in a total of 50 patients by amplification PCR and direct sequencing of 24 cDNA overlapping fragments (**205**). Negative clinic cases for point mutations were tested with another molecular method based on MLPA technique (**207**). Clinical features of the study population were typical with respect to NF1 phenotype and almost all patients fulfilled the *NIH Consensus Criteria* (**157**). In 33 patients molecular analysis has been completed detecting 21 different heterozygous mutation of the NF1 gene, including aberrant *splicing* mutation, *microdeletion in frame* and *frameshift*, *microinsertion frameshift*, *missense* and *nonsense* mutation and finally genomic deletion. These mutations were distributed across the gene, ranging from exon 1 to 57, resulting in neurofibromin molecules of different length and potentially affecting function in differently ways. These mutation was subsequently confirmed in genomic

DNA from the patient's lymphocytes. At the present time, in other 17 NF1 clinic cases direct sequencing is in progress. Genetic-molecular analysis of RNA extracted by peripheral blood lymphocytes indicated the presence of two premature termination due to heterozygous NF1 gene substitution at codons **2081 (p.Y2081X)** and **1724 (p.K1724X)**, respectively (**Figs 34-35**). Many disease-causing *splicing* mutations described in the literature produce changes in splice sites (SS) or in exon-regulatory sequences. The delineation of these *splice* aberrations can provide important insights into novel regulation mechanisms. Intronic variations analyzed in this study clearly altered specific NF1 genomic region inclusion/exclusion levels. In particular, mutation of the intronic 23 acceptor site (**IVS23-2delA, c.3114-2delA**) had strongest effect, resulting in total exon 24 *skipping* of NF1 gene associated to an altered transcript (**Fig 36**). A small subset of point mutations in the NF1 gene that affects the correct mRNA *splicing* (**199, 205, 213**) included single nucleotide changes in sequences deep inside exon creating either a novel donor or acceptor site that, in conjunction with a nearby *cryptic splice* counterpart, defines a new *cryptic* exon that *spliceosome* includes into mature *messenger*. In fact, **Fig 37** showed a typical *splice* mutation, reported in literature (**242**), characterized by a single nucleotide change (**c.1885G>A**) in sequences deep inside exon 17 disrupting canonical *splice* sequences and introducing a new *cryptic* exon that *spliceosome* includes into mature *messenger*. Finally, another *splice* mutation clinic case concerned heterozygous NF1 mutation in the acceptor site of exon 11 (**IVS10-2A>G**) which determined the formation of an aberrant transcript and the deletion *in frame* of the first five codons of NF1 exon 11 (**243**) (**Fig 38**). In 5-10% of patients, neurofibromatosis type 1 (NF1) results from microdeletions that encompass the entire NF1 gene and a variable number of *flanking* genes. Our comprehensive NF1 gene mutation screen protocol allowed to identify in one clinic case a heterozygous NF1 microdeletion *in frame* (**c.7097-7101delAACTTT**) which caused the pathogenetic deletion of two aminoacids (**p.2366-2367Asn-Phedel**) (**Fig 39**) (**244**) and in another case a microdeletion *frameshift* of a single nucleotide (**c.4577delG**) associated to the formation of a *stop* codon and truncated protein (**p.1525fs1552X**) (**Fig 40**) (**189, 191, 193**). Characterization of mutational spectrum of NF1 gene in neurofibromatosis patients included also pathogenetic insertion mutation. A mutation analysis of total RNA extracted from the patient's lymphocytes identified a *frameshift* heterozygous microinsertion mutation of a single nucleotide (**c.4441insT**) (**Fig 41**) and a pathogenetic 4bp *frameshift* heterozygous insertion mutation (**c.2930-2931insATTC**) (**Fig 42**) associated, in both clinic cases, to the formation of a *stop* codon and truncated protein (**p.1480Aspfs1508X, p.Gly978Phefs982X**) (**205**). Finally, sequencing analysis of mRNA and genomic DNA detected two neomutation *missense* (**c.41T>G p.V14G, c.8332G>A p.V2778I**) (**Figs 43-44**). Study of proteic alignment with *Polyphen* indicated pathogenetic and possibly

damaging NF1 gene mutation characterized by the substitution of aminoacids Valine-Glycine (**Fig 43**). While the substitution of aminoacids Valine-Isoleucine was reported as benign mutation, probably for similar chemical properties of the two aminoacids Valine-Isoleucine involved in the heterozygous *missense* mutation of NF1 gene (**Fig 44**). Single and multi-exon copy number changes were found in approximately 4% of patients with NF1. To evaluate the frequency of genomic rearrangements in the NF1 patient, who were negative for NF1 point mutations or small insertions/deletions, we used MLPA technique to estimate the contribution of single and multi-exon copy-number changes to the NF1 mutation spectrum in the NF1 clinic cases (**207**). Particularly, our results identified a multi-exon mutation compatible to a genomic deletion of entire NF1 gene in the proband (index case) and his parent respect to normal individual (**Fig 45**) and a single-exon copy-number changes represented by the deletion of NF1 exon 1 in another patient with Neurofibromatosis type 1 respect to control (**Fig 46**) (**207, 214**).

DISCUSSION

Oxidative stress has been implicated in mechanisms leading to neuronal cell injury in various pathological states of the brain, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and aging (**1, 3, 8, 12, 36, 48, 66**). The brain has a large potential oxidative capacity but a limited ability to counteract oxidative stress (**1, 3**). Within the cell, reactive oxygen species (ROS) are physiologically present at minimal concentration as by-products of aerobic metabolism as well as second *messengers* in many *signal transduction pathways* and, in normal conditions, there is a steady-state balance between pro-oxidants and antioxidants which is necessary to ensure optimal efficiency of antioxidant defenses (**3, 5, 12, 31, 65, 77**). However, when the rate of free radical generation exceeds the capacity of antioxidant defenses, oxidative stress ensues with consequential severe damage to DNA, proteins and lipids (**1, 3, 7, 10, 16, 21**) (**Fig 1A**). The predominant molecular symptom of aging is the accumulation of altered gene products. Moreover, several conditions including protein, lipid or glucose oxidation disrupt redox homeostasis and lead to accumulation of *unfolded* or *misfolded* proteins in the aging brain. Alzheimer's and Parkinson's diseases or Friedreich ataxia are neurological diseases sharing, as a common denominator, production of abnormal proteins, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, which contribute to the pathogenesis of these so called "*protein conformational diseases*" (**102-103, 108, 232-234, 236, 245-246**). Aging is characterized by a progressive deterioration of physiological functions and metabolic processes. In aging and in diseases associated with the elderly, such as Alzheimer's or Parkinson's, the loss of cells in vital structures or organs may be related to several factors, among which the production of ROS and/or RNS by mitochondria is a common denominator, leading to DNA damage, apoptosis and cell death. Although the term "*aging*" is generally understood in broad terms, the aging process is extremely complex and multifaceted (**247-249**). Increasing evidence supports the notion that reduction of cellular expression and activity of antioxidant proteins and the resulting increase of oxidative stress are fundamental causes in the aging processes and neurodegenerative diseases (**1, 9, 12, 34, 96, 249**). Experimental evidence indicates that increased rate of free radical generation and decreased efficiency of the reparative-degradative mechanisms, such as antioxidant defense and proteolysis, are both factors that primarily contribute to age-related elevation in the level of oxidative stress and brain damage (**1, 9, 18, 27, 31, 45, 235, 248**). The central nervous system has evolved the conserved mechanism of *unfolded* protein response to cope with the accumulation of *misfolded* proteins. As one of the main intracellular redox systems involved in neuroprotection, the *vitagene system* is emerging as a *neurohormetic* potential *target* for novel cytoprotective interventions (**15, 17-18**). *Vitagenes* encode for

cytoprotective *heat shock* proteins (Hsp) Hsp70 and heme oxygenase-1, as well as thioredoxin reductase. Nutritional studies show that ageing in animals can be significantly influenced by dietary restriction **(18, 66)**. Thus, the impact of dietary factors on health and longevity is an increasingly appreciated area of research **(11, 15, 17, 19)**. Reducing energy intake by controlled caloric restriction or intermittent fasting increases lifespan and protects various tissues against disease. Genetics has revealed that ageing may be controlled by changes in intracellular NAD/NADH *ratio* regulating sirtuin, a group of proteins linked to aging, metabolism and *stress tolerance* in several organisms **(18, 250)**. Recent findings suggest that several phytochemicals exhibit biphasic dose responses on cells with low doses activating *signaling pathways* that result in increased expression of *vitagenes* encoding survival proteins, as in the case of the Keap1/Nrf2/ARE *pathway* activated by curcumin **(33, 219, 251)**. Consistently, the neuroprotective roles of dietary antioxidants including curcumin, acetyl-L-carnitine and carnosine have been demonstrated through the activation of these redox-sensitive intracellular *pathways* **(2, 17, 19, 31, 33, 35-38, 219, 251)**. Although the notion that stress proteins are neuroprotective is broadly accepted, still much work needs to be done in order to associate neuroprotection with specific *pattern* of stress responses. In this study the importance of *vitagenes* in the cellular stress response and the potential use of dietary antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disorders, aging and systemic pathologies is discussed **(12, 17, 251)**. The strong evidence that the *vitagene network* operates as a defense system in the brain during oxidative and nitrosative stress open new perspectives in the treatment of neurodegenerative disorders and other age-related diseases **(2, 12, 14, 31, 249, 251)**. Therefore, the nutritional manipulation of endogenous cellular defense mechanisms represents an innovative approach to therapeutic intervention in neurodegeneration, and propose potential novel therapeutic strategies relying upon the simultaneous activation of cytoprotective genes of the cell life program and down-regulation of proinflammatory and pro-oxidative genes involved in programmed cell death **(11, 15, 17-18)**. Although the term *vitagene* was first proposed to indicate speculatively the existence of genes as opposed to gerontogenes, the first evidence based notion identifying *vitagenes* with stress responsive genes such as HO-1, Hsps and TrxR have been provided by our group **(251) (Fig 1A)**. In the present study showed strong evidence that a functional interplay between stress response genes is important for *cell stress tolerance*, highlighting compelling reason for a renewed effort to understand the central role of this most extraordinary defense system in biology and medicine. In this respect the concept of *hormesis* has been receiving greater interest in the biomedical and toxicological research communities over the past decade **(14-15, 17-18, 31)**. In the fields of biology and medicine *hormesis* is defined as an adaptive response of cells and organisms to a moderate (usually intermittent) stress. Recent findings have elucidated the *cellular signaling*

pathways and molecular mechanisms that mediate *hormetic* responses which typically involve enzymes such as kinases and deacetylases and transcription factors such as Nrf2 and NF-KB. As a result, cells increase their production of cytoprotective and restorative proteins including growth factors, phase 2 and antioxidant enzymes and protein *chaperones* (14-15, 17-18, 251). A better understanding of *hormesis* mechanisms at the cellular and molecular levels is leading to and to novel approaches for the prevention and treatment of many different diseases (14-15, 17-18, 31). The several lines of evidence supports also the notion that stimulation of various maintenance and repair *pathways* through exogenous intervention, such as *mild stress* or compounds targeting the *heat shock signal pathway*, such as polyphenols, L-acetyl-carnitine and carnosine may have biological significance as a novel approach to delay the onset of various age-associated alterations in cells, tissues and organisms (2, 17, 19, 31, 33, 35-38, 219, 251). Among antioxidants, carnosine (β -alanyl-l-histidine, AH) has been described as a forgotten and enigmatic dipeptide (252). In recent years, the occurrence of AH and its analogues homocarnosine (gaminobutyryl-l-histidine) and anserine (β -alanyl-l-methyl-l-histidine) in the CNS and their age-related alterations suggested a therapeutic potential in neurodegenerative diseases (34-35, 37-38, 42, 253). Carnosine has been shown to be neuroprotective because of its capacity to counteract both oxidative and nitrosative stress related to several pathologic conditions (35, 37-39, 42, 254). In addition to the well-documented antioxidant, antiglycating, aldehyde-scavenging and toxic metal ion-chelating properties of carnosine, its ability to influence the metabolism of altered polypeptides, whose accumulation characterizes the senescent phenotype, also should be considered (34, 37-38, 42, 252). The free radical theory of aging, based on the pioneer works of *Harman* (255-256), considers that aging is caused by the continuous loss of molecular fidelity, with inactivation of biologically essential macromolecules and subcellular structures, due to chemical modifications produced by reactions mediated by oxygen and nitrogen free radicals. A further refinement of this hypothesis is the mitochondrial theory of aging, as mitochondria are considered *pacemakers* of tissue aging, owing to their continuous production of superoxide radical and of nitric oxide (NO) and to the mitochondrial sensitivity to free radical-mediated oxidative damage (48, 257-258). In the present study, we show that oxidative stress increases during aging in the brain, as revealed by high levels in lipid and protein oxidation *markers*, such as hydroxynonenals and protein carbonyls. These changes were particularly significant in the brain regions of hippocampus and SN, and to a lesser extent in the cortex, septum, and striatum, whereas the cerebellum exhibited high resistance to these oxidative changes. Relevant to theory of aging, this is consistent with experimental findings showing that the hippocampus is atrophied during aging and in some neurologic diseases, all processes associated with memory and cognitive impairments (48). We found that the level of

Hsp72 in senescent rats was significantly higher than that in aged rats, with the highest profile of expression in the hippocampus and SN, followed by the septum, cerebellum, cortex and striatum (34). Similar *patterns* of expression as a function of aging were observed when testing for HO-1, indicating that these cytoprotective genes work together in the setting of *cellular stress response* (34). In addition, we show, also in aging brain, an increased expression of thioredoxin reductase, the latter possibly related to the decreased thioredoxin protein expression measured in all brain regions investigated, confirming the generally accepted role of the redox state as a signal for the activation of protective responses, such as the synthesis of *heat shock* proteins (34). Finally, we found, in senescent rats, compared with aged controls, a significant decrease of Hsp90 expression in the brain regions of the hippocampus and in the cortex, whereas in the SN, Hsp90s were upregulated (34). Taken together, these results suggest that the expression of Hsps increases with age and occurs as a consequence of redox state perturbation and this may have a role to limit the deleterious consequences associated with protein denaturation (1, 3, 5, 8, 12). Relevant to this, we devoted our recent interest to the development of nutritional interventions able to *target* redox-sensitive cytoprotective genes, called *vitagenes*, involved in the homeostatic control of so-called longevity-assurance processes (2, 123, 251). The burden of chronic neurodegenerative diseases on our society is expected to continue to increase, largely due to the aging of the population. Whereas no satisfactory treatments are yet available, it is timely to think about implementing prevention measures that harness the intrinsic cytoprotective mechanisms described in this study. Exploiting the ability of small molecules, many of which are dietary agents and therefore of presumed low toxicity, to mimic various stimuli that lead to the up-regulation of these intracellular defenses, is an exciting area for future development (11, 36).

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder with cognitive and memory decline, speech loss, and personality changes (96). From a neuropathologic point of view, AD is characterized by intracellular *neurofibrillary tangles* (NFTs), extracellular *senile plaques* (SPs), the central core of which is amyloid β -peptide (A β) derived from amyloid precursor protein (APP) metabolism and synaptic loss. AD brain has been reported to be under oxidative stress, which may play an important role in the pathogenesis and progression of AD (9, 69, 96, 99, 259). Oxidative stress increases the frequency of hydroxyl radical-induced autoxidation of unsaturated membrane lipids. Reactive aldehydes, resulting by metal ion-mediated fragmentation of the lipid hydroperoxides can modify proteins through alteration of protein-protein interactions and intermolecular *crosslinking*. Age modifications and oxidative stress mechanisms can synergistically accelerate protein damage (3, 9, 219, 235, 239). Several other potential sources of oxidative stress

were considered in the pathogenesis of AD. First, the concentration of iron, a potent catalyst of oxyradical generation, is increased in NFT-bearing neurons (96, 260). Second, increased concentrations of iron would result in increased protein modifications, which are catalyzed by metal ions and reducing sugars (261). Third, microglial cells are activated and increased in AD and represent a major source of free radicals (96). Fourth, the increased lipid peroxidation and the resulting membrane disturbances, which are observed in degenerating neurons and neurites, are expected to lead to an influx of calcium, which causes destabilization of cytoskeleton and activation of specific degradative enzymes (231, 262). A decrease of complex IV activity has been reported in the cerebral cortex of individuals who died of AD (96). Although the exact mechanism for this loss of activity is not clear, it is known that this enzyme complex is particularly susceptible to oxidative damage (263). In addition, evidence now suggests that NO metabolism is affected in AD. The glial-derived factor, S-100- β , which is overexpressed in many pathologic conditions, causes induction of iNOS in astrocytes associated with NO-mediated neuronal cell death in a co-culture system (1, 50, 96). Furthermore, amyloid- β is reported to activate NOS in a substantia nigra/neuroblastoma hybrid cell line (96). Analysis of *postmortem* material has revealed in AD brain the presence of nitrotyrosine, as result of the reaction of ONOO⁻ and tyrosine residues in protein, which was not detectable in age-matched control brains (264). Despite evidence for activation of NO metabolism in AD, analysis of the CSF nitrite+nitrate (stable end products of NO degradation) concentration revealed levels in AD patients comparable to those in controls (265). Although this observation does not dismiss a role for NO/ONOO⁻ in the etiology of AD, it implies that formation of RNS occurs at a level that not necessarily leads to an increase in CSF RNS concentration. Amyloid β -peptide, the principal component of *senile plaques* and the major neuropathologic *hallmark* of AD, is considered to be central to the pathogenesis of AD. β -Amyloid is a 40- to 42-amino acid peptide that accumulates in the *neuritic plaques* in AD. The AD brain is under extensive oxidative stress (9, 96-97, 99, 101). These two observations were joined by a model to potentially account for neurodegeneration in AD brain: the β -amyloid-associated free radical oxidative stress hypothesis of brain cell death in AD. In this model, β -amyloid-associated free radicals initiate lipid peroxidation, protein oxidation, reactive oxygen species (ROS) formation, intracellular and mitochondrial Ca²⁺ accumulation and eventual death of neurons (1, 101-103). A prediction of this model is that the antioxidant vitamin E should prevent or modulate these β -amyloid-induced effects on neurons (121, 123). In agreement with this model, this free radical *scavenger* was shown to block amyloid- β -initiated lipid peroxidation in cortical synaptosomes (266). Further, protein oxidation induced by β -amyloid in astrocyte cultures and assessed by increased protein carbonyl content was abrogated by the more soluble form of vitamin E, *trolox* (96, 123). Increasing evidence supports the role of

reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in the pathogenesis of AD (**1, 5, 9**). NO has three major role in biologic systems, in that it can be (a) protective, as it has antioxidant properties and can also block expression of adhesion molecules; (b) regulatory, in that it can alter vascular tone and has a role in cell *signaling*, and (c) deleterious, in that it can react with superoxide to form oxides of nitrogen that can cause DNA damage, lipid peroxidation and nitration of proteins, thus resulting in changes in three-dimensional structure of proteins and altered activities in important intracellular enzymes. Because of these multiple roles of NO in the CNS, it is not surprising that in certain models of inflammation, a decrease in NO levels can be deleterious (**1, 16, 48, 50-51, 258**). Therefore pharmacologic modulation of NOS activity in disease states such as AD must be specifically targeted, both to the specific isoforms of NOS and also to the various cell types involved. Moreover, in addition to manipulation of iNOS activity, certainly a potential role exists for pharmacologic modulators of peroxynitrite metabolism in AD. For example, it has recently been demonstrated that uric acid (a *scavenger* of peroxynitrite) and FeTMPS (a catalyst specific for the decomposition of ONOO⁻) resulted in inhibition of inflammatory changes, decreased blood-brain barrier disruption, and less demyelination in mouse models of EAE (**267**). In this study, we demonstrated in brain, peripheral lymphocytes and plasma that oxidative and nitrate stress is evident in AD compared with control subjects. Similar to what is demonstrated in the substantia nigra of Parkinson disease subjects, in which nigral neurons containing cytoplasmic *Lewy bodies* exhibited in their proximity maximal HO-1 immunoreactivity (**268**), here we provide strong evidence that HO-1 expression is elevated in AD plasma and AD lymphocytes compared with control and total HO activity is correspondingly elevated. Elevation of HO-1 expression and activity in AD is likely in response to elevated oxidative stress. This finding is consistent with evidence suggesting that the HO-1 gene is redox regulated and, similar to other antioxidant enzymes (**8, 19, 22, 251**), this occurs because it contains in its *promoter* region the antioxidant responsive element (ARE). Therefore, the HO-1 gene undergoes a redox sensitive modulation by transcription factors recognizing specific binding sites within the *promoter* and distal *enhancer* regions of the HO-1 gene (**8, 19, 22**), such as those responsive to Fos/Jun (activator protein-1 (AP-1)), nuclear factor-kB (NF-kB) and the more recently identified Nrf2 proteins (**8, 12, 19, 22, 96**). In addition, heme oxygenase-1 is rapidly upregulated by oxidative and nitrosative stresses, as well as by glutathione depletion (**66, 69, 72-73**). An intracellular redox regulator that has been shown to be important for the regulation of redox-sensitive transcription factors is thioredoxin (TRX) (**63-64, 78-79**). When reduced, TRX can oxidatively reactivate inactive transcription factors such as Jun, Fos, AP-1, redox factor-1 (ref-1) and Nrf-2 (**77**). TRX is usually located in the cytosol, but it translocates into the nucleus in response to various stimuli associated with oxidative stress. TRXr is a flavoprotein that

catalyzes the reduction of oxidized thioredoxin in a NADPH dependent manner and contains a selenocysteine residue near the *C-terminus* (**63**). TRXr plays an important role in protecting against oxidative stress and in regulating cell growth and cell death. Both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that TRX and TRXr have protective roles against cytotoxicity mediated by the generation of ROS (**63-65, 74, 78**). Notably, amyloid- β peptide (1-42) *in vitro* and *in vivo* can replicate many of the oxidatively modified proteins found in AD brain (**9, 101, 108, 232-233, 236**). In addition, an *antisense* oligonucleotide directed against APP leads to loss of amyloid- β -peptide (1-42), an effect associated with a significant reduction in the level of protein carbonyls for specific proteins, such as aldolase and thioredoxin peroxidase in aged mouse brain (**269**). By extending our previous findings, we demonstrated in brain of AD patients a significant increase in the expression of *vitagenes* HO-1, thioredoxin reductase (TRXr) and Hsp60, associated with a decrease in the expression of HO-2. Parallel changes were observed in AD lymphocytes, in which a significant increase in the expression of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) was associated with that of the HO-1, Hsp70 and TRXr. Brains of AD patients undergo many changes, such as disruption of protein synthesis and degradation, classically associated with the *heat shock response*, which is one form of stress response (**96**). *Heat shock proteins* are proteins serving as molecular *chaperones* involved in the protection of cells from various forms of stress. Given the broad cytoprotective properties of the *heat shock response*, strong interest now exists in discovering and developing pharmacologic agents capable of inducing the *heat shock response* (**12, 17-18, 31, 36, 126**). Increasing interest has been focused on identifying dietary compounds that can inhibit, retard, or reverse the multistage pathophysiologic events underlying AD pathology. AD involves a chronic inflammatory response associated with both brain injury and β -amyloid-associated pathology. All of this evidence suggests that stimulation of various repair *pathways* by *mild stress* has significant effects on delaying the onset of various age-associated alterations in cells, tissues and organisms (**14-15**). Spices and herbs contain phenolic substances with potent antioxidative and chemopreventive properties and it is generally assumed that the phenol moiety is responsible for the antioxidant activity (**12, 33, 219**). In particular, curcumin, a powerful antioxidant derived from the curry spice turmeric, has emerged as a strong inducer of the *heat shock response* (**12, 33, 219**). Supplementation of the naturally occurring antioxidant could be an alternative, nutritional approach to reduce oxidative damage and amyloid pathology associated with AD (**12, 18, 251**), outlining the importance of the *vitagene system* as a *targets* for novel cytoprotective strategies useful to alleviate the neurologic impairments associated with neurodegenerative damage present in AD and other oxidative stress-related brain diseases (**1, 12, 17**).

Classically, the tetrad of symptoms-episodic vertigo, fluctuating sensorineural hearing loss, tinnitus, and ear blockage-associated with the histopathological correlate endolymphatic hydrops has been diagnosed as Meniere's disease (MD) **(270-271)**. The cause of Meniere's disease remains unclear, although numerous causative factors have been considered in the pathogenesis of related cochleovestibular dysfunctions. Specifically, key etiological agents that have been identified as playing a role in the clinical course of tinnitus (e.g., noise exposure, stress) may serve as “*triggers*” or stressors (or both), resulting in interference in normal biochemical and physiological function of sensorineural structures in the inner ear or in neural structures in the brain. Endolymphatic hydrops is an important histopathological hallmark of Meniere's disease **(126, 130)**. Experimental data from human temporal bones as well as animal models of the disorder have generally failed to determine the mechanism by which endolymphatic hydrops or related pathology causes hearing loss. Hair cell and spiral ganglion cell counts in both human and animal case studies have not, for the most part, shown severe enough deterioration to explain associated severe sensorineural hearing loss **(126)**. However, a limited number of detailed ultrastructural studies have demonstrated significant reductions in dendritic innervation densities, raising the possibility that neurotoxicity plays an important role in the pathology of Meniere's disease as well as experimental endolymphatic hydrops **(131, 272)**. The major pathophysiological alterations underlying the tetrad of inner-ear symptomatology, otherwise diagnosed as Meniere's disease, has also been associated clinically with perfusion asymmetries in brain, identified by nuclear medicine brain imaging (single-photon emission computed tomography [SPECT] of brain), and reflects an interference in homeostasis in the blood-brain labyrinth or blood-brain barriers, with a resulting secondary endolymphatic hydrops **(126, 273)**. Increasing evidence suggests that oxidative stress is involved in the development of endolymphatic hydrops and that cellular damage and apoptotic cell death might contribute to the sensorineural hearing loss found in later stages of MD **(136, 274)**. Oxidation-reduction (redox) based regulation of gene expression appears to be a fundamental regulatory mechanism in cell biology. This basic information has been exploited to develop novel strategies in clinical therapeutics. All living cells are involved in reduction-oxidation (redox) activities that are essential to cellular function. Thus, higher rates of reactive oxygen production may occur when the redox state of the cell becomes more negative, a process termed reductive stress that may originate in the cytosol or in the mitochondrial compartment **(1, 3, 6)**. To minimize adverse cellular effects resulting from constitutive or excessive exposure to reactive oxygen, most cells have an elaborate defense system that includes a broad spectrum of chemical and enzyme scavengers for the oxidizing radicals and electrophiles. GSH is an integral oxidant *scavenger*, reacting as either a one-electron donor to radicals or a two-electron donor to electrophiles and occurs in all mammalian cell types **(61, 66-67,**

69-71). Protein thiols play a key role in redox sensing and regulation of cellular redox state is a crucial mediator of multiple metabolic, *signaling* and transcriptional processes (**275**). Under optimal conditions long-term health protection is accomplished by protein homeostasis, a highly complex *network* of molecular interactions that balances protein biosynthesis, folding, translocation, assembly/disassembly, and clearance. Protein quality control is a critical feature of intracellular homeostasis (**249, 276**). The ability of a cell to counteract stressful conditions, also known as *cellular stress response*, requires the activation of pro-survival *pathways* as well as production of molecules endowed with anti-oxidant and anti-apoptotic activities, which is under control of protective genes called *vitagenes* (**12, 17-18, 31, 36, 126**). Generally, molecular *chaperones* help hundreds of *signaling* molecules to keep their activation-competent state and regulate various *signaling* processes ranging from *signaling* at the plasma membrane to transcription. Besides these specific regulatory roles, recent studies have revealed that *chaperones* act as genetic *buffers* stabilizing the phenotypes of various cells and organisms (**16, 18, 249, 251**). *Chaperones* may uncouple protein, membrane, organelle and transcriptional *networks* during stress, which gives the cell additional protection. The same *networks* are preferentially remodeled in various diseases and aging, which may help us to design novel therapeutic and antiaging strategies (**18, 36**). Among the cellular *pathways* involved in the so called “*programmed cell life*” conferring protection against oxidative stress, a key role is played by the products of *vitagenes* (**1, 18, 36**). These include members of the *heat shock protein* (Hsp) family, such as Hsp72 and the thioredoxin/thioredoxin reductase antioxidant system (**1, 18, 36, 63-64**). In this study we tested the hypothesis that neurotoxicity is an important primary mediator of injury in Meniere’s disease and may be reflected in measurable increases in *markers* of *cellular stress response* and oxidative stress in the peripheral blood of patients with Meniere’s disease. The results of our study are in agreement with the first report showing that free-radical generation might contribute to the ototoxicities of several chemical agents as demonstrated utilizing electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry to detect directly ototoxicant-induced reactive oxygen species formation in cochlear tissue (**277**). The spectra obtained were consistent with the the proposal that various ototoxic agents are able to induce oxidative stress thus providing a plausible mechanism by which these ototoxic insults *target* cochlear tissues and cause auditory dysfunction (**277**). Our finding of increased expression of Hsp70, associated with significant changes in the systemic redox status as the reduction in the expression of Trx indicate, are relevant to the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of Menieré disease. Although the scientific evidence for the cause of MD has not been sufficiently established, in general, the *stress response* appears to increase the expression of *heat shock* proteins in cells (**278**). In this study we tested the hypothesis that neurotoxicity is an important primary

mediator of injury in Meniere's disease and may be reflected in measurable increases in *markers* of *cellular stress response* and oxidative stress in the peripheral blood of patients with Meniere's disease. This study also validate the hypothesis that changes in the redox status associated with abnormal expression and activity of the antioxidant protein thioredoxin, as well as carbonic anhydrase can contribute to increase oxidative stress with disruption of redox homeostasis in vulnerable neurons such as spiral ganglion neurons and consequent cellular degeneration. It is known that normal auditory function depends on maintenance of the unique ion composition in the endolymph **(130, 132)**. Hence, carbonic anhydrase in the inner ear has been suggested to play an important role in maintaining the ion concentration and regulating fluids of the inner ear. Our finding of an increased expression of carbonic anhydrase in MD patients may be relevant to the pathogenesis of the disease. Carbonic anhydrase is a sulfhydryl protein particularly vulnerable to oxidative damage, as demonstrated in neurodegenerating neurons in AD **(279)**, and thus, its increased expression can be viewed as an attempt to compensate for possible oxidant-induced inactivation of this enzyme. In conclusion, patients affected by MD are under condition of systemic oxidative stress and the induction of *vitagenes* Hsp70, is a maintained response in counteracting the intracellular pro-oxidant status **(126)**. The search for novel and more potent inducers of *vitagenes* will facilitate the development of pharmacological strategies to increase the intrinsic capacity of vulnerable ganglion cells to maximize antidegenerative mechanisms, such as *stress response* and thus cytoprotection **(16, 18, 249, 251)**.

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is one of the most common autosomal dominant neurogenetic disorder affecting about 1 in 3,000 individuals worldwide and occurring with an estimated incidence of 1 in 2500 to 3000 individuals independent of ethnicity, race, and gender **(149-150, 153)**. *Von Recklinghausen* described NF1 in detail in a case report published in 1882 **(280)**, but because of the varied presentation and *pleiotropic* nature of the disease, formal diagnostic *criteria* were not established until 1987 by the *National Institutes of Health Consensus Development Conference* (NIH) **(157)**. In fact, the often extreme variability in the presentation of extent and severity of NF1 clinical signs and symptoms, even within the same family, affected by the same mutation has meant that establishing definitive clinical diagnostic *criteria* has often been problematic. Recognition of this issue led the *National Institute of Health* (NIH) in 1988 to issue a “*Consensus Statement*” which defined the standard diagnostic *criteria* for NF1 to help clinicians to be able to distinguish it from other related disorders **(157)**. These diagnostic *criteria* have been shown to be both highly specific and sensitive for adults with NF1. The major clinical features of the disease include multiple café-au-lait (CAL) spots, axillary *freckling*, iris hamartomas (*Lisch*

nodules) and multiple cutaneous neurofibromas, the occurrence and the number of which vary greatly from one patient to another (149, 158-163). A number of clinical complications may also occur in patients and these include abnormalities of the cardiovascular, gastrointestinal, renal and endocrine systems associated to T2 hyperintensities on brain MRI, headaches and essential hypertension; the presence of major orthopedic problems, such as scoliosis, pseudoarthrosis, short stature, macrocephaly; facial and body disfigurement; optic gliomas, the presence of cognitive deficit and significant learning disabilities, an increased risk of certain malignancies (149, 158-160). The disease is characterized by pigmentary skin changes and the growth of a variety of benign and malignant tumors that develop in association with both the peripheral and central nervous system (161, 208). Plexiform neurofibromas are benign tumours that occur in more than half of people with neurofibromatosis 1 (NF1). These tumours can cause serious complications and can also progress to malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs), one of the leading causes of death among NF1 patients. Neurofibromas are benign Schwann cell tumors that arise from the fibrous tissue surrounding peripheral nerve sheaths and are composed of Schwann cells, fibroblasts, perineural cells and mast cells. NF1-deficient Schwann cells are considered to be the primary neoplastic cell in the tumor (166-167, 281). Plexiform neurofibromas differ from focal cutaneous neurofibromas in that they arise from multiple nerve fascicles and tend to grow along the length of a nerve. These lesions are typically present at birth but may continue to appear through late adolescence and early adulthood. NF1 is an extraordinarily variable condition. Some patients have very mild manifestations, whereas others are severely affected (161-163, 282). Currently, the diagnosis of NF1 is made in an individual with any 2 of the main clinical features, as indicated in Fig A (157, 283). Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common monogenic tumor-predisposition disorder with an autosomal dominant *pattern* of inheritance that arises secondary to *haploinsufficiency* of the tumor suppressor gene NF1 (149, 284). The mechanisms underlying NF1 clinical variability remain poorly understood, probably because of the involvement of complex pathophysiology and multiple factors. The allelic heterogeneity of the constitutional NF1 mutation may be one of the factors explaining the disease phenotypic variability (285). Almost half of all NF1 cases are a result of sporadic mutations and a huge number of different pathogenic mutations have been reported (213, 284-285). Among them, 5-10% are large 17q11 deletions encompassing the entire NF1 locus and neighboring genes. These recurrent deletions have been commonly associated with more severe and atypical manifestations, the so-called “*NF1 microdeletion syndrome*” (214, 285). On the other hand, for patients with intragenic NF1 mutations (90% of cases), no clear-cut allele-phenotype correlations have been established so far (286-287), with the exception of a 3-bp inframe deletion (c.2970-2972 delAAT) in exon 17 of the NF1 gene which has been associated with a particular

clinical phenotype characterized by the absence of cutaneous neurofibromas **(288)**. Studies provided evidence for a strong genetic component and suggested the involvement of unlinked *modifying genes* and perhaps also of the normal NF1 allele, in the variable expression of the disease **(285)**. Neurofibromatosis type 1 (NF1) is resulting from heterozygous inactivating mutations of the NF1 tumor suppressor gene, located at 17q11.2. NF1 gene, which covers 280 kb of genomic DNA, is divided into 60 exons and encodes a transcript of approximately 12 kb **(149, 213, 284-285)**. The NF1 gene product, neurofibromin, is a cytoplasmic ubiquitously expressed protein of 2818 amino acids long, with structural and functional similarities to the mammalian GTPase-activating protein (GAP)-related protein family, a group of evolutionarily conserved proteins. Analysis of the predicted sequence of neurofibromin revealed that it likely functions as a negative regulator of Ras, a key intracellular *signaling* protein that is important for regulating cell growth and survival. The most highly conserved region of the protein is the NF1 GAP-related domain (GRD), which is encoded by NF1 exons 20-27a and functions by down-regulating Ras **(189, 191)**. Two additional domains of neurofibromin have been described: the cysteine-serine rich domain (CSRD) and the Sec14p domain. The NF1 gene is thought to be a tumour suppressor gene, as loss of function mutations are associated with benign and malignant tumours in tissues derived from the neural crest and by myeloid malignancies **(188, 285, 289)**. Loss of neurofibromin results in unopposed Ras activity and constitutive *downstream signaling* and increased cell growth. Deregulated Ras activity leads to activation of several important *downstream signaling* intermediates, including the mammalian target of rapamycin (mTOR) protein. In addition to regulating Ras, neurofibromin also functions to positively regulate cyclic adenosine monophosphate (AMP) levels **(159)**. Increased cyclic AMP levels are associated with reduced cell growth, likely through interference with multiple mitogenic *signaling pathways*. Neurofibromin, the NF1 gene protein product, is a tumor suppressor expressed in many cells, primarily in neurons, glial, Schwann cells and early in melanocyte development **(191)**. This protein is a regulator of ras guanosine triphosphatase activity (GTPase-activating protein, GAP) and as such serves as a *regulator of signals* for cell proliferation and differentiation **(290)**. Mutations within NF1 result in inactivated forms of neurofibromin and increased cellular proliferation that underlies tumor formation. NF1 vasculopathy is a significant complication among NF1 patients **(185)**. Increasing evidence indicates that NF1 vasculopathy can be extremely serious, even causing sudden death. Vasculopathy usually attacks the arterial system and renal artery stenosis is the most common manifestation, occurring in at least 1% of patients with NF1. One of the more common vascular lesions in NF1 is renal artery stenosis with consequent hypertension **(185, 291)**. The pathogenesis of these vascular lesions in NF1 is not clear. However, because NF1 is normally expressed in endothelial and vascular smooth muscle cells and

can regulate cell growth through Ras regulation, its loss from one or both of those tissues could contribute to the pathogenesis of obstructive vascular disease in NF1 (149, 185, 291). In contrast to the neuropathy associated with neurofibromatosis type 2, the neurofibromatous neuropathy associated with NF1 has been documented as primarily a sensory *deficit* with no evidence of clinical or neurophysiologic deterioration (173). Neurocognitive *deficits* are the most frequently reported complication of NF1. Learning *deficits* in children with NF1 may include visuospatial and visuomotor *deficits* and language disorders (292). In addition to the specific nonverbal and verbal language *deficits* seen in 30% to 65% of children with NF1, both fine and gross motor-coordination *deficits* are common (181). The cognitive phenotype of NF1 is marked by a higher incidence of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorders, behavioral abnormalities and psychosocial issues (186). Patients with NF1 usually show IQ levels in the low-average *range* and the frequency of mental retardation is increased among these individuals (159). Osseous lesions in patients with NF1 include short stature, dystrophic scoliosis, tibial pseudoarthrosis and sphenoid wing dysplasia (293). The most common orthopedic problems are hypotonia and poor coordination. Bony dysplasia, bony erosion, demineralization, nonossifying fibromas and scoliosis are all features of NF1. Dysplastic bony lesions include splayed ribs, vertebral anomalies, hypoplasia of the sphenoid or mandible and pseudoarthrosis. Coupled with the appropriate number and size of CALMs, this orthopedic manifestation is sufficient to make the diagnosis of NF1 (149, 155, 158, 171). Pseudoarthrosis occurs in 3% of patients and usually involves the distal one third of the tibia and fibula. OPGs, typically low-grade pilocytic astrocytomas, are the most common type of intracranial malignancy in patients with NF1. The optic glioma is a tumor of the optic nerve and is present in 15-20% of patients with NF1 (174). It is a slow-growing tumor and can present clinically with proptosis, decreased visual acuity or precocious puberty. Yearly neuroophthalmologic observation is the accepted *management* protocol for lesions that present asymptotically. Unusual tumors occur with increased frequency in NF1. Carcinoid, pheochromocytoma, brain tumors, chronic myeloid leukemia and malignant peripheral nerve sheath tumors all occur. In contrast, common tumors such as breast, lung, kidney, colon and prostate occur, but their frequency is less than in the normal population (158). Significant advances in the understanding of the pathophysiology of NF1 have been made in the last decade. Since the NF1 gene was discovered in 1993, mutational analysis has become available on a clinical basis and is useful for diagnostic confirmation in individuals who do not fulfill diagnostic *criteria* or when prenatal diagnosis is desired. The germline mutation rate for the NF1 gene is some 10-fold higher than that observed in most other comparable inherited disease genes, and *de novo* mutations are present in almost half of all index NF1 cases (149, 164). Recently molecular testing for NF1 has

become clinically available (**188, 190**). Because of the large size of the NF1 gene and the lack of mutation *hotspots*, a *multi-step* detection protocol is preferred. Efforts to identify and characterise all NF1 gene mutations continue to present a considerable research and diagnostic challenge due to a combination of the large gene size, the absence of any localised mutation *clustering*, little evidence of repeat mutation and the wide diversity of mutation types observed. Furthermore, the presence of a number of highly homologous partial NF1 *pseudogene-like* sequences located throughout the human genome has increased the complexity of PCR-based mutation analysis (**150**). A comprehensive *screening* approach to the NF1 gene found mutations in greater than 95% of tested subjects (including both spontaneous and inherited mutations) fulfilling NIH diagnostic *criteria* (**157, 213-214**). Usually, NF1 diagnostic *screening* strategies employ PCR based *screening* methods such as the protein truncation test (PTT), single-strand conformational polymorphism (SSCP) or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) with varying degrees of sensitivity for each method (**207, 213, 294**). Direct DNA sequencing is then used to confirm and characterise mutations detected by each of these approaches and fluorescence in situ hybridisation (FISH) is used to detect large NF1 deletions (**180**). These techniques detect whole gene deletions and small intraexonic deletions/insertions or point mutations. Molecular testing is not indicated for the routine clinical care of patients with NF1, but can be helpful in individuals suspected of having NF1 (e.g. a young child with multiple café-au-lait spots and unaffected parents or a patient with a single *criterion*) or when prenatal or preimplantation genetic diagnosis is desired. A limitation of genetic testing is the lack of genotype-phenotype correlations. NF1 is known to display a wide *range* of phenotypic variability, both within and between families. Approximately 800 different NF1 mutations are reported to-date (*Human mutation*), but there is no evidence of localised *clustering* (**149, 205, 207**). Most (90%) of these mutations are small lesions, such as intraexonic deletions or insertions, *splicing* mutations and *nonsense* or *missense* mutations (**205**). A minority (4%) of patients carry typical 1.2-1.4 Mb deletions that delete the NF1 gene and its *flanking regions* (**207**). These patients generally exhibit a severe phenotype characterised by more neurofibromas at an earlier age, a lower IQ, cognitive *deficits*, mental retardation, non-familial facial dysmorphisms and possibly a higher incidence of malignant peripheral nerve sheath tumours (**207, 289**). It has been suggested that the co-deletion of a gene or *genes flanking* the NF1 gene region may modify the expression of the disease, in particular with respect to the high burden of cutaneous neurofibromas (**295**). Thus, as a means to identify potential *genetic modifiers* within the NF1 gene region, whose *haploinsufficiency* might promote neurofibroma growth, atypical deletions that overlap only partially with the common 1.4Mb microdeletion interval, assume a particular importance (**285**). The majority of patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) have intragenic point mutations. A wide

range of mutations, *missense*, *nonsense*, small deletions/insertions, *splicing* mutations and whole gene deletions, has been found (205, 214). Other variations include aminoacid substitutions and chromosomal *rearrangements*. According to this evidence, data illustrated in the present study clearly reported a wide spectrum of different types of mutations, including pathogenetic *missense*, *nonsense*, small deletions/insertions, which lead to the synthesis of an aberrant protein product. Mutation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene has shown that about 30% of NF1 patients carry a *splice* mutation resulting in the production of one or several shortened transcripts. Alternative *splicing* is an important mechanism to create protein diversity and to regulate gene expression in a tissue- or developmental specific manner (296). The data presented in this study indicate that *splicing* in NF1 gene is extremely complex (242-243). In fact, we identified heterozygous *missense* mutations in acceptor site or intraexonic causing codons *in frame* microdeletion or activating a *cryptic* exon *splicing* site or causing exon *skipping*. All these mutations altered canonic mechanism of normal *splicing* causing aberrant transcripts formation (242-243). Although entire gene deletions have been intensely studied, smaller *rearrangements* encompassing >1 NF1 exons have been investigated to a lesser extent as they are difficult to detect using *standard* molecular genetics techniques. To better investigate smaller NF1 *rearrangements*, we performed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to screen of a number patients affected by NF1 for whom the presence of point mutations, small deletions and insertions had been previously excluded by sequencing analysis. Single and multi-exon NF1 copy-number changes, exclusively represented by NF1 gene entire deletion in our genetic test, were found in two different clinic case of patients with NF1. The spectrum of genomic *rearrangements* disclosed by MLPA was characterised by a wide *range* of single and multi-exon deletions, distributed along almost the entire sequence of the NF1 gene. Patients carrying whole NF1 gene deletions are usually affected by a more severe form of NF1, characterised by a high number of neurofibromas and plexiform neurofibromas, facial dysmorphism and a higher risk of malignancies (177, 180, 207). Consequently, the development of sensitive, reliable and easy to use methods to differentiate between different types of mutations has important clinical implications for the *management* of patients with NF1. A *hallmark feature* of NF1 is the variable expression of clinical manifestations, which makes counseling and prognostic determinations difficult (149-150). There are clinical conditions that overlap with the NF1 phenotype but are not yet fully understood at the molecular level (297). A small but significant proportion of patients with the NF1 pigmentary phenotype never develop neurofibromas and have been classified as “*autosomal dominant café-au-lait spots only*” on clinical grounds. Recently, mutations in the SPRED1, gene associated to the *Legius syndrome* (LS), were found in several families segregating autosomal dominant multiple café-au-lait spots

(297-298). Increasing evidence reported that SPRED1 mutations are present in 0.5% of all NF1 cases and in 5% of NF1 patients displaying an NF1-like phenotype (299). SPRED1 gene, located in 15q13.2, contains seven coding exons and encodes the SPRED1 protein (297-299). Sprouty (SPRY1) and SPRED (SPRED1) proteins are an evolutionarily conserved family of membrane associated negative regulators of growth factor induced extracellular *signal* regulated kinases (ERK) activation. The clinical similarities between LS and NF1 are explained by a common pathogenetic mechanism, dysregulation of the RAS-MAPK *pathway*, a *signaling pathway* important for cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis (300). Further studies will be necessary to characterise the frequency of SPRED1 mutations, the exact phenotypic spectrum and the putative complications of the *Legius syndrome* caused by a new mechanism through which Ras-MAPK *signaling* is deregulated. These findings also emphasise the need to test families with NF1-like phenotype with no NF1 and SPRED1 mutations for additional genes involved in the Ras-MAPK *pathway*. The current *management* of NF1 focuses on genetic counseling and symptomatic treatment of specific complications. Despite early encouraging results from potential pharmacologic- and biological-based therapies, new modes of therapeutic development are needed to move the field forward. While no medical therapies are currently available, trials are ongoing to discover and test medical treatments for the various manifestations of NF1, primarily plexiform neurofibromas, learning disabilities and optic *pathway* gliomas, which are a significant cause of morbidity in these patients. Several studies have looked or are looking at testing various agents specifically directed at the plexiform neurofibroma. Clinical *trials* with a variety of pharmacological agents are ongoing for neurofibromas, primarily progressive or disabling plexiform neurofibromas. One of these agents, sirolimus, targets mTOR (a known regulator of cell growth in the nervous system) and is the focus of a multicenter *trial* for plexiform neurofibromas (301). Recently, improved cognition in NF1 was reported in *mice* following treatment with lovastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor that also inhibits Ras. In conclusion, Neurofibromatosis type 1 is a multisystem disorder requiring *management* by multiple disciplines, often coordinated through a primary care physician and geneticist. Regular medical appointments to a multidisciplinary clinic are also essential. The Neurofibromatosis type 1 (NF1) phenotype is highly variable, which has made genotype-phenotype correlations difficult. An explanation for this variability may be the contributions from the NF1 mutations, which deserves further exploration. Further research into genotype-phenotype correlations is needed before such predictions can be made. A comprehensive understanding of the NF1 phenotype/genotype may allow physicians to predict disease course better in the future. Our study enlarge knowledge and spectrum of NF1 gene

mutations and underlie the importance of molecular-genetic tests on the basis also of the Neurofibromatosis clinic field characterization.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN NEUROBIOLOGIA
(XXII CICLO)**

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

**TESI DI DOTTORATO
Dott.ssa Eleonora Guagliano**

**“ MODULAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULARE ALLO
STRESS OSSIDATIVO NELL'INVECCHIAMENTO E NELLE
PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE ”**

VERSIONE IN LINGUA ITALIANA

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Roberto Avola

Tutor: Chiar.mo Prof. Vittorio Calabrese

Cotutor: Chiar.mo Prof. Carlo Minetti

INTRODUZIONE

L'HEAT SHOCK PATHWAY NELLA TOLLERANZA CELLULARE ALLO STRESS: RUOLO DEI VITAGENI

Durante gli ultimi anni, l'equilibrio cellulare tra fattori ossidanti ed antiossidanti è stato oggetto di numerose ricerche sperimentali, in particolare per gli aspetti riguardanti l'invecchiamento cerebrale ed i meccanismi eziopatogenetici alla base dei disordini neurodegenerativi **(1)**. Le attuali evidenze suggeriscono che, in generale, la riduzione dell'espressione cellulare e dell'attività di proteine antiossidanti associata ad una diminuzione nell'efficienza dei meccanismi cellulari di riparazione e di degradazione ed il conseguente incremento dei livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo rappresentano una delle cause fondamentali sia dei normali processi d'invecchiamento che delle principali malattie neurodegenerative **(2)**. E' ormai assodato che un'aumentata produzione di specie radicaliche, molecole altamente elettrofile ed ossidanti, è correlata all'insorgenza e allo sviluppo di numerosi stati patologici, inclusi i disordini neurodegenerativi, le disfunzioni metaboliche, le infezioni, i tumori e persino l'invecchiamento fisiologico **(1)**. Il danno ossidativo protratto a carico di molecole importanti come DNA, proteine e lipidi, elicitato dalle specie reattive dell'ossigeno e del NO, è ritenuto, alla luce delle più attuali evidenze sperimentali e cliniche, la causa più importante delle modificazioni biochimiche e fisiopatogenetiche che si osservano durante l'invecchiamento del sistema nervoso centrale (SNC), inclusi i disordini neurodegenerativi **(3)**. Numerose evidenze sperimentali indicano che l'accumulo di proteine aberranti, la formazione di protofibrille, la disfunzione del sistema ubiquitina-proteosoma, la presenza di insulti eccitotossici associati a stress ossidativo e/o nitrosativo, il danno mitocondriale ed il mancato trasporto assonale e dentritico, rappresentano eventi unificanti in molti disordini neurodegenerativi **(4-6)**. L'idea della natura tossica dei radicali liberi si è andata sempre più fermamente radicando nella mente della maggior parte degli scienziati dal momento che il gruppo di ricercatori facenti capo alla "Britton Chance" ha sviluppato le tecniche biochimiche di base mediante le quali è stato possibile dimostrare che negli organismi aerobi, a riposo, circa il 2% di tutto l'ossigeno consumato dalle cellule viene convertito in specie reattive dell'ossigeno (ROS) piuttosto che in acqua **(7)**. Intermedi reattivi dell'ossigeno si producono continuamente durante il normale metabolismo aerobico in seguito ad un processo di "leakage" o "short circuiting" di elettroni dalle normali sedi biologiche di origine che sono rappresentate principalmente dalla respirazione mitocondriale, dal contenuto tissutale di xantina ossidasi e, in misura minore, dal metabolismo dell'acido arachidonico e dai

processi di auto-ossidazione di catecolamine o emoproteine (8). Sebbene recentemente sia stato rivalutato un probabile ruolo fisiologico svolto dai ROS e dalle specie reattive dell'azoto (RNS) nei fenomeni di *signaling* cellulare, comunque il loro impatto deleterio sulle principali macromolecole biologiche, quali proteine, lipidi ed acidi nucleici, è ampiamente documentato. Quando il *rate* di produzione di radicali liberi eccede la capacità detossificante delle normali difese antiossidanti si instaura una condizione di stress ossidativo che rappresenta un rischio per l'integrità strutturale e funzionale di molecole importanti come DNA, proteine e lipidi (5, 9). Numerose evidenze sperimentali indicano che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) non solo costituiscono delle molecole particolarmente tossiche e mutagene, ma esse stesse svolgono un ruolo chiave nei meccanismi di *signaling* intracellulari e nella regolazione dell'espressione genica. La continua presenza di piccole concentrazioni di ROS rappresenta uno stimolo in grado di indurre efficacemente l'espressione di enzimi antiossidanti e di altri meccanismi di difesa. In tale contesto scientifico, le specie radicaliche sono considerate delle molecole in grado di espletare degli effetti benefici dal momento che intervengono attivamente nei meccanismi di *signaling* aumentando in tal modo le principali difese intracellulari (10-11). Una varietà di stati patofisiologici, come la perturbazione dell'equilibrio redox, l'espressione di proteine non-native *misfolded*, la disfunzione dell'attività del proteosoma, l'alterato processo di glicosilazione e la relativa perdita di glucosio, il progressivo accumulo di prodotti aldeidici derivati dalla perossidazione degli acidi grassi poli-insaturi (4-HNE) o l'ossidazione del colesterolo, determinano la modificazione nell'omeostasi cellulare e l'insorgenza di una condizione di stress ossidativo il quale può portare, alla luce delle più recenti osservazioni sperimentali, ad una drammatica perdita della fedeltà molecolare e dei principali meccanismi di riparo/degradazione proteolitica con il conseguente accumulo di proteine *misfolding* e *misfolded* a livello degli organi centrali e dei sistemi tessutali periferici. Recenti acquisizioni sperimentali sui principali meccanismi molecolari che regolano il *signaling pathway* alla base della risposta cellulare allo stress hanno portato sicuramente innovativi contributi scientifici, dal momento che è stato accertato che sia i disordini neurologici, inclusi il morbo di Alzheimer (AD), la malattia di Huntington (HD), la Sclerosi Amiotrofica Laterale (ALS), il morbo di Parkinson (PD), l'atassia di Friedreich (FDRA), che molte malattie degenerative sistemiche, quali il diabete di tipo 2, sono delle condizioni patologiche strettamente associate ad una produzione di aggregati proteici anomali e sono pertanto denominate con il termine generico di "protein conformational diseases" (12-13). Infatti, uno dei concetti emergenti riguarda l'affermazione sperimentale in base alla quale l'aggregazione patogenetica di proteine *target* in una conformazione non-nativa rappresenta un fenomeno comune a molte malattie degenerative centrali e sistemiche correlata a riarrangiamenti metabolici e ad un'eccessiva produzione di specie

radicaliche (12). E' ormai noto che le cellule viventi sono continuamente esposte a modificazioni del loro microambiente causate da condizioni di stress acuti o cronici. L'abilità della cellula di contenere gli effetti deleteri dati dalle eccessive concentrazioni dei ROS e degli RNS richiede l'attivazione di *pathway* di sopravvivenza cellulare così come la produzione di molecole dotate di proprietà antiossidanti ed antiapoptotiche. Al fine di adattarsi ad alterazioni del bilancio ossidante/antiossidante e dello stato redox, e di sopravvivere a differenti tipi di danno e ad un'ampia varietà di stimoli stressogeni, le cellule eucariotiche hanno sviluppato dei sistemi inducibili altamente raffinati la cui *trans*-attivazione aumenta la resistenza cellulare allo stress (1). E' ormai assodato che un efficiente funzionamento dei meccanismi di mantenimento e di riparo cellulari svolge un ruolo cruciale sia per la sopravvivenza che per un'ottima qualità di vita. Ciò si realizza mediante un complesso *network* di processi che assicurano la longevità, i quali si basano essenzialmente sull'espressione di un'ampia varietà di geni, indicati per l'appunto con il termine di *vitageni* (1, 14-16). Questi ultimi, attivi omeodinamicamente, operano in sinergia per il mantenimento della fedeltà molecolare e dei principali meccanismi di riparo. I geni codificanti per le proteine *chaperones*, ossia proteine altamente conservate deputate al mantenimento della corretta conformazione strutturale di macromolecole biologiche, quali proteine funzionali, RNA e DNA, si sono rivelati fondamentali nella protezione della cellula contro un'ampia varietà di insulti tossici dati dalle temperature estreme, dallo stress ossidativo, dalle infezioni virali e dall'esposizione a metalli pesanti o a composti citotossici. Evidenze sperimentali indicano che mutazioni silenziose a carico del sistema-*buffer* dato dalle proteine *chaperones* possono essere attive frequentemente durante l'invecchiamento e queste possono contribuire all'esordio di molte malattie poligeniche, inclusi i disordini associati all'età, i processi aterosclerotici ed il cancro. Indipendentemente dalla fonte e dai meccanismi che portano progressivamente alle modificazioni di tipo ossidativo, le cellule dei mammiferi hanno evoluto un ampio *network* di risposte cellulari finemente regolate, le quali individuano e limitano varie forme di stress e di insulti. Una di queste risposte, nota come risposta *heat shock*, ha attirato negli ultimi anni gran parte dell'interesse e dell'attenzione del mondo scientifico come meccanismo universale necessario alla sopravvivenza di tutti i tipi di cellule esposte ad un'ampia varietà di condizioni citotossiche (12). Studi sperimentali hanno dimostrato che la risposta cellulare *heat shock* contribuisce a stabilire uno stato citoprotettivo in una vasta gamma di condizioni patologiche e di disordini metabolici, inclusi il diabete, il danno da ischemia e riperfusione, il colpo apoplettico, l'epilessia, i traumi cellulari e tissutali, le malattie neurodegenerative e l'invecchiamento (17). Negli eucarioti tipici esempi di geni citoprotettivi ed antiossidanti codificanti per proteine difensive includono il gene per l'eme ossigenasi (HO) e per le altre proteine da stress (Hsps), il gene codificante per il sistema della tioredoxina/tioredoxina

reduttasi (Trx/TRXr) e gli altri enzimi detossificanti (la Mn-superossido dismutasi, la glutazione S-transferasi, la glutazione perossidasi, la catalasi, la NADPH:quinone reduttasi), ed infine i geni per le citochine, per gli immunorecettori e per i fattori di crescita **(2,12)**. Le proteine *heat shock* costituiscono nel loro insieme un sistema di proteine *chaperones* altamente conservate responsabili del riparo e del mantenimento della corretta conformazione tridimensionale della maggior parte delle proteine biologiche. Nelle cellule dei mammiferi, la sintesi delle Hsps viene indotta non solo dopo trattamento da ipertermia, ma anche in seguito ad alterazioni dell'ambiente redox intracellulare, dopo esposizione a metalli pesanti, analoghi di aminoacidi o farmaci citotossici. Mentre un'esposizione prolungata a condizioni ambientali sfavorevoli caratterizzate da intenso stress è fortemente dannosa e può portare a morte cellulare, dall'altro lato la sintesi delle proteine Hsps determina una *tolleranza cellulare allo stress* ed una citoprotezione contro qualunque tipo di danno molecolare indotto dallo stress **(18)**. Infine, è stato dimostrato che nelle cellule eucariotiche l'induzione della risposta cellulare allo *shock* termico richiede l'attivazione e la traslocazione nucleare di uno o più fattori di trascrizione di tipo *heat shock* (HSF), responsivi allo stress, i quali regolano l'espressione di una specifica serie di geni codificanti per le proteine da stress citoprotettive **(19)**. Ciò ha aperto nuove prospettive nel campo della medicina e della farmacologia, per cui composti in grado di attivare tale meccanismo difensivo endogeno appaiono essere possibili candidati per strategie terapeutiche del tutto innovative **(15, 18-20)**. Nell'ultima decade è stato fortemente enfatizzato il ruolo svolto dal sistema dell'eme ossigenasi (HO), appartenente alla superfamiglia delle proteine da stress, nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nella protezione dal danno ossidativo cerebrale. Per di più, recentemente il coinvolgimento dell'isoforma enzimatica inducibile data dal *vitagene* HO-1 alla base dei meccanismi anti-degenerativi in molte malattie neurologiche centrali e in diversi stati patologici periferici è stato ampiamente riportato **(21)**. L'induzione dell'HO-1 (Hsp32) rappresenta un sistema di difesa potenzialmente attivo contro qualunque tipo di danno ossidativo e la sua espressione si è dimostrata critica nella modulazione dello stato redox e della risposta dei neuroni a diversi stimoli lesivi **(22)**. La rilevante efficacia tessuto-specifica dell'HO-1 nel promuovere la citoprotezione risiede principalmente nell'intrinseca capacità dei suoi prodotti metabolici, il monossido di carbonio (CO), una molecola vasoattiva e la bilirubina (BR), un potente agente antiossidante endogeno, originati in seguito al clivaggio α -specifico dell'eme, di esercitare potenti attività antiossidanti ed anti-infiammatorie **(23)**. Recentissimi dati noti in letteratura indicano inoltre che la bilirubina reduttasi, uno degli enzimi chiave nella via di degradazione dell'eme, è in grado di annullare gli effetti dannosi dati dallo stress nitrosativo, grazie alla sua abilità di legare ed inattivare il monossido d'azoto (NO) e le specie reattive dell'azoto (RNS) **(24-25)**. A tutt'oggi sono state identificate tre *isoforme* appartenenti al

sistema dell'HO: un'*isoforma* inducibile o HO-1, un'*isoforma* costitutiva o HO-2 e la più recente HO-3, ovvero un'*isoforma* originata da eventi di retrotrasposizione da parte di L-1 retrotrasposoni specie-specifici presenti nel ratto **(26)**. Nelle cellule dei mammiferi, l'espressione del gene HO-1 è rapidamente indotta dopo esposizione a vari stimoli infiammatori, quali l'eme e le metalloporfirine, le citochine, i metalli pesanti, le radiazioni UV, il perossido d'idrogeno, determinati composti sulfidrilici, lo *shock* da calore e vari altri stati pro-ossidanti **(1, 12, 18, 27)**. Nonostante le *isoforme* HO-1 ed HO-2 catalizzino la medesima reazione, esse rivestono dei ruoli differenti nel proteggere i tessuti contro il danno ossidativo e/o nitrosativo. Diverse ipotesi suggeriscono che l'induzione dell'*isoforma* HO-1 rappresenti la prima linea di difesa contro l'insulto ossidativo, responsabile della rapida eliminazione dell'eme pro-ossidante intracellulare e la sua trasformazione in CO e biliverdina. Viceversa, l'espressione costitutiva dell'*isoforma* HO-2 è primariamente coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare dell'eme e rappresenta il sensore dei livelli intracellulari dei gas NO e CO. Numerosi studi indicano che l'espressione del gene per l'HO-1 è regolato dallo stato redox cellulare ed è modulata da diversi fattori di trascrizione redox-sensitivi i quali riconoscono specifici siti di legame localizzati nella regione promotrice e nelle regioni *enhancer* **(28)**. Tali fattori includono AP-1, AP-2, Fos/Jun, NF- κ B ed il più recente Nrf2. Inoltre, è stato recentemente riportato che la regolazione redox del gene per l'HO-1 dipende dalla presenza nella regione promotrice di elementi *cis*-attivi antiossidanti responsivi allo stress denominati AREs simili alla sequenza di riconoscimento per le piccole proteine Maf (MAREs) **(18, 29)**. Tali particolari sequenze consenso sono state anche ritrovate in altri geni codificanti per proteine citoprotettive, quali gli enzimi detossificanti di Fase II comprendenti la glutatione-transferasi, la ferritina, la γ -glutamyl-cisteina sintetasi, la NAD(P)H:quinone ossidoreduttasi **(18)**. E' opinione generale considerare l'espressione del *vitagene* HO-1 una caratteristica comune alla base di diverse condizioni da stress. Tuttavia, recenti contributi scientifici hanno dimostrato che l'espressione dell'enzima inducibile HO-1 può essere repressa in determinati stati patologici caratterizzati da intenso stress ossidativo. Negli ultimi anni, l'importanza della repressione dell'HO-1 è stata rivalutata in seguito alla scoperta dei fattori di trascrizione redox-sensitivi Bach1/Bach2 per il gene HO-1 **(30)**. Infatti, correnti ipotesi sperimentali suggeriscono che la repressione dell'enzima HO-1 riveste un ruolo cruciale per il risparmio energetico e per il mantenimento della vitalità cellulare **(30)**. La delucidazione del *signaling pathway* in cui è coinvolta la proteina HO-1 nell'invecchiamento cerebrale e nei disordini neurodegenerativi età-dipendenti è in continua evoluzione **(18, 20)**. Mentre l'induzione acuta di tale enzima nei neuroni ed in altri tipi di tessuti ha degli effetti citoprotettivi, una prolungata espressione di tale gene negli astrociti, negli oligodendrociti ed anche nei neuroni potrebbe causare delle alterazioni cellulari le

quali possono portare a danno cronico-degenerativo ed a processi di neuroinfiammazione (18, 20, 28). Sebbene l'esatto ruolo biologico della proteina HO rimane ancora da delucidare completamente, il suo effetto rilevante nella risposta cellulare allo stress è stato ampiamente dimostrato in un'ampia varietà di tessuti, incluso il cervello (28). In particolari condizioni cliniche inoltre l'espressione del gene HO-1 è stata associata ad un'aumentata resistenza al danno tissutale, suggerendo un suo possibile impiego in eventuali strategie terapeutiche geniche nel trattamento di vari stati patologici. Recentemente, i nostri studi sperimentali hanno dimostrato che l'espressione dell'mRNA per l'HO-1 è fisiologicamente rilevabile nel cervello e presenta una caratteristica distribuzione regionale, con elevati livelli d'induzione nelle aree cerebrali rispettivamente dell'ippocampo e del cervelletto (28, 31). Grazie alla sua intrinseca proprietà antiossidante ed alla sua ampia distribuzione nel sistema nervoso centrale, la proteina inducibile HO-1 è stato proposto svolgere un ruolo chiave nella prevenzione del danno cerebrale (28, 31). Nel cervello, la modulazione del sistema HO-1 svolge un ruolo chiave nella patogenesi dei disordini neurodegenerativi. Un significativo incremento dei livelli di espressione dell'HO-1 è stato evidenziato nel cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD), in associazione alla presenza degli *ammassi neurofibrillari* (NFTs) e del precursore del peptide β -amiloide (β -APP) e alla deposizione delle *placche senili* (SP). Elevati livelli di espressione dell'mRNA per l'HO-1 sono stati riscontrati nella regione neocorticale e nei vasi cerebrali dei soggetti Alzheimer (32). Tale drammatico incremento nell'espressione dell'HO-1 alla base della patologia di Alzheimer riflette il tentativo delle cellule neuronali di convertire una molecola altamente tossica rappresentata dall'eme in due potenti agenti antiossidanti dati dalla bilirubina e dalla biliverdina (22-23), al fine di contrastare l'eccessiva produzione di radicali liberi alla base del processo neurodegenerativo. Alla luce di tali evidenze, diversi studi sono stati focalizzati sull'utilizzo di determinati composti naturali presenti nella dieta, quali i composti polifenolici contenuti in spezie ed erbe (8, 11-12, 15, 18, 20). Il curcumino, in particolare, uno dei più potenti antiossidanti estratto dal *curry turmeric* contenente una miscelanza di potenti fitonutrienti antiossidanti conosciuti con il nome di curcuminoidi, è un polifenolo utilizzato da millenni in India come spezia e rimedio tradizionale. Da anni, infatti, sono note le sue proprietà anti-infiammatorie ed antiossidanti e di recente è stata provata la sua spiccata attività antineoplastica (8, 11-12, 15, 18, 20). Il curcumino, possiede delle proprietà chemiopreventive, grazie alla sua abilità di arrestare il normale ciclo cellulare e di indurre l'apoptosi. Studi *in vitro* hanno dimostrato che tale sostanza polifenolica esercita una potente azione antiossidante, grazie all'abilità di eliminare efficacemente i prodotti di perossidazione lipidica e di neutralizzare l'attacco di specie radicaliche. Gli studiosi hanno evidenziato le proprietà neuroprotettive del curcumino (33) in modelli sperimentali di morte neuronale, inclusa l'apoptosi,

identificando i meccanismi biologici alla base di tale proprietà terapeutica. Il curcumino, è emerso come attivatore della risposta cellulare *heat shock*, capace di indurre l'espressione di *vitageni*, i quali coordinano e regolano la resistenza cellulare allo stress metabolico considerato tra le cause primarie del danno ossidativo alla base dei disordini neurologici e di molte malattie degenerative sistemiche, riportando l'omeostasi cellulare alla posizione più vicina a quella normale e potenziando in definitiva la vitalità cellulare (15, 18, 20). Oltre al curcumino, recentemente è stato riportato un effetto neuroprotettivo per altri antiossidanti presenti nella dieta, quali le carnitine e la carnosina (CRNS), attraverso l'attivazione della *risposta ormetica* mediata dall'induzione dei *vitageni* (17, 31, 34). Negli ultimi anni, la presenza della carnosina e dei suoi analoghi, del tipo omocarnosina ed anserina, nel SNC e nelle alterazioni età-dipendenti, ne ha suggerito un loro potenziale impiego per il trattamento terapeutico dei disordini neurodegenerativi (34-35). La carnosina mostra un effetto neuroprotettivo grazie alla sua capacità di limitare il danno ossidativo e nitrosativo in diverse condizioni patologiche (36). Oltre alle sue documentate proprietà antiossidanti, antiglicanti, *scavenger* e chelanti degli ioni metallici tossici, la carnosina influenza il metabolismo di polipeptidi alterati, il cui accumulo caratterizza il fenotipo senescente (37). E' stato dimostrato, infatti, che la carnosina è in grado di prevenire la tossicità e l'aggregazione del peptide β -amiloide, inibendo i processi di *misfolding* proteico e la formazione di prodotti di glicazione avanzata (36, 38). Per di più, è stato osservato che la carnosina è in grado di contrastare la citotossicità data dall'agente perossinitrito e di inibire l'attivazione della guanilato ciclasi NO-dipendente (36). Recenti evidenze, inoltre, indicano che la carnosina è in grado di prevenire l'induzione sia dell'enzima ossido nitrico sintetasi II (iNOS) che delle *heat shock* HO-1 ed Hsp70, in seguito a stress nitrosativo (37). Per di più, emergenti osservazioni sperimentali indicano l'efficacia di un nuovo coniugato di sintesi costituito dalla carnosina e dal trealosio quale sistema neuroprotettivo dotato di attività antiossidante, antiglicante ed antiaggregante, grazie alla sua maggiore resistenza contro l'attacco enzimatico delle dipeptidasi cerebrali (39). Un'ampia varietà di evidenze sperimentali hanno dimostrato le rilevanti proprietà citoprotettive della carnosina (CRNS) e della carnosina-trealosio (CRNS-T) contro il danno ossidativo alla base di diversi stati patologici (39-42). Considerate in una visione d'insieme tali osservazioni scientifiche indicano il *pathway* metabolico sostenuto dalla carnosina quale potenziale *target* per la prevenzione e/o trattamento dei disordini neurodegenerativi. Per di più, i nuovi derivati sintetici della carnosina (omocarnosina ed anserina), aventi proprietà chelanti ed antiossidanti, saranno investigati sulla loro abilità di sopprimere realmente il processo di neurodegenerazione correlato all'età, grazie al fatto che sono più resistenti all'attacco delle carnosinasi (34,36). Le *heat shock proteins* (Hsps) costituiscono un insieme di proteine conservate evolutivamente e presenti in tutti i compartimenti cellulari (1, 31). Alcune delle

principali *chaperonine* (Hsc70, Hsp90, piccole Hsps) sono presenti ad elevate concentrazioni anche nelle cellule non sottoposte ad insulti citotossici, in maniera consistente con il loro ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi cellulare. Oltre al sistema HO, la famiglia delle proteine Hsp70 rappresenta il gruppo più estensivamente studiato. La famiglia delle Hsp70 comprende l'*isoforma* costitutiva Hsc70, l'*isoforma* inducibile Hsp72 e la proteina costitutiva GRP-75 presente nel reticolo endoplasmatico correlata ai livelli di glucosio (18, 31). Le proteine Hsp70 intervengono nel controllo co- e post-traduzionale del corretto *folding* di proteine *target*. Più specificatamente, le Hsp70 partecipano al corretto assemblaggio delle proteine neosintetizzate in complessi macromolecolari, così come nella degradazione e dissoluzione di proteine aggregate non funzionali (1, 18, 31). Estese evidenze implicano il coinvolgimento delle Hsp70 nella patogenesi dei disordini da *misfolding* proteico. Numerosi studi indicano l'associazione delle Hsp70 e del sistema ubiquitina-proteosoma con la formazione di placche o inclusioni da aggregati proteici caratteristici delle "*protein conformational diseases*"(43). In modelli sperimentali di animali *transgenici* e grazie a tecniche di trasferimento genico, è stato possibile sovraesprimere il gene codificante per la proteina Hsp70 ed è stato dimostrato che l'iperproduzione di Hsp70 svolge degli effetti neuroprotettivi in un'ampia gamma di modelli di danno degenerativo a livello centrale (44). Inoltre, incrementati livelli di espressione di Hsp70 è stato riportato essere correlati ad una ridotta morte cellulare per apoptosi, ad un'aumentata espressione di proteine antiapoptotiche del tipo Bcl-2, alla soppressione dell'attivazione del sistema microglia/monociti ed, infine, alla riduzione nell'espressione delle metalloproteinasi della matrice extracellulare. Evidenze sperimentali indicano un'aumentata produzione di Hsp70, in seguito a fenomeni di ischemia focale cerebrale, principalmente nelle cellule endoteliali, nel cuore delle cellule infartuate più resistenti all'attacco ischemico, nelle cellule gliali e nei neuroni al margine dell'area infartuata. E' stato suggerito che l'espressione neuronale delle Hsp70 all'esterno dell'area infartuata possa svolgere un ruolo chiave nel delimitare la cosiddetta "*penombra ischemica*", che rappresenta una particolare zona di denaturazione proteica (45). Infine, Hsp90 sono tra le più abbondanti proteine da stress presenti nelle cellule eucariotiche ad una concentrazione di 1-2% in condizioni fisiologiche (18, 31). Esse inoltre costituiscono delle proteine evolutivamente conservate nelle differenti specie indispensabili per la vitalità cellulare. Hsp90 interagiscono e stabilizzano numerosi enzimi chinasi coinvolti nella trasformazione maligna (46). Per di più, Hsp90 sono essenziali per la sintesi di diversi fattori di trascrizione, quali i recettori per gli ormoni steroidei ed il fattore-1 inducibile correlato all'ipossia (47). Hsp90 rappresentano degli importanti *target* terapeutici per il trattamento del cancro. Esse sono infatti responsabili della modulazione della *risposta cellulare allo stress* mediata dalla funzione di un'ampia varietà di proteine-segnale, note con il termine di "*proteine-clienti*", le quali

sono correlate alla progressione tumorale. Le Hsp90 esercitano la loro attività *chaperone* in maniera coordinata a molecole *cochaperonine*, svolgendo un ruolo chiave nel corretto *fold*ing di circa 200 proteine specifiche coinvolte in svariati *signaling pathway* (31). Recenti evidenze sperimentali supportano il coinvolgimento del monossido di azoto (NO) nella morte neuronale alla base della patologia di Alzheimer e di altri disordini neurodegenerativi. NO svolge molteplici funzioni biologiche nell'ambito del sistema nervoso (18, 48). Oltre a regolare i processi di proliferazione, di vitalità e differenziamento neuronale, NO svolge un ruolo chiave nella morfogenesi e plasticità sinaptica neuronale e nelle funzioni di apprendimento e di memoria. NO esercita i suoi effetti biologici mediante la regolazione redox-sensitiva di diversi fattori di trascrizione, modulando in tal modo i processi biologici di differenziamento e vitalità cellulare nel cervello. Un aspetto fondamentale della biochimica del monossido d'azoto riguarda l'attacco da parte del NO a gruppi sulfidrilici con formazione di derivati *S*-nitrosilati o RSNO (49). Tale processo chimico, noto con il termine di *S*-nitrosilazione, rappresenta un raffinato meccanismo endogeno utile a stabilizzare e preservare l'attività biologica del NO. Recenti ricerche hanno messo in evidenza che il danno neurotossico elicitato dall'eccessiva produzione di ossido nitrico (NO) rappresenta un fattore fondamentale nell'insorgenza e nella progressione delle alterazioni fisiopatogenetiche che si riscontrano nei principali disordini neurodegenerativi, quali la malattia di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la Sclerosi Multipla (SM) e la Sclerosi Amiotrofica Laterale (SLA) e che l'eccessiva produzione di specie reattive del NO possa essere scatenata da una compromissione dell'integrità della funzione mitocondriale (18, 50), associata ad una risposta infiammatoria. All'equilibrio redox del sistema nervoso centrale (SNC) e di altri organi e tessuti periferici partecipa dunque anche il sistema dell'enzima NO-sintetasi, i cui *isoenzimi* neuronale (nNOS o NOS I), endoteliale (eNOS o NOS III) ed inducibile astrocitaria e microgliale (iNOS o NOS II) sono responsabili della produzione di monossido d'azoto (NO). La scoperta del ruolo del monossido d'azoto (NO) come *molecola-messaggero* ha rivoluzionato il concetto su cui si basa la trasmissione neuronale a livello del sistema nervoso centrale (SNC) (18). NO costituisce un gas che è in grado di attraversare liberamente le membrane plasmatiche, senza aver bisogno di recettori biologici per poter influenzare la comunicazione intracellulare ed i meccanismi di trasduzione del segnale (51). Quando è prodotto in piccole quantità, NO ha degli effetti benefici per l'organismo in quanto regola il flusso ematico ed il metabolismo locale cerebrale (16), il rilascio di neurotrasmettitori, l'espressione genica e svolge un ruolo chiave nei processi di morfogenesi e di plasticità sinaptica (52). E' stato ormai accertato che NO è il principale componente nel *pathway* della trasduzione del segnale che regola il tono muscolare, l'aggregazione piastrinica, i processi immunomodulatori ed un'ampia varietà di altre condizioni fisiologiche e patofisiologiche (18, 50). In presenza di

condizioni che portano ad un'eccessiva produzione di NO, quest'ultimo emerge come un importante mediatore di neurotossicità in diversi disordini del sistema nervoso (50, 53) e un composto in grado di generare specie radicaliche fortemente reattive (RNS) che arrecano danni a molecole biologiche funzionali come proteine, lipidi ed acidi nucleici in diverse alterazioni metaboliche centrali e sistemiche. Negli ultimi anni, numerose osservazioni sperimentali mostrano gli effetti protettivi mediati dal monossido d'azoto (NO) in diversi paradigmi di danno e di morte cellulare (16). Questi includono l'attività diretta *scavenger* verso alcuni tipi di radicali liberi, come il superossido, con profonde ripercussioni sul metabolismo intracellulare di ferro (la reazione di NO con il ferro, attraverso la formazione di un complesso ferro-nitrosilico, previene infatti il rilascio del metallo dai depositi di ferritina) (54); l'interazione dell'*isoforma* NO II, attraverso il suo congenere NO⁺, con i gruppi tiolici del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) e conseguente inibizione dell'influsso degli ioni calcio e decremento dei fenomeni di eccitotossicità neuronale (55); l'induzione di proteine citoprotettive come le Hsps (16, 18, 31, 51). In generale, l'opinione corrente considera lo stato redox intracellulare un fattore critico nel determinismo degli effetti tossici o protettivi esercitati dal NO in tutti i sistemi tissutali ed in particolare nelle cellule cerebrali (48). La difficoltà nel delineare il coinvolgimento del monossido d'azoto come agente pro-infiammatorio o anti-infiammatorio e la controversia sugli effetti citoprotettivi o citotossici elicitati da un'eccessiva formazione di NO sono meglio compresi quando si prende in considerazione la complessità della chimica del NO in relazione ai sistemi biologici (56). Infatti, come è stato descritto minuziosamente da diversi autori, la reattività del gruppo NO è data dallo stato di ossidazione dell'atomo di azoto, il quale determina l'esistenza di due differenti forme redox, NO⁺ ed NO⁻ (56). E' stato inoltre riportato che molecole nitrosilate di basso peso molecolare (RSNO), come *S*-nitrosoglutatione o derivati nitrosocisteine, possono rappresentare un ulteriore meccanismo di mantenimento dei livelli di NO *in vivo* (57). Riguardo a ciò, il glutatione, tripeptide contenente residui cisteinici e presente in quantità relativamente abbondanti in molti tessuti e fluidi biologici, costituisce il principale sensore determinante per la reattività ed il destino del NO. L'aspetto affascinante del parallelismo tra gli effetti mediati da un incremento delle specie radicaliche rispettivamente dell'ossigeno e dell'azoto riguarda l'abilità delle cellule di rispondere a tali due tipi di stress e, in base alla gravità dell'insulto nitrosativo/ossidativo, la risposta cellulare consiste sia nell'adattamento che nella resistenza alla tossicità (18, 51, 58). L'affermazione secondo cui la proteina enzimatica antiossidante HO possa rappresentare il "*biosensore*" del monossido d'azoto (NO) e, quindi, possa conferire protezione contro insulti citotossici dati dai ROS e dagli RNS, è supportata dalle seguenti osservazioni sperimentali: a) l'NO e le sue specie reattive inducono l'espressione della proteina HO-1 e ne incrementano l'attività enzimatica nelle cellule di glioblastoma umano, negli epatociti e nei vasi

aortici; b) cellule pre-trattate con vari composti che rilasciano NO acquisiscono una maggiore resistenza alla citotossicità mediata da H_2O_2 in concomitanza della massima attivazione dell'eme ossigenasi; c) la bilirubina, uno dei prodotti finali di degradazione dell'eme protegge dagli effetti deleteri causati da potenti agenti ossidanti, quali H_2O_2 e $ONOO^-$ (16, 36). Inoltre, l'osservazione sperimentale secondo cui sia l'NO che le sue specie radicaliche RNS possano essere coinvolti direttamente nella modulazione dell'espressione del *vitagene* HO-1 negli eucarioti si basa sull'evidenza in base alla quale differenti agenti rilascianti NO possono incrementare marcatamente i livelli di espressione della proteina HO-1 e del suo mRNA, così come la sua attività enzimatica in una varietà di tessuti, incluse le cellule cerebrali (19). Elevati livelli di perossinitrito nel sistema nervoso centrale possono derivare da un'aumentata produzione di NO ed anioni superossido in seguito a varie condizioni patofisiologiche, quali la risposta infiammatoria, il danno da ischemia e ri-perfusione, l'esposizione a xenobiotici e a particolari neurotossine. Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che il perossinitrito è un agente estremamente tossico per i neuroni (59-60). In seguito all'esposizione al perossinitrito o a composti donatori di perossinitrito, quali il 3-morfolinossidnonimine (SIN-1) si verifica la morte neuronale sia per processi necrotici che per apoptosi. Il SIN-1 è un agente che a pH fisiologico va incontro a fenomeni di auto-ossidazione producendo un'eguale quantità di NO e di O_2^- , i quali portano alla conseguente formazione di perossinitrito (61). L'ossido nitrico (NO), una particolare *molecola-segnale* multifunzionale con proprietà radicaliche, svolge un ruolo cruciale nella modulazione della risposta adattativa dei diversi distretti dell'organismo allo stress. Motterlini e collaboratori hanno precedentemente dimostrato che composti donatori di NO, tra cui il SIN-10, un particolare farmaco anti-angina il quale viene convertito in modo specifico nell'agente attivo SIN-1, determinano incrementati livelli di attività e di espressione della proteina citoprotettiva *heat shock* eme ossigenasi in modelli di studio *in vitro* rappresentati da epatociti, portando ad una significativa resistenza al danno ossidativo indotto da composti stressogeni, quali il perossido di idrogeno o le endotossine (62). Il SIN-1, un particolare donatore di perossinitrito, è stato dimostrato promuovere degli effetti citotossici in culture cellulari (61). In quanto tale, il SIN-1 rappresenta un composto donatore di perossinitrito ampiamente utilizzato in molti modelli sperimentali al fine di identificare gli effetti dannosi dati da tale composto reattivo sui sistemi biologici. Per di più, recenti studi sperimentali allestiti dal nostro laboratorio suggeriscono che il trattamento di cellule gliali di ratto con lipopolisaccaride (LPS) ed interferone- γ (IFN- γ) determina un rapido incremento sia dell'espressione dell'*isoforma* enzimatica inducibile NOS II che dei livelli di particolari prodotti metabolici del NO, ossia dei nitrati+nitriti, seguito da un aumento dell'espressione della proteina HO-1, indicando un ruolo cruciale per il monossido d'azoto (NO) nei processi d'induzione del sistema citoprotettivo endogeno Hsp (12, 16,

22). Considerate in una visione d'insieme, tali scoperte evidenziano il ruolo centrale svolto dall'NO quale *molecola-segnale* fondamentale per la resistenza e l'adattamento in particolare delle cellule cerebrali ai severi insulti da stress ossidativo e/o nitrosativo, attraverso l'espressione del *vitagene* per la proteina citoprotettiva HO-1 e di altre proteine inducibili appartenenti al sistema Hsp (12, 16, 19, 22).

IL SISTEMA DELLA TIOREDOXINA/TIOREDOXINA REDUTTASI (TRXr/Trx)

In generale, i meccanismi biomolecolari che regolano l'attivazione del segnale *heat shock* sembrano coinvolgere il bilancio cellulare ossidante/antiossidante rappresentato primariamente dallo stato redox del glutatione e di altri enzimi antiossidanti, tra cui merita una particolare attenzione per il suo ruolo emergente nel mantenimento dell'equilibrio redox cellulare e per le sue potenti proprietà anti-radicaliche il sistema della tioredoxina, quale uno dei più importanti sistemi di difesa antiossidante e di citoprotezione adottati dagli organismi (63). Il sistema della tioredoxina, costituito essenzialmente dall'enzima tioredoxina reduttasi (TRXr) e dalla sua proteina correlata tioredoxina (Trx), ha suscitato un vivo interesse da parte di diversi ricercatori e, alla luce delle nuove evidenze sperimentali, rappresenta uno dei principali sistemi multifunzionali ossidoriduttivi ubiquitari deputato alla regolazione dell'equilibrio redox della cellula (63-64). La Tioredoxina (Trx) è uno dei membri di una famiglia di proteine redox-attive evolutivamente conservate dotate di un centro catalitico disulfidrilico/ditiolico all'interno della sequenza del sito attivo (-Cys-Gly-Pro-Cys-), il quale viene sottoposto a reazioni reversibili di ossidazione a livello dei residui di cisteina in seguito alla riduzione di ponti disulfidrilici di un'ampia varietà di proteine *target* ossidate (64). Il sistema della tioredoxina/tioredoxina reduttasi, originariamente identificato in *Escherichia coli* nel lontano 1964 principalmente come cofattore ditiolico, donatore di elettroni per la ribonucleotide reduttasi, uno degli enzimi chiave richiesto per la biosintesi del DNA, svolge un ruolo essenziale per la vitalità cellulare limitando lo stress ossidativo direttamente attraverso l'elicitazione dei suoi effetti antiossidanti ed indirettamente mediante interazioni con altre proteine biologiche (65). Numerose evidenze sperimentali dimostrano che nei mammiferi la regolazione redox di molti processi cellulari è fornita dall'interazione funzionale tra i sistemi rispettivamente della tioredoxina e quello del glutatione nella protezione contro la tossicità data dallo stress ossidativo e dalla maggior parte di composti elettrofilici (66). Infatti, note bibliografiche indicano il coinvolgimento di entrambi i sistemi sensori cellulari in una varietà di *pathway* metabolici dipendenti dallo stato redox incluso l'approvvigionamento di equivalenti riducenti per la ribonucleotide reduttasi, un enzima coinvolto nella prima fase della sintesi dei deossiribonucleotidi per il riparo del DNA, e per la metionina

sulfossido reduttasi, ovvero un enzima coinvolto nella difesa antiossidante e nella regolazione del bilancio redox cellulare (63). Il sistema della TRX è considerato uno dei sistemi chiave deputati al mantenimento dell'omeostasi ossidoriduttiva del microambiente cellulare in cooperazione sinergica con il sistema redox del GSH. Nel loro insieme, costituiscono un potente sistema antiossidante deputato al controllo redox dell'espressione genica, della trasduzione del segnale, della proliferazione cellulare, della protezione cellulare contro lo stress ossidativo, delle funzioni anti-apoptotiche, degli effetti mediati da fattori di crescita e da co-citochine, così come alla regolazione dello stato redox dell'ambiente extracellulare (67). Il ruolo essenziale svolto dai gruppi tiolici nella regolazione dei meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo è ben documentato (68). I ricercatori affermano che alti contenuti dei sistemi redox rispettivamente del GSH e della TRX proteggono dall'ossidazione dei gruppi tiolici garantendo un'ottima funzione biologica di proteine strutturali e di enzimi. Il glutatione (GSH) è una piccola molecola solubile presente in concentrazioni millimolari che fornisce un potenziale meccanismo detossificante, idoneo all'eliminazione della maggior parte dei composti elettrofili inclusi i metalli reattivi esogeni ed endogeni (69-70). Per di più il GSH, interviene nel deposito e nel trasporto della cisteina, come pure nella sintesi delle proteine e del DNA, nella regolazione del ciclo cellulare e nella differenziazione cellulare (71). Il GSH biologicamente dunque rappresenta uno dei più versatili sistemi antiossidanti, il cui stato redox risulta profondamente alterato in diverse condizioni patologiche, incluse l'alcolismo, la sindrome da immunodeficienza acquisita, la tossicità da xenobiotici e le lesioni precancerose. Sulla base di tali osservazioni, il mantenimento di adeguati livelli di GSH e del proprio stato redox costituisce un evento cruciale nel monitoraggio e nella modulazione della progressione di svariati stati patogenetici associati ad un'aumentata suscettibilità al danno cellulare (72-73). A differenza del glutatione ridotto (GSH), il quale è ampiamente responsabile del basso potere redox e del contenuto globale dei gruppi tiolici liberi all'interno della cellula e degli organelli a causa della sua elevata concentrazione intracellulare (1-10 mM), il sistema della tioredoxina può svolgere un ruolo critico nella regolazione redox di proteine tioliche bersaglio, coinvolte principalmente nella trasduzione del segnale e nella regolazione dell'espressione genica (63, 74). I sistemi della TRX e del GSH appaiono essere sottoposti a meccanismi di controllo indipendenti, anche se Casagrande e collaboratori hanno recentemente dimostrato che il GSH può dar luogo alla formazione di legami disulfidrilici misti con la Trx, in corrispondenza di uno dei residui cisteinici, e tale processo di glutationilazione può portare all'inibizione dell'attività della Trx (75). Dati noti in letteratura riportano inoltre che l'attività catalitica della Trx è regolata da un inibitore endogeno coinvolto nella repressione dei tumori e nell'invecchiamento, denominato proteina-2 legante la Trx (TBP-2), simile alla proteina-1 regolata dalla vitamina D3 (VUDP1) (76). Le tioredoxine (Trxs)

rappresentano delle proteine relativamente abbondanti, ubiquitarie e presenti in diverse *isoforme* appartenenti a differenti specie, dove presiedono ad essenziali reazioni biosintetiche regolando molte funzioni biologiche vitali. Numerosi dati noti in letteratura indicano che i diversi membri proteici appartenenti alla famiglia della TRX possiedono evidenti proprietà biologiche e sono implicati in un'ampia varietà di funzioni cellulari nei mammiferi comprendenti la trasduzione redox-sensitiva del segnale, la stimolazione della crescita e della proliferazione cellulare dopo danno tissutale, il differenziamento cellulare, la trasformazione neoplastica, l'attivazione trascrizionale di specifici geni responsivi allo stress e la regolazione dell'attività di trascrizione di numerosi fattori nucleari redox-sensitivi (77). Inoltre la tioredoxina (Trx), la quale si comporta essenzialmente come una proteina solubile dopo disfacimento delle cellule, esiste in un'*isoforma* predominante citoplasmatica (Trx-1) ed una mitocondriale (Trx-2) (64, 78). Studi molecolari mostrano che sia l'*isoforma* citoplasmatica che quella mitocondriale della Trx proteggono dallo stress ossidativo ed entrambe sono indispensabili per la vitalità delle cellule dei mammiferi, in quanto topi *Knock-out* per ciascuna delle due *isoforme* presentano una maggiore incidenza di letalità embrionale, supportando il ruolo chiave svolto dal sistema Trx/TRXr sia per l'impianto, il differenziamento che per l'iniziale processo di morfogenesi nell'embrione di topo (79). Mutazioni genetiche che portano ad un'ablazione del gene per la tioredoxina causano in genere l'insorgenza di un fenotipo letale (80). La Trx, identificata per la prima volta come un fattore derivato da cellule T adulte leucemoidi trasformate dal virus tipo 1 o come un fattore di crescita autocrino simile all'interleuchina-1 prodotto da cellule trasformate dal virus di *Epstein Barr* (81), rappresenta uno dei principali composti disulfidrilici, di difesa cellulare, di 12 KDa ricco in residui cisteinici, il quale è mantenuto in uno stato ridotto grazie all'attività catalitica dell'enzima tioredoxina reduttasi (TRXr) (82) in presenza del cofattore NADPH. Studi sperimentali indicano che l'enzima flavoproteico della tioredoxina reduttasi (TRXr) appartiene alla famiglia delle piridin-nucleotide-disulfidriliche ossidoreduttasi, la quale include anche la lipoamide deidrogenasi e la glutatione reduttasi (83). Essa è essenzialmente una proteina omodimerica in cui ciascun monomero comprende due gruppi prostetici FAD-dipendenti ed un sito di legame per il NADPH. Per di più, tutte le varie *isoforme* di TRXr contengono un centro catalitico redox dotato di due residui cisteinici adiacenti all'anello flavinico del FAD, localizzato nella porzione *N*-terminale della proteina enzimatica. Contrariamente all'*isoforma* TRXr presente nei lieviti procariotici ed in *Drosophila*, la quale non contiene selenio, gli *isoenzimi* della TRXr presenti nei mammiferi sono caratterizzati invece da un secondo centro catalitico redox, costituito da un residuo di seleniocisteina (Cys-Sec) localizzato nella porzione *C*-terminale della proteina (63-64). Le *isoforme* enzimatiche TRXrs dei mammiferi sono enzimi promiscui in grado di ridurre le proteine Trxs appartenenti a differenti

specie e la cui attività è intimamente correlata alla funzione del selenio nei sistemi biologici. Evidenze sperimentali riportano che entrambi i siti attivi sono essenziali per l'attività catalitica redox dell'enzima tioredoxina reduttasi (TRXr) dei mammiferi, realizzata attraverso la riduzione della proteina ossidata tioredoxina (Trx) e di un ampio spettro di diversi substrati fisiologici endogeni ed esogeni, comprendenti l'acido lipoico, l'acido ascorbico, il radicale libero ascorbico, l'ubichinolo, il peptide citotossico *NK*-lisina, la vitamina K3 e la proteina p53 (83). In aggiunta, è stato riportato che le diverse *isoforme* enzimatiche della tioredoxina reduttasi (TRXr) dei mammiferi svolgono un'azione *scavenger* diretta contro gli idroperossidi lipidici e le molecole di perossinitrito grazie alla formazione di un complesso proteico mediato dalla presenza del residuo di seleniocisteina (Sec) (84-85). Una volta incorporato in alcune proteine *target* sottoforma di residui di seleniocisteina biologicamente attivi, il selenio (Se) rappresenta un elemento essenziale richiesto per l'attività enzimatica e la funzione di almeno 25-30 selenioproteine comprendenti *isoenzimi* chiave antiossidanti, come quelli della tioredoxina reduttasi (TRXr) e della glutatione perossidasi (GPx) (67). Data l'enorme quantità di funzioni redox svolte dalla Trx, risulta plausibile affermare che essa costituisce una molecola critica indispensabile per la vitalità cellulare. La sovraespressione del sistema della Trx/TRXr è generalmente associata all'attivazione di meccanismi di *tolleranza cellulare allo stress* ed, in generale, ad una resistenza al danno ossidativo e/o nitrosativo mediato da un'ampia varietà di agenti stressogeni, inclusi composti quali la doxorubicina e l'etoposide. Un crescente numero di studi riporta una stretta associazione tra l'*up-regulation* della Trx-1 nel sistema nervoso centrale e l'aumentata sopravvivenza neuronale dopo esposizione a danni degenerativi risultanti in un quadro patologico generale di stress ossidativo (86). Nei mammiferi, il sistema Trx/TRXr è ampiamente distribuito in differenti tipi di tessuti ed organi. Sia la proteina Trx-1 che l'enzima tioredoxina reduttasi (TRXr), ossia le proteine appartenenti al sistema della tioredoxina più estensivamente studiate negli organismi eucarioti, sono state per la prima volta identificati mediante tecniche immunostochimiche a livello del nervo sciatico di ratto (87). La Trx svolge un ruolo citoprotettivo contro differenti forme di stress in una varietà di sistemi biologici. Essa è stata caratterizzata fondamentalmente come una proteina *stress-inducibile* dotata di una tipica localizzazione intracellulare citosolica (78). L'analisi strutturale della regione promotrice del gene per la Trx ha permesso di evidenziare l'esistenza di particolari *sequenze responsive* allo stress ed agli xenobiotici, di siti di legame per diversi fattori di trascrizione redox-sensitivi, come SP1, GCF e WT-ZFP, i quali conferiscono un'espressione costitutiva, di altri elementi genici per il legame dei fattori AP-1, AP-2, NF-kB, Oct-1, PEA-3, Myb correlati ad un'espressione inducibile ed, infine, di elementi associati alla risposta cellulare antiossidante (ARE). Studi sperimentali hanno permesso di delucidare il meccanismo molecolare che sta alla base dell'induzione della Trx-1 mediata dagli

elementi di risposta antiossidante (ARE), suggerendo il coinvolgimento del recente fattore di trascrizione Nfr2 (88). Riferimenti bibliografici indicano che la Trx è espressa costitutivamente, associata a proteine sulfidriliche sulla superficie della membrana plasmatica di differenti tipi cellulari (64). Molti stimoli chimico-fisici, comprendenti l'irradiazione UV, le radiazioni ionizzanti, il fattore di necrosi tumorale, l'ipossia, il lipopolisaccaride, gli esteri del forbolo, le infezioni virali ed alcune specie radicaliche, quali il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e l'anione superossido (O_2^-), sono in grado di indurre l'espressione e la secrezione della Trx. In qualità di molecola redox-sensitiva, la tioredoxina (Trx) partecipa attivamente nei principali processi immunomodulatori svolgendo un'attività simile alle citochine o chemiochine al fine di prevenire danni cellulari causati dallo stress ossidativo (63-64). Oltre alle radiazioni UV, indagini sperimentali indicano che il trattamento di culture cellulari con particolari composti citotossici, quali l'acido palmitoil-miristico (PMA), H_2O_2 , il chemioterapico cisplatina e l'emina, determina la traslocazione della Trx dal citoplasma nel nucleo, dove essa regola l'attivazione redox-sensitiva ed il legame specifico al DNA di fattori di trascrizione chiave, responsabili dell'espressione cellulare di geni responsivi allo stress, quali i membri della famiglia AP-1, NF-kB, Jun, Fos, p53, CREB, PEBP2/CBF, Myb, e persino i recettori per i glucocorticoidi e per gli estrogeni, tutti caratterizzati dalla presenza di residui cisteinici critici a livello del loro dominio di legame al DNA e coinvolti in processi cellulari vitali, quali l'espressione genica, la risposta infiammatoria, la crescita cellulare, l'invecchiamento e l'apoptosi (34, 63-64). Dati sperimentali indicano che i livelli plasmatici della Trx variano tra 10 e 80ng/ml nei soggetti sani (63). I livelli sierici/plasmatici di Trx-1 rappresentano dei validi indici clinici utili nella valutazione e nel monitoraggio del danno da stress ossidativo in un'ampia varietà di stati degenerativi centrali e sistemici. Diversi studi riportano un'aumentata espressione della Trx-1 in associazione a molti tumori primari ed altre linee tumorali nell'uomo, inclusi gli astrocitomi. Elevati livelli di Trx possono contribuire ad un'aumentata proliferazione delle cellule tumorali ed un'incrementata resistenza ad eventuali trattamenti terapeutici con chemioterapici attraverso diversi meccanismi molecolari, inclusi la stimolazione della sintesi del DNA, l'attivazione di fattori di trascrizione modulati dallo stato redox, i quali regolano fundamentalmente la crescita cellulare ed inibiscono i processi apoptotici (78, 89). Una caratteristica dominante delle conoscenze attuali riguarda l'evidenza emergente che attribuisce un ruolo neuroprotettivo al sistema Trx/TRXr a livello centrale. Infatti, dati noti in letteratura indicano che l'isoforma citoplasmatica Trx-1 possiede un'attività neurotrofica in quanto agisce da proteina regolatrice del *signaling pathway* mediato dal fattore di crescita NGF (90). NFG, uno dei principali fattori neurotrofici che regola lo sviluppo, il mantenimento e la funzione del sistema nervoso centrale, sembra indurre l'espressione di Trx attraverso l'attivazione degli elementi responsivi AMPc-dipendenti (CREs), localizzati nel

promotore del gene della Trx. Tali osservazioni sperimentali suggeriscono che il sistema della TRX costituisce uno dei sistemi di difesa antiossidante sensitivi allo stress più importanti della cellula (90). Dati sperimentali emergenti indicano che il sistema Trx/TRXr, oltre alla sua capacità intrinseca di regolare la funzione redox di proteine *target* biologicamente importanti attraverso reazioni ossidoriduttive di scambio tra gruppi tiolici e legami disulfidrilici, svolge un ruolo cruciale nella *trans*-attivazione del gene per l'HO-1, la quale costituisce un'importante proteina *heat shock* dotata di effetti citoprotettivi pleiotropici derivati dalla degradazione dell'eme con conseguente formazione di bilirubina e biliverdina, così come di monossido di carbonio, supportando il ruolo cruciale svolto dalla TRX alla base dei principali *eventi-segnale* che promuovono l'induzione dell'HO-1 da mediatori dell'infiammazione ed evidenziando in tal modo una stretta associazione tra agenti antiossidanti riducenti ed attivazione del *pathway heat shock* alla base dei principali meccanismi di difesa cellulare (91). Oltre al ruolo di cofattore e di principale sorgente donatrice di equivalenti riducenti, la TRX agisce essa stessa da molecola antiossidante e da *scavenger* delle principali specie reattive dell'ossigeno. Infatti, essa contribuisce all'inattivazione dell'ossigeno singoletto, del radicale idrossile e del perossido d'idrogeno, inducendo citoprotezione (92). Oltre alle varie isoforme della tioredoxina che, in associazione all'enzima tioredoxina reduttasi (TRXr), hanno la capacità di ridurre i ponti disulfidrilici molecolari di proteine essenziali con un'efficienza variabile, il sistema Trx/TRXr include anche la famiglia delle perossiredoxine (PRXs). Queste ultime, denominate anche tioredoxina perossidasi, costituiscono una nuova famiglia di proteine enzimatiche antiossidanti di recente scoperta, molte delle quali utilizzano il potere riducente della Trx, o di altri donatori di elettroni, per ridurre diversi perossidi, quali il perossido d'idrogeno e vari idroperossidi alchilici (93). Così come per l'*isoforma* citosolica Trx-1, anche per l'induzione della Prx-1 è stato indicato il coinvolgimento del fattore di trascrizione Nrf2 (87). Un crescente numero di studi sperimentali indica che varie *isoforme* delle PRXs possono essere indotte nel cervello in risposta ad un'ampia varietà di insulti citotossici, suggerendo in tal modo una loro funzione neuroprotettiva a livello del sistema nervoso centrale (SNC) (94). Oltre alla Trx-1, diverse altre *isoforme* appartenenti alla famiglia della tioredoxina sono state identificate nelle cellule dei mammiferi. Particolare interesse riveste l'*isoforma* mitocondriale (Trx-2), la quale esibisce delle caratteristiche consistenti alla presenza di una sequenza-segnale di traslocazione mitocondriale, come confermato da analisi mediante *Western blot* (80). Recentemente è stato dimostrato che, analogamente alla Trx-1, anche la delezione del gene per la Trx-2 determina un fenotipo letale a livello d'embrione (80). E' stato dimostrato che l'incrementata espressione della Trx-2 determina un'aumentata resistenza al processo apoptotico indotto da specie ossidanti, suggerendo il potenziale coinvolgimento della Trx-2 nella regolazione dello stato redox intramitocondriale, nel

mantenimento dello stato tiolico di molte proteine *target* mitocondriali e, soprattutto, nella prevenzione della cascata apoptotica e nella protezione contro gli effetti dati dalla morte cellulare programmata. In ultima analisi, note bibliografiche correlate a ricerche scientifiche indicano che l'*isoenzima* mitocondriale Trx-2 risulta abbondante ed ampiamente distribuito nel cervello di ratto (95). Il *pattern* di espressione per la Trx-2 appare associato principalmente a quelle regioni cerebrali con i più elevati livelli di produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), comprendenti il bulbo olfattorio, la corteccia frontale, alcuni nuclei ipotalamici e talamici, il cervelletto ed i nuclei del *brainstem* (95).

LA MALATTIA DI ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta un progressivo disordine neurodegenerativo correlato all'età e caratterizzato da un declino della memoria e delle facoltà cognitive, perdita della funzione del linguaggio e da modificazioni della personalità soggettiva e della vita di relazione (96). Da un punto di vista neuropatologico, la malattia di Alzheimer è caratterizzata dalla riduzione del numero e della plasticità delle sinapsi con atrofia cerebrale, da degenerazione neurofibrillare data dalla presenza di *matasse neurofibrillari* intracellulari (NFTs) associate alla deposizione di proteina *tau* iperfosforilata e dall'accumulo extracellulare di *placche senili* (SP), il cui componente centrale è dato dal peptide β -amiloide. Quest'ultimo origina da processi di proteolisi mediati da enzimi di clivaggio del tipo β e γ -secretasi a carico di una proteina transmembrana precursore (β -APP) (97). Sebbene la maggior parte sia rappresentata da casi sporadici, il 5-10% o più dei soggetti Alzheimer comprende casi di tipo familiare. L'esame macroscopico del cervello di soggetti affetti da malattia di Alzheimer mostra un grado variabile di atrofia corticale con un restringimento delle circonvoluzioni ed un ampliamento dei solchi più evidente nei lobi frontale, parietale, e temporale. Da un punto di vista microscopico, si osserva la formazione intracellulare di *matasse neurofibrillari* (NFTs), la deposizione extracellulare di *placche neuritiche* (senili), una spiccata angiopatia da accumulo di peptide β -amiloide ed aggregati amorfi, la degenerazione granulovacuolare e la formazione di inclusioni tissutali definite corpi di Hirano (1, 18, 97). Del tutto interessante è l'osservazione sperimentale che prevede la presenza di tali formazioni anche nel cervello di individui anziani non dementi sebbene in maniera meno estesa. Inoltre, la dimostrazione scientifica in base alla quale la colina acetiltransferasi presenta un decremento del 40-90% a livello della corteccia cerebrale e dell'ippocampo di pazienti con malattia di Alzheimer ha permesso di ipotizzare che la neurodegenerazione di Alzheimer sia la conseguenza di un *deficit* funzionale del sistema colinergico (98). Numerose evidenze sperimentali indicano in generale che, fattori quali lo

stress ossidativo, eventuali alterazioni nel metabolismo di proteine *target*, incluse le modificazioni *post-traduzionali* di specifiche proteine neuronali e di altre macromolecole biologiche funzionali e la loro interazione in un circolo vizioso, svolgono un ruolo chiave nella patogenesi di tale disordine demenziale (99-101). Crescenti evidenze sperimentali suggeriscono che aumentati livelli di stress ossidativo, l'infiammazione e l'apoptosi svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia di Alzheimer, come documentato dall'incrementata ossidazione degli acidi nucleici e delle proteine e dagli aumentati livelli di perossidazione lipidica (100-102). Alla luce delle più recenti indagini epidemiologiche, è noto che la malattia di Alzheimer (AD) affligge oltre due milioni di Americani e rappresenta la principale causa di ricovero presso le case di cura (1, 18, 36, 97). La malattia di Alzheimer, che raramente insorge prima dei 50 anni d'età, si manifesta clinicamente in maniera subdola come un'alterazione delle funzioni intellettive attentivo-mnemoniche od un disturbo della sfera affettiva (103). Nella patologia di Alzheimer i circuiti cerebrali fondamentali per i processi d'apprendimento e di memoria sono particolarmente vulnerabili e vanno incontro a disfunzione e degenerazione. Evidenze sempre più emergenti attribuiscono ai cambiamenti nella funzione e nella struttura delle sinapsi e degli assoni in tali regioni cerebrali gli eventi d'esordio nella patogenesi di tale processo neurodegenerativo (104-105). Il *pattern* di perdita neuronale nella malattia di Alzheimer è sovrapponibile, anche se non è identica, a quella che si verifica durante il normale processo d'invecchiamento (1, 18, 97). Diversi fattori rendono le sinapsi e le terminazioni nervose particolarmente vulnerabili nella neurodegenerazione di Alzheimer, incluso l'elevato contenuto di particolari proteine associate a tale disordine come il peptide precursore β -APP, le preseniline e la proteina *tau*. Le normali funzioni espletate dalla proteina precursore APP non sono ancora pienamente comprese, ma diversi studi dimostrano che essa ha un importante ruolo biologico nel regolare la sopravvivenza neuronale, l'eccessiva crescita delle terminazioni nervose, la plasticità sinaptica ed anche l'adesione cellulare (1, 18). Le sinapsi rappresentano le sedi dove oligomeri stabili derivati da successivi processi di aggregazione del peptide β -amiloide possono accumularsi in gran quantità, e costituiscono i siti d'inizio della morte neuronale mediata dalla complessa cascata di eventi biochimici alla base dei processi apoptotici. Gli aumentati livelli nei depositi dati dal peptide β -amiloide, sostanza di per sé neurotossica, contribuiscono in maniera determinante alla morte dei neuroni tendenzialmente per apoptosi, incrementando ampiamente la loro vulnerabilità all'eccitotossicità, al danno ossidativo ed a qualunque tipo di insulto metabolico. Sebbene l'esatto meccanismo di neurotossicità indotto dal peptide $A\beta(1-42)$ rimane ancora sconosciuto, indagini sperimentali indicano che la chimica di un singolo residuo di metionina nella posizione 35 del peptide $A\beta(1-42)$ rappresenta uno degli aspetti biochimici più importanti associati alla sua neurotossicità (96, 106). Lo stato di transizione fra le modificazioni fisiologiche delle capacità

cognitive legate all'invecchiamento e le iniziali alterazioni associate alla demenza di Alzheimer (AD) ha suscitato un sempre maggior interesse nell'ambito della ricerca scientifica in questi ultimi anni **(1, 18, 96)**. Nell'ambito della patologia di Alzheimer, lo sviluppo di strategie preventive e/o terapeutiche, come l'utilizzo di farmaci sintomatici e/o patogenetici e la ricerca di tecniche di immunizzazione, richiede infatti la possibilità di intervenire precocemente in una fase preclinica della malattia allo scopo di poter bloccare o ritardare l'esordio clinico della demenza. In passato sono state fornite diverse definizioni cliniche di *deficit* cognitivi subclinici legati all'invecchiamento, quali la "*smemoratazza senile benigna*" (*benigne forgetfulness*), i "*deficit* di memoria associati all'età" (AAMI) o il "*declino cognitivo associato all'età*" (AADI), di solito individuandoli come *deficit* cognitivi isolati o multipli accomunati più che altro dalla nozione che tali *deficit* fossero comunque non evolutivi e quindi nei limiti di un invecchiamento naturale. Più recentemente, la "normalità" di queste condizioni cliniche è stata messa in dubbio. E' stato infatti dimostrato che soggetti anziani non dementi ma con lievi disturbi cognitivi presentano un aumento del rischio di sviluppare una demenza degenerativa rispetto a quanto atteso nella popolazione normale **(103)**. In particolare, il concetto di *Mild Cognitive Impairment* (MCI), il quale si riferisce ad una popolazione di soggetti anziani non compromessi sul piano delle attività del *daily living* ma con un disturbo subclinico ed isolato di memoria potenzialmente a rischio per lo sviluppo della demenza di Alzheimer, è stato introdotto proprio per definire uno stato clinico transitorio, un confine ideale tra le modificazioni biochimiche cognitive che si verificano durante il normale invecchiamento ed il serio declino cognitivo quale si evidenzia nella malattia di Alzheimer. Evidenti segni di ossidazione proteica e di perossidazione lipidica sono stati riscontrati in corrispondenza del giro temporale medio e superiore anche nel cervello di pazienti MCI, supportando l'ipotesi sperimentale in base alla quale lo stress ossidativo rappresenta un evento primario nella progressione dalla condizione di *deficit* cognitivo subclinico o MCI a stato demenziale di Alzheimer **(1, 18, 36, 96, 107-108)**. Indagini sperimentali basate su tecniche di proteomica mostrano significativi aumentati livelli di ossidazione proteica nell'ippocampo di soggetti MCI rispetto agli individui controllo di pari età. E' stato, inoltre, stabilito che i fenomeni di ossidazione proteica sono associati alla modificazione di specifiche proteine *target* ed, in particolare, le proteine alterate ossidativamente identificate nell'area dell'ippocampo di soggetti MCI includono l'enolasi 1 (ENO1), la glutammina sintetasi (GLUL), la piruvato chinasi M2 (PKM2) e la peptidil-prolil cis/trans-isomerasi PIN1 **(108)**. Evidenze sperimentali indicano che la modificazione di tali proteine può contribuire ai *deficit* cognitivi osservabili nei soggetti MCI attraverso l'alterazione di processi cellulari vitali nei quali esse sono coinvolte, quali il metabolismo energetico, la mitogenesi/proliferazione e la neuroplasticità **(107-108)**. Uno dei punti di maggior

interesse per la ricerca su soggetti affetti da MCI è la possibilità di poter individuare in questa categoria di individui dei *biomarker* clinici quantificabili da integrare con i normali approcci clinici di *routine* comprendenti *test* neuropsicologici, biologici o neuroradiologici che possano essere in grado di fare delle stime sull'incidenza e sulla prevalenza di tale entità clinica e di predire precocemente in questi soggetti l'eventuale velocità di progressione in demenza di Alzheimer. Crescenti evidenze suggeriscono che anche il metabolismo del monossido d'azoto (NO) può essere direttamente o indirettamente coinvolto nella morte neuronale che caratterizza la malattia di Alzheimer ed altri disordini neurodegenerativi (5, 18, 36, 50-51, 96). Gli effetti neurotossici del NO potrebbero essere mediati dal danno ossidativo così come dall'attivazione di una cascata di segnali intracellulari. In particolare, il perossinitrito (ONOO⁻), una specie radicalica generata dalla reazione molecolare del NO con l'anione superossido (O₂⁻) a livello delle *placche neuritiche*, costituisce uno dei più potenti agenti ossidanti in grado di indurre danno alle cellule neuronali. Diverse osservazioni sperimentali dimostrano che il *pathway* cellulare sia di p21ras che delle MAP-chinasi dipendenti da p21ras sono fortemente indotti nella malattia di Alzheimer ed un'espressione aberrante di p21 risulta co-localizzata ad un'espressione anomala dell'enzima iNOS (109). Inoltre, dati sperimentali indicano che il peptide β-amiloide è in grado di attivare l'espressione della iNOS in una linea cellulare ibrida rappresentata da cellule di *substantia nigra*/neuroblastoma (110). L'analisi *post-mortem* del cervello di soggetti affetti da malattia di Alzheimer documenta in genere un'aumentata immunoreattività per la nitrotirosina, un particolare *marker* dosabile indice di processi di nitrificazione, mediati dall'agente ossidante perossinitrito (ONOO⁻), a carico di residui di tirosina in proteine *target*, non rilevabile nel cervello di pazienti-controllo sani (1, 18, 36, 96). Nonostante le numerose osservazioni sperimentali indicanti l'attivazione del metabolismo del monossido d'azoto nella degenerazione di Alzheimer, l'analisi dei livelli di nitriti+nitrati (prodotti finali stabili derivati dalla degradazione del metabolita perossinitrito) nel liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti AD mostra dei valori comparabili a quelli di soggetti controllo (111). Numerose evidenze sperimentali hanno individuato nello stress ossidativo un fattore patogenetico cruciale per l'insorgenza e la progressione della malattia di Alzheimer. Il peptide β-amiloide sembra essere il principale responsabile di tale fenomeno, ed è stato inequivocabilmente dimostrato che la sua tossicità verso le cellule neuronali in cultura si attua attraverso la produzione di radicali liberi (50-51, 96). Questa, risulta dal concorrere di un insieme di eventi patogenetici volti a sostenere il quadro di stress ossidativo associato alla malattia di Alzheimer: oltre ad un'azione diretta, la β-amiloide presente nelle *placche neuritiche* è in grado di attivare le cellule della microglia, con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie ed ossidanti derivanti dall'attivazione dell'enzima inducibile iNOS e dalla conseguente sovrapproduzione di perossinitrito (50-51, 96); nei

neuroni che presentano anomalie del citoscheletro (NFTs) si accumula una notevole quantità di ferro che, come noto, è un potente catalizzatore della formazione di radicale ossidrilico; i mitocondri sono un *target* selettivo del danno da radicali liberi ed il peptide β -amiloide è un potente inibitore del complesso IV della catena respiratoria mitocondriale capace di indurre deplezione energetica, con conseguente imposizione di un circolo vizioso autosostentativo mediato da un progressivo aumento nella produzione di radicali liberi (50-51, 96, 112). Il cervello di pazienti AD è sottoposto a molte modificazioni biochimiche, inclusa l'alterazione nella sintesi e nella degradazione delle proteine, classicamente associata alla "cellular stress response" mediata dall'attivazione e dall'espressione di proteine da stress appartenenti al *pathway heat shock* (1-2, 5, 8, 12, 17-18, 36). Sia gli oligomeri del peptide $A\beta$ che la proteina *tau* iperfosforilata sono entrambi neurotossici ed innescano un'ampia varietà di meccanismi citoprotettivi, inclusa l'induzione di proteine *chaperonine*, le quali prevengono le alterazioni conformazionali di proteine *target* e la loro degradazione mediante il sistema dell'ubiquitina, contribuiscono all'eliminazione delle proteine dalla struttura conformazionale aberrante attraverso il sistema proteosomale ed il sequestro degli aggregati della proteina *tau* da parte di *chaperonine* intracellulari appartenenti al *pathway* delle *heat shock*, quali Hsp70 ed Hsp27, dotate di proprietà antiapoptotiche (113). Il complesso costituito dalla proteina *tau* iperfosforilata legata alla *chaperonina* Hsp70 è un substrato per la proteina ligasi E3 (CHIP) (114) la quale coopera insieme alle molecole *chaperonine* favorendo la corretta conformazione strutturale delle proteine e prevenendo la loro aggregazione anomala in formazioni fibrillari insolubili. Numerose evidenze sperimentali indicano che l'espressione del peptide umano $A\beta$ in animali *transgenici*, tipo *Caenorhabditis elegans*, può portare alla formazione di depositi intracellulari immunoreattivi (115). L'analisi fondata sulla spettrometria di massa di proteine specifiche che co-immunoprecipitano insieme al peptide β -amiloide ha permesso di identificare la presenza di proteine *chaperonine* come l'Hsp70 e di altre proteine *heat shock* (Hsp16), attribuendo in tal modo alla funzione *chaperone* un ruolo chiave nella modulazione del metabolismo intracellulare e della tossicità del peptide $A\beta$ (116). Recentemente, il coinvolgimento del sistema dell'eme ossigenasi (HO) alla base dei meccanismi anti-degenerativi operanti nella malattia di Alzheimer ha ricevuto una considerevole attenzione (12, 17-18, 31, 36), dal momento che è stato dimostrato che l'espressione dell'HO è strettamente associata a quella della proteina precursore del peptide amiloide (APP). Un significativo incremento nei livelli di espressione dell'mRNA per il *vitagene* HO-1 è stato osservato nella regione corticale, negli astrociti GFAP-positivi e nei vasi cerebrali del cervello di soggetti affetti da malattia di Alzheimer, in associazione ai *grovigli neurofibrillari* (NFTs) e alle *placche senili* (32, 117). In maniera del tutto interessante, alcuni ricercatori hanno identificato la relazione tra la distribuzione spaziale dell'HO-1 e l'espressione

patologica della proteina *tau* (32). Questi risultati dimostrano chiaramente che l'espressione della proteina *tau* e dell'HO-1 possono essere regolati dallo stress ossidativo in maniera coordinata, rafforzando l'idea che il *vitagene* HO-1 possa svolgere un ruolo chiave nella citoprotezione delle cellule neuronali (12, 96, 115). Alla luce delle più recenti scoperte ottenute in campo scientifico, un complesso enzimatico proteico ubiquitario, dato dalla tioredoxina/tioredoxina reduttasi (Trx/TRXr), è emerso come sistema *vitagene* coinvolto nella *tolleranza allo stress* del cervello e nel mantenimento dell'equilibrio redox (12, 17-18, 77-78, 96). Un crescente numero di studi riporta una stretta associazione tra l'*up-regulation* della Trx-1 nel sistema nervoso centrale e l'aumentata sopravvivenza neuronale dopo esposizione a danni degenerativi risultanti in un quadro patologico generale di stress ossidativo (77-78). Del tutto interessante, studi *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento culture primarie di neuroni ippocampali di ratto con la Trx proteina esogena incrementa notevolmente la loro vitalità contro la citotossicità data dal peptide β -amiloide (63). È stato riportato che la Trx potrebbe svolgere un ruolo protettivo nella patologia di Alzheimer e che un eventuale suo *deficit* potrebbe eventualmente contribuire ad aumentati livelli di stress ossidativo ed al conseguente processo neurodegenerativo (96). In contrasto ai ridotti livelli di espressione della proteina Trx, l'attività dell'enzima TRXr risulta elevata nelle aree cerebrali dell'amigdala e del cervelletto di pazienti AD. Un crescente numero di evidenze sperimentali, infatti, dimostrano una sovraespressione della Trx-1 a livello del sistema nervoso centrale (SNC) al fine di favorire la sopravvivenza neuronale in associazione a vari tipi di danno ossidativo e/o nitrosativo (118). Inoltre, un'aumentata induzione nei livelli di espressione della Trx-1 è stata registrata in diverse aree cerebrali, in corrispondenza di varie popolazioni cellulari in seguito a fenomeni di lesione meccanica dei nervi o dopo attacchi ischemici cerebrali transitori, sottolineando un'azione neuroprotettiva e rigenerativa espletata dalla Trx-1 a livello del cervello contro l'insulto ossidativo. Tra i pochi dati sperimentali presenti in letteratura sull'espressione del ciclo enzimatico della Trx/TRX nei processi neurodegenerativi, uno studio riporta incrementati livelli della proteina e dell'RNA sia nella sostanza grigia che bianca del cervello di pazienti AD (119). In maniera del tutto consistente, dati sperimentali ottenuti nel nostro laboratorio, oggetto del presente studio, forniscono una chiara evidenza sulla presenza di significativi livelli di espressione di entrambi i *vitageni*, HO-1 e TRX, nell'area cerebrale corrispondente al parietale inferiore di soggetti AD rispetto ad individui controllo (96). Per di più, le nostre indagini sperimentali hanno evidenziato nei pazienti AD la presenza di ridotti livelli plasmatici di GSH associata ad un significativo incremento di alcuni *biomarker* di stress ossidativo, inclusi il contenuto di GSSG e di proteine carboniliche, l'aldeide reattiva 4-HNE e la nitrotirosina. Inoltre, i linfociti di individui affetti da malattia di Alzheimer mostrano aumentati livelli di espressione dell'inducibile ossido nitrico sintetasi (iNOS) e delle

proteine da stress HO-1, Hsp72, Hsp60 e TRXr (96). E' verosimile che l'espressione coordinata del sistema enzimatico Trx/TRXr regola in maniera ottimale la funzione delle strutture nervose e fornisce un'adeguata difesa in risposta ad un'ampia varietà di condizioni da stress. Tali osservazioni supportano il ruolo cruciale svolto dallo stress ossidativo e/o nitrosativo nella patogenesi della malattia di Alzheimer ed indicano alcuni geni responsivi allo stress, inclusi l'HO-1 ed il sistema TRX/Trx, quali importanti *target* per innovative strategie citoprotettive e terapeutiche (12, 17, 36, 96). Data l'ampia proprietà citoprotettiva della risposta cellulare allo stress, attualmente vi è un forte interesse scientifico verso la scoperta e lo sviluppo di nuovi composti antiossidanti ed agenti farmacologici capaci di indurre le diverse proteine *heat shock* (Hsps) e di ritardare, inibire o revertire i principali eventi patofisiologici alla base della patologia di Alzheimer (17-18, 20, 31, 33, 36). Tali scoperte hanno aperto nuove prospettive sia nel campo della medicina che della farmacologia, così che molecole capaci di indurre questo particolare meccanismo cellulare difensivo appaiono essere possibili candidati per nuove strategie citoprotettive (12, 17-18, 20, 31, 33, 36). In particolare, la manipolazione dei meccanismi difensivi endogeni mediata dal mantenimento di un'adeguata espressione dei *vitageni* attraverso il trattamento con antiossidanti nutrizionali o composti farmacologici, può rappresentare un innovativo approccio nell'intervento terapeutico di malattie che causano danno tessutale, quale si verifica ad esempio nei disordini neurodegenerativi ed in altri stati patologici periferici. La possibilità che uno dei composti antiossidanti maggiormente utilizzati, come la vitamina E, costituisca un interessante strumento farmacologico per rallentare o prevenire lo sviluppo di tale disordine è stato oggetto di numerosi studi, sia *in vitro* che *in vivo*. *Trials* clinici documentano una riduzione nella concentrazione plasmatica della vitamina E negli individui Alzheimer rispetto ai soggetti sani (120). Esperimenti condotti su neuroni in cultura hanno dimostrato che la vitamina E è in grado di inibire o modulare la formazione di radicali liberi indotta dal trattamento con peptide β -amiloide (121). Il razionale d'azione corrisponde fondamentalmente all'attività antiossidante del tocoferolo e alla capacità di contrastare in maniera significativa gli effetti pro-ossidanti indotti dalla sostanza β -amiloide. Analogamente, è stato dimostrato che la vitamina E inibisce la perossidazione lipidica in sinaptosomi corticali trattati con β -amiloide. Il trattamento con il *Trolox*, una forma solubile di vitamina E, abolisce l'ossidazione delle proteine, misurata attraverso l'incremento di gruppi carbonilici, causata dal peptide β -amiloide in astrociti in coltura (122). Recenti indagini sperimentali indicano che la vitamina E è in grado di bloccare l'inibizione indotta dal peptide A β sulla funzione di molte proteine transmembranarie, inclusi il canale ionico della pompa ATPasi, i trasportatori del glucosio e del glutammato, le proteine G associate alla trasduzione del segnale e l'enzima creatina-chinasi coinvolto nel metabolismo energetico (123). Considerate in una visione

d'insieme, tutti gli studi clinici e sperimentali analizzati incoraggiano l'impiego di adeguate dosi giornaliere di vitamina E e di vitamina C nel trattamento del danno ossidativo centrale e periferico. L'impiego di alte dosi di vitamina E rappresenta il cardine paradigmatico di un approccio terapeutico mirato alla prevenzione ed al trattamento della patologia neurodegenerativa, inclusa la sintomatologia associata all'invecchiamento cerebrale **(123-124)**. In ultima analisi, è ormai assodato che i composti polifenolici, contenuti in spezie ed erbe naturali, sono dotati di potenti proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie e chemiopreventive. In particolare, il curcumino, un potente antiossidante ricavato dal *curry*, è emerso recentemente come un efficace agente induttore della risposta cellulare *heat shock* **(33)**. Alla luce di tali evidenze sperimentali, la supplementazione con curcumino è stata considerata da diversi ricercatori un innovativo ed alternativo approccio nutrizionale, di possibile applicazione clinica, in grado di ritardare e/o modulare uno delle più devastanti malattie degenerative centrali, incluso l'invecchiamento fisiologico **(12, 18, 33, 125)**.

LA SINDROME DI MENIERE'

La malattia di Menieré (MD) rappresenta una particolare sindrome, ovvero un'affezione idiopatica dell'orecchio interno, caratterizzata da una triade di sintomi clinici comprendenti episodi di vertigine, perdita neurosensoriale fluttuante dell'udito (ipoacusia), acufeni e senso di pienezza aurale o ovattamento (*fullness*) **(126)**. Tipicamente il paziente con malattia di Menieré sviluppa una sensazione di "orecchio pieno" associata ad ipoacusia ed acufeni nell'orecchio leso; a questi sintomi segue la vertigine intensa con carattere rotatorio, in genere oggettiva, associata a cospicua sintomatologia neurovegetativa, a nistagmo e disturbi dell'equilibrio. L'ipoacusia, prevalentemente di tipo trasmissivo nelle fasi iniziali della malattia, assume i caratteri di ipoacusia neurosensoriale, monolaterale, fluttuante inizialmente per diventare col tempo permanente progressiva con *recruitment* ed abbassamento della soglia del dolore. Da un punto di vista istopatologico, l'esame *postmortem* rivela la presenza di una distensione progressiva dello spazio endolinfatico dell'orecchio interno, nota come idropisia endolinfatica, la quale rappresenta la caratteristica patologica costante associata a tale disordine **(127)**. Un aumento improvviso ed abnorme di volume e di pressione dell'endolinfa in corrispondenza del labirinto membranoso dell'orecchio interno stimola le cellule contenute nel labirinto e causa la comparsa della triade sintomatologica tipica della malattia di Menieré **(126-127)**. A Prospero Menieré, il quale nel 1861 descrisse una sindrome caratterizzata da acufeni, ipoacusia e crisi vertiginose, va il merito di avere per primo correlato le vertigini, che fino ad allora erano considerate legate ad una patologia del sistema nervoso centrale, ad una patologia dell'orecchio interno **(128)**. Circa l'origine e l'eziopatogenesi di questa malattia si

sa molto poco; la diagnosi è complicata dal fatto che con il termine “*sindrome di Menieré*” si indicano spesso diverse patologie dell’orecchio interno. Numerosi fattori svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo dell’idropo endolinfatica e nella patogenesi della disfunzione cocleovestibolare ad essa correlata (129). Alla realizzazione della patofisiologia della sindrome di Menieré concorrono molti componenti eziologiche tra di loro assai diversi e scarsamente correlabili quali: la predisposizione genetica, l’autoimmunità, l’omeostasi del fluido endolinfatico, l’eccitotossicità, lo stress ossidativo e la morte cellulare per apoptosi, squilibri metabolici ed ormonali, alterazioni neurovegetative, fattori psicosomatici, processi infettivi dell’orecchio medio e interno, anomalie vascolari, processi malformativi, traumi (126, 130). A tali fattori corrisponde un unico effetto finale responsabile dei sintomi della Menieré, rappresentato dall’idropo endolinfatica, la quale è stata determinata per la prima volta da diversi ricercatori nella *cavia*, un modello animale di ELH caratterizzato da perdita dell’udito ottenuta mediante la chiusura chirurgica del dotto endolinfatico, riscontrata su numerosi rilievi istopatologici e legata o ad un’iperproduzione di endolinfa o ad un insufficiente riassorbimento dei fluidi nel sacco endolinfatico o ad un blocco del flusso longitudinale dell’endolinfa (129). Sebbene la sindrome di Menieré sia stata caratterizzata nel 1861 e l’idropo endolinfatica sia stata confermata nel 1938, rimane ancora da delucidare se l’idropo endolinfatica sia il processo patologico determinante per la disfunzione cocleovestibolare o se l’idropo rappresenti in realtà l’epifenomeno di alterazioni biochimiche subdole alla base di tale condizione patologica (129, 131). Evidenze sperimentali indicano che l’idropo endolinfatica costituisce la causa più importante per l’insorgenza dei sintomi alla base della malattia di Menieré e che le perturbazioni biochimiche cellulari, quali ad esempio il disequilibrio del normale bilancio ionico, precedono l’esordio dell’idropo determinando una disfunzione a livello dell’udito e del vestibolo (127). Sin dalla descrizione fornita da *Guild* nel 1927, la teoria sul flusso longitudinale del liquido endolinfatico è stata ampiamente accettata. Secondo tale teoria, l’endolinfa è prodotta nel dotto cocleare e successivamente fluisce in modo unidirezionale nel sacco endolinfatico, dove viene riassorbita. L’interruzione di tale flusso si traduce in un accumulo dell’endolinfa nel compartimento a monte e nella conseguente insorgenza dell’idropo. Tale teoria è opposta a quella relativa al flusso radiale, secondo cui l’endolinfa è prodotta e riassorbita attraverso lo spazio endolinfatico, regolata da diversi fattori locali, comprendenti varie molecole e canali ionici, tipo le acquaporine, coinvolti nell’omeostasi dell’endolinfa (127, 132). La sindrome di Menieré interessa entrambi i sessi; l’età di esordio è collocata nella quinta decade di vita per i maschi e nella quarta per le femmine (133). Tra i possibili fattori eziopatogenetici alla base dell’insorgenza e della progressione di tale disordine, un ruolo fondamentale è stato attribuito alla presenza di alcuni geni candidati. Infatti, una predisposizione genetica è stata riscontrata in un gruppo di individui con sindrome di Menieré di

tipo familiare, comprendente il 2.6%-12% dei pazienti con diagnosi certa **(130, 134)**. Analisi di *linkage* e studi di popolazione hanno permesso di individuare un potenziale gene localizzato sul cromosoma 14 (*COCH* gene) **(134)**. È stato dimostrato che tale gene è correlato ad evidenti processi di ipoacusia neurosensoriale dovuti ad alterazioni cromosomiche di tipo autosomico dominante a livello del *locus* genico DFNA9 **(130, 135)**. Un'ulteriore evidenza sperimentale a supporto della teoria genetica alla base di tale disordine multisistemico è data dall'osservazione scientifica riguardante una stretta associazione tra la malattia di Menière ed antigeni appartenenti al sistema HLA (HLA-A3, B7, CW7 e DR2 **(130)**). Nella sindrome di Menière, tra le diverse cause patogenetiche normalmente riconosciute, lo stress ossidativo è stato postulato **(126, 136-137)**. Crescenti evidenze sperimentali indicano che lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale nell'ipoacusia neurosensoriale ed in alcuni processi ototossici causati dal trattamento con chemioterapici antineoplastici **(126, 136-137)**. Studi sperimentali hanno dimostrato che lo stress ossidativo e/o nitrosativo, in particolare le specie radicaliche derivate dal metabolismo dell'azoto, svolge un ruolo emergente nell'esordio del processo patologico alla base di alterazioni croniche dell'orecchio comprendenti labirintiti e cocleovestiboliti **(126, 136-138)**. Recenti osservazioni scientifiche hanno permesso di evidenziare in un modello sperimentale di idrope endolinfatica (ELH) un incremento significativo nell'espressione dell'inducibile ossido nitrico sintetasi (NOS II) correlato all'accumulo di grandi quantità di NO, a livello dell'organo del Corti, delle cellule gangliari a spirale e del vestibolo **(126, 136, 139-140)**. In diversi tessuti e tipi cellulari l'aumentata sintesi di NO è associata alla produzione di ROS, così come all'eccessiva formazione di perossidi lipidici, radicali idrossilici e del potente agente ossidante perossinitrito (ONOO⁻) **(5, 50-51)**. Il perossinitrito è un agente ossidante altamente reattivo e proapoptotico ad elevate concentrazioni. È stato riportato che l'idrope endolinfatica può portare ad un'attivazione cronica della NOS I associata all'attivazione dei recettori per il glutammato di tipo NMDA e quella della NOS II, causando un danno neuronale mediato da fenomeni di eccitotossicità **(140-141)**. Recenti studi sperimentali indicano che sia il glutammato che anche altri aminoacidi eccitatori sono presenti nella coclea dei mammiferi ed essi sembrano svolgere un ruolo cruciale nel processo di neurotrasmissione uditiva afferente **(141)**. Gli stessi aminoacidi però, se presenti in elevata quantità, possono portare a fenomeni di eccitotossicità causando dei danni irreversibili ed eventualmente la morte selettiva dei neuroni gangliari a spirale così come dei dendriti delle cellule capellute **(139, 141)**. Indagini sperimentali hanno permesso di osservare, da un punto di vista istomorfologico, la presenza di evidenti fenomeni di degenerazione delle cellule sensoriali e dei tessuti di supporto, inclusa la stria vascolare, a livello dell'apparato uditivo mediati da danno ossidativo ed insulti apoptotici **(137)**. Aumentati livelli di perossinitrito in corrispondenza della regione sinaptica delle

cellule capellute potrebbe portare alla nitrosilazione di importanti recettori sinaptici, quali ad esempio i recettori NMDA. E' stato riportato che il processo di *S*-nitrosilazione di alcune subunità dei recettori NMDA potrebbe incrementare la funzione di tali recettori nel cervello, un meccanismo molecolare che potrebbe svolgere un ruolo cruciale anche nella coclea (141). Inoltre, è stato osservato che il trasportatore per il glutammato GLAST è essenziale nel mantenimento dei livelli non tossici del glutammato nella coclea (142). Studi scientifici mostrano che i livelli di mRNA per il trasportatore GLAST e dell'enzima glutatione sintetasi (un *marker* biochimico indiretto correlato al processo di eccitotossicità) sono significativamente incrementati in alcune condizioni patologiche dell'orecchio interno (143). Tali osservazioni aprono nuove prospettive di intervento per il trattamento terapeutico di stati patologici caratterizzati da ipoacusia neurosensoriale associata all'idrope endolinfatica. Sebbene l'idrope endolinfatica sia in grado di indurre l'espressione della NOS II, i livelli di stress ossidativo, la morte cellulare per apoptosi, attualmente esistono poche evidenze sperimentali relative ad una possibile associazione tra il processo di eccitotossicità e l'idrope endolinfatica (130). E' ormai ben documentato che lo stress ossidativo e/o nitrosativo mediato da specie radicaliche altamente reattive sia la principale causa di danno ai complessi mitocondriali e a macromolecole biologiche fondamentali, quali il DNA, i lipidi e le proteine di membrana (1-2, 12, 18, 36). L'analisi immunoistochimica dell'orecchio interno della *cavia*, modello animale dell'idrope cocleare, ha evidenziato un significativo incremento nell'espressione di alcuni *biomarker* di stress ossidativo e/o nitrosativo e di alcuni fattori apoptotici, quale la proteina caspasi 3, a livello delle cellule gangliari a spirale, dei vasi sanguigni, dei fibrociti e delle cellule di supporto dell'organo del Corti (140, 144). Anche i livelli di nitrotirosina un particolare *biomarker* indice di stress nitrosativo e degli 8-isoprostani, prodotti metabolici derivati da progressivi processi di perossidazione lipidica, risultano incrementati rispettivamente nelle cellule gangliari a spirale dell'orecchio, nei vasi sanguigni del legamento a spirale e nella stria vascolare, supportando l'idea di un coinvolgimento dato da intensi livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo alla base del determinismo patogenetico della sindrome di Menieré (137). Modelli *in vitro* hanno mostrato recentemente che aumentati livelli di NO e di anioni superossido possono esercitare un effetto negativo sul sistema delle *gap junctions* cocleare, diminuendo il riciclo di determinati ioni, in particolare del potassio, nelle cellule di supporto così come nella stria vascolare e determinando pertanto delle alterazioni nel potenziale endococleare, uno dei possibili meccanismi molecolari patogenetici ipotizzati alla base dell'idrope endolinfatica (ELH) (145). Crescenti evidenze sperimentali supportano il ruolo dello stress ossidativo alla base del determinismo patogenetico dell'idrope endolinfatica e della perdita neurosensoriale associata a processi di morte cellulare riscontrati nella malattia multisistemica di Menieré (126, 137). Per di più, è ben documentata

l'ipotesi sperimentale in base alla quale la riduzione nell'espressione e/o attività di proteine antiossidanti contribuisce ad incrementare i livelli di stress ossidativo, i quali accelerano l'invecchiamento e le neurodegenerazioni (12, 125, 146-147). L'abilità della cellula di contenere condizioni da stress, nota come risposta cellulare allo stress, richiede l'attivazione di *pathways* di vitalità cellulare associati all'induzione di molecole dotate di attività antiossidante ed antiapoptotica (12, 18, 31, 33, 36). Tra queste ultime, i *vitageni*, incluse le proteine *heat shock* HO-1 ed Hsp70 ed il sistema della tioredoxina (TRXr/TRX), hanno un ruolo emergente nell'indurre citoprotezione contro vari tipi di insulti di tipo ossidativo e/o nitrosativo (34, 146-147). La risposta cellulare allo stress, una volta indotta, è in grado di ripristinare l'omeostasi e l'equilibrio redox cellulare. Emergenti evidenze, indicano che l'attivazione di *pathways* cellulari antiossidanti risulta particolarmente importante soprattutto per le cellule cerebrali, caratterizzati in generale da ridotte difese antiossidanti, inclusi i neuroni a spirale gangliari dell'orecchio coinvolti nell'insorgenza della sindrome di Menieré (126). Alterazioni dello stato redox, date da un aumento nel contenuto di prodotti di perossidazione lipidica (HNE) o di proteine carboniliche (PC), può modificare l'equilibrio redox cellulare portando a danno tissutale. Inoltre, è noto come la normale funzione uditiva dipenda dal mantenimento di un'adeguata composizione ionica dell'endolinfa nell'orecchio interno, dato principalmente dall'attività dell'anidrasi carbonica (CAII) (18, 31, 148). I dati sperimentali ottenuti nel nostro laboratorio, oggetto del presente studio, indicano che la neurotossicità è un evento primario mediatore di danno alla base della patogenesi della sindrome di Menieré ed evidenziano la presenza di *biomarkers* correlabili alla risposta cellulare allo stress, misurabili in campioni di sangue periferico di pazienti MD affetti. Il presente studio, inoltre, valorizza l'ipotesi sperimentale in base alla quale eventuali alterazioni nel sistema redox TRXr/TRX, uno dei principali sistemi antiossidanti endogeni, associate ad un'abnorme espressione ed attività dell'enzima anidrasi carbonica, possono incrementare i livelli di stress ossidativo portando ad un'alterazione dell'omeostasi redox sistemica, la quale determina morte dei vulnerabili neuroni a spirale gangliari con conseguente degenerazione cellulare.

STUDIO GENETICO-MOLECOLARE DEL GENE NF1 IN CASI CLINICI DI ETA' PEDIATRICA

Con il termine di "Neurofibromatosi" (NF) si indica un gruppo di sindromi ereditarie definite "neurocutanee" le cui manifestazioni cliniche, estremamente variabili ed eterogenee, comprendono una serie di anomalie displasiche e/o neoplastiche a livello di vari organi e sistemi tissutali (sistema nervoso, occhio, cute, ossa, ghiandole endocrine, ecc.) (149). Le ultime due decadi sono state

fondamentali per la caratterizzazione clinica e molecolare delle neurofibromatosi che si differenziano tra loro per decorso, complicanze e geni coinvolti. Suddivise convenzionalmente in sette tipi distinti di varianti di malattie ereditarie, le forme più comuni sono rappresentate dalla Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) o malattia di *von Recklinghausen* e dalla Neurofibromatosi di tipo 2 (NF2) o neurofibromatosi centrale o schwannoma acustico bilaterale **(149-151)**. Altre forme descritte appartenenti a tale gruppo eterogeneo di disordini neurogenetici e periferici includono la Neurofibromatosi segmentale o a mosaico, la sindrome di Watson e la sindrome di Noonan **(152)**. La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) o malattia di *von Recklinghausen* è una delle più comuni patologie genetiche, a trasmissione autosomica dominante, che colpisce approssimativamente da 1/3000 a 1/4000 individui nati vivi **(153)**. La sua prevalenza è stata stimata tra 1 e 10,4 per 10000 in differenti popolazioni senza alcuna distinzione geografica e/o etnica **(153-154)**. La Neurofibromatosi di tipo 1 è determinata da alterazioni di una delle due copie del gene NF1, localizzato nella porzione pericentromerica del braccio lungo del cromosoma umano 17 (17q11.2) ed è trasmessa da un genitore affetto al 50% della progenie, indipendentemente dal sesso **(155-156)**. Nella metà dei casi clinici osservati tuttavia la malattia è dovuta a mutazioni “*de novo*” in soggetti nati da genitori geneticamente indenni. La Neurofibromatosi di tipo 1 rappresenta una condizione patologica ed un disordine multisistemico da un punto di vista clinico e fenotipico estremamente variabile **(149)**. I soggetti portatori del gene alterato manifestano sempre la malattia (penetranza completa), anche se in entità diversa (espressività variabile) non solo da soggetto a soggetto, ma anche all’interno dello stesso nucleo familiare. La diagnosi di Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) viene posta esclusivamente per mezzo di valutazione clinica, in base alla presenza di almeno due dei *criteri* diagnostici stabiliti nel 1988 dalla “*National Health Institute Consensus Conference*” e comprendenti: 1) più di 5 macchie caffè-latte con diametro > 5mm nei pazienti prepuberi; più di 5 macchie caffè-latte con diametro >15 mm nei pazienti post-puberi; 2) efelidi ascellari, inguinali o al collo; 3) due o più noduli di *Lisch* (o amartomi) nell’iride; 4) due o più neurofibromi cutanei o un neurofibroma plessiforme; 5) una lesione ossea specifica (cifoscoliosi, displasia della grande ala dello sfenoide, incurvamento della tibia); 6) glioma del nervo ottico; 7) un parente di primo grado affetto da Neurofibromatosi di tipo 1, la cui diagnosi è in accordo con i *criteri* sopra citati. Questi criteri possono essere utili per la diagnosi e la valutazione clinica, ma non rivestono in generale alcun valore prognostico sulla severità del quadro clinico e delle complicanze ad esso correlate **(157) (Fig A,B)**. La Neurofibromatosi di tipo 1 rappresenta una sindrome neurogenetica progressiva nella quale alcune complicanze e manifestazioni cliniche si presentano in determinate età del soggetto affetto, mentre altre diventano più gravi nel tempo **(158-160)**. Il segno clinico più precoce di tale disordine genetico è rappresentato dalla comparsa di macchie caffè e latte, lesioni maculari

uniformemente pigmentate e di forma rotondeggiante od ovoidale che solitamente sono già presenti nei primi mesi di vita (8-12 mesi). Tuttavia, possono aumentare di misura e di numero nei soggetti di età compresa tra i 5 ed i 7 anni **(158-161)**. In genere, le macchie caffè e latte compaiono su tutta la superficie del corpo, ma più frequentemente si osservano a livello del tronco e degli arti. Altro elemento diagnostico caratteristico di tale disordine genetico è rappresentato dalla comparsa di efelidi (*freckling*), presenti in aree del corpo non esposte alla luce, come ai lati del collo, nel cavo ascellare o all'inguine, entro 5-6 anni di età **(158)**. Studi clinici indicano che la presenza di *freckling*, osservabili in percentuale variabile nel 60-90% dei casi a seconda dell'età dei soggetti, riveste un significato diagnostico quando si osservano al collo, in regione ascellare, inguinale e sotto-mammaria. Altre manifestazioni cliniche associate alla Neurofibromatosi di tipo 1 includono la presenza di noduli di *Lisch* o amartomi, tipiche aree rilevate iperpigmentate dell'iride di colore variabile dal giallo al marrone presenti nel 94% dei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 con 6 anni di età **(158, 162)**. *Trials* clinici suggeriscono che tali lesioni oculari aumentano di numero con il progredire dell'età e che non si osservano nei soggetti sani o negli individui affetti da Neurofibromatosi di tipo 2 **(151, 158, 163)**. Per di più, osservazioni scientifiche affermano che i noduli di *Lisch* non sono correlati al grado di severità del quadro clinico, né ad alterazioni della funzione organica dell'occhio; tuttavia, la loro comparsa può aiutare a formulare la diagnosi **(158-163)**. Un'altra caratteristica fisica e segno clinico associati a tale disordine multisistemico sono rappresentati dalla presenza e dal progressivo sviluppo di alcuni tipi di neoplasie, più specificatamente del neurofibroma **(158, 160-161)**. I neurofibromi rappresentano i più comuni tumori osservati nei casi di Neurofibromatosi di tipo 1 **(164)**. Sono costituiti per la maggior parte da cellule di Schwann, ma anche da cellule perineurali, fibroblasti e mast-cellule. Malgrado la loro composizione multicellulare, i neurofibromi presentano un'origine clonale ed è stato riportato che soltanto le cellule di Schwann mostrano una seconda mutazione a carico del gene NF1 **(164-165)**. Tali formazioni benigne si possono sviluppare sia sulla superficie della pelle (neurofibroma dermale) che in aree più profonde del corpo umano (neurofibroma plessiforme). I neurofibromi periferici cutanei e sottocutanei possono comparire come "rilievi", a causa dell'arrossamento della pelle dovuto alla dilatazione o alla proliferazione dei vasi capillari, e sono presenti nel 14% dei pazienti con meno di 10 anni di età, nel 44% dei soggetti di età compresa tra 10 e 19 anni, nell'85% degli individui tra 20-29 anni e nel 94% dei soggetti adulti al di sopra dei 30 anni di età **(158)**. Indagini diagnostiche mostrano che la comparsa iniziale dei neurofibromi può fornire una certa indicazione sulla severità futura delle manifestazioni cutanee correlate alla sindrome ereditaria della Neurofibromatosi di tipo 1. Infatti, è stato osservato che più precoce è l'età di comparsa di tali lesioni cutanee di natura benigna, maggiore sarà il numero e più ampia sarà la distribuzione dei

neurofibromi cutanei **(158, 161)**. I neurofibromi plessiformi, tumori diffusi associati ad iperplasia del tessuto circostante, appaiono invece come masse di consistenza molle con cute liscia o raggrinzita. A differenza dei neurofibromi cutanei e sottocutanei, i quali sono in genere di ridotte dimensioni, i neurofibromi plessiformi sono di tipo infiltrativo e possono trasformarsi in tumori maligni. Sono presenti in circa il 25% dei pazienti affetti con diagnosi certa di Neurofibromatosi tipo 1 e rappresentano delle lesioni di natura congenita, ma possono imprevedibilmente svilupparsi nelle età successive. I neurofibromi plessiformi originano dal tronco dei nervi principali del corpo da cui possono estendersi in superficie o svilupparsi in profondità coinvolgendo tutti i livelli del derma, le fasce muscolari, le ossa e perfino i visceri e rimanere clinicamente silenti per lungo tempo **(158, 161, 166)**. Il significato clinico legato alla presenza dei neurofibromi plessiformi è essenzialmente di due tipi: 1) estetico, legato al fatto che possono raggiungere dimensioni notevoli e localizzarsi in zone “*delicate*” (viso, collo, arti superiori); 2) prognostico, dal momento che possono andare incontro a trasformazione maligna **(166-167)**. Lo sviluppo dei neurofibromi plessiformi può essere aggressivo e progressivo, particolarmente durante l’infanzia ed il periodo pre-adolescenziale/adolescenziale; pertanto, tali lesioni devono essere controllate molto attentamente in modo da poter fornire un intervento terapeutico tempestivo **(158, 161, 166-167)**. Per quanto riguarda tentativi di eventuali trattamenti farmacologici dei neurofibromi, negli ultimi anni sono stati effettuati studi su modelli animali con il pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone), un farmaco antifibrotico già ampiamente noto come inibitore della crescita dei fibroblasti e della sintesi di collagene. Gli studi sperimentali volti a valutarne l’eventuale efficacia come inibitore della crescita e della progressione dei neurofibromi, hanno dimostrato che nel topo il pirfenidone non ha effetti tossici e riduce la sopravvivenza del neurofibroma **(168)**. *Trials* clinici sull’uomo sono attualmente in fase II di sperimentazione per testare l’efficacia del farmaco pirfenidone sulla riduzione delle dimensioni del neurofibroma in pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 **(169)**. Infine, evidenze cliniche dimostrano che la Neurofibromatosi di tipo 1, un disordine genetico-molecolare multisistemico, può essere associata, in una ridotta percentuale di pazienti affetti, all’insorgenza di altre complicanze cliniche quali il glioma delle vie ottiche, le anomalie ortopediche e le lesioni osteoarticolari (scoliosi, pseudoartrosi degli arti, displasia dell’ala dello sfenoide, deformità delle ossa lunghe), le manifestazioni neurologiche (*deficit* cognitivi, disturbi dell’apprendimento, incoordinazione visuo-spaziale, *deficit* motori) **(150, 158, 161, 170-173)**. Il glioma del nervo ottico rappresenta il tumore più comune del sistema nervoso centrale nei pazienti con diagnosi di Neurofibromatosi tipo 1. Studi clinici indicano che tale tumore cerebrale compare generalmente prima dei sei anni di età con un’incidenza che varia dal 5% al 25% dei soggetti affetti **(170)**. I sintomi clinici più comuni correlati alla presenza del glioma delle vie ottiche, astrocitoma

pilocitico che insorge in età prescolare e scolare, includono alterazioni del *visus* con marcato decremento dell'acuità visiva, anomalie oftalmologiche con alterazioni della funzione pupillare, diminuita visione dei colori ed atrofia del nervo ottico, lo strabismo, l'emicrania e la disfunzione ipotalamica (174). I bambini affetti da glioma ottico limitato allo spazio intraorbitario o a lenta espansione non infiltrativa, devono essere monitorati dal punto di vista oculistico, neurologico e neuroradiologico. Osservazioni cliniche, in particolare studi multidisciplinari coinvolgenti bambini affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 hanno riportato la presenza di pubertà precoce esclusivamente in quei pazienti con glioma delle vie ottiche. Le opzioni terapeutiche per il trattamento del glioma delle vie ottiche includono interventi chirurgici, radio o chemioterapia o una combinazione di queste metodiche. Lo *screening* di routine con neuroimmagini (MRI) può portare alla precoce individuazione del glioma delle vie ottiche, anche se nella maggior parte dei casi queste lesioni oculari non progrediscono al punto da richiedere un trattamento. Indagini cliniche, inoltre, hanno mostrato un'elevata incidenza, pari al 30%-50%, di alcune manifestazioni scheletriche ed anomalie ossee nei bambini affetti da NF1, costituite nella maggioranza dei casi da deformità vertebrali (cifoscoliosi, lordoscoliosi associata ad alterazioni vertebrali displasiche, scoliosi idiomatica associata a neurofibromatosi (150, 171, 175). Fra le molte manifestazioni cliniche alla base della Neurofibromatosi di tipo 1 è di notevole rilievo clinico la complicanza ortopedica rappresentata dalla pseudoartrosi delle ossa lunghe, in genere della tibia e perone (176). La displasia delle ossa lunghe è una complicanza rara che colpisce prevalentemente la tibia determinandone un incurvamento, osservabile già nei primi mesi di vita. Inoltre, la displasia dell'ala dello sfenoide è in generale una lesione assai rara, ma specifica per la diagnosi di Neurofibromatosi di tipo 1 (150, 158). I tumori maligni della guaina dei nervi periferici (MPNST) rappresentano le forme neoplastiche con prognosi peggiore per i pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1. L'analisi genetico-molecolare dell'ampio spettro di mutazioni riscontrate in soggetti NF1 suggerisce che la presenza di ampie delezioni del gene associato a tale condizione patologica determina un aumentato rischio di sviluppare tumori della guaina dei nervi periferici (MPNST) (177). L'indagine molecolare dei MPNST ha comunque dimostrato l'esistenza di altre alterazioni oltre alla delezione del gene NF1, quali la soppressione omozigote del gene oncosoppressore p16 (178) e l'espressione della glicoproteina di superficie CD44, quest'ultima correlata con un fenotipo tumorale altamente invasivo (179). Oltre, ai tumori maligni della guaina dei nervi periferici (MPNST), evidenze cliniche e sperimentali, indicano che la Neurofibromatosi di tipo 1 è caratterizzata da un aumentato rischio di insorgenza di altre rare neoplasie, quali il feocromocitoma, il rabdomiosarcoma, la leucemia mieloproliferativa e mielodisplasica, gli xantogranulomi (150, 158, 180). Infine, le manifestazioni neuropsicologiche rappresentano le complicanze cliniche più comuni associate

all'insorgenza e progressione di tale disordine genetico, con una frequenza che varia dal 30% al 60%. La presenza di ritardo mentale nei soggetti affetti da NF1 è stata a lungo dibattuta ed in passato sicuramente sovrastimata a causa di errori nel reclutamento del campione e nella valutazione clinica: mancanza di criteri diagnostici formali, misure inadeguate delle abilità neuropsicologiche e mancata esclusione dei pazienti con patologia del sistema nervoso centrale **(173, 181)**. Per quanto riguarda lo sviluppo psicomotorio e cognitivo, la maggior parte degli studi clinici condotti in questi ultimi venti anni ha registrato la presenza di specifiche difficoltà di apprendimento (*specific learning disability*), definite come una bassa *performance*, tipicamente scolastica, non legata a *deficit* sensitivi, motori o a problemi emozionali con una percentuale che varia dal 30% al 65%, riportate in varie aree cerebrali deputate alla percezione, alle funzioni esecutive ed al linguaggio **(173, 182)**. Inoltre, dall'analisi di diversi studi sulla popolazione affetta da Neurofibromatosi di tipo 1 in generale si è evidenziato un lieve decremento del quoziente intellettivo (QI) i cui valori tuttavia non si differenziano in maniera significativa dalla popolazione normale e pertanto collocabili nel *range* di normalità **(183)**. Gli aspetti psicologici solo recentemente sono diventati di grande interesse clinico e scientifico. *Deficit* di tipo visuo-spaziale sono stati riportati già nei primi studi clinici riguardanti il fenotipo neuropsicologico in pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1. Tali *deficit* sono stati evidenziati ricorrendo sia a prove di tipo visuo-percettivo che visuo-costruttivo **(173, 181)**. Infine in ultima analisi, altre complicanze cliniche abbastanza rare, presenti in meno del 5% dei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1, includono l'epilessia, i tumori intracranici, l'idrocefalia, la stenosi dell'arteria renale e le alterazioni del sistema cardiovascolare **(150, 158)**. Tra le complicanze cerebrovascolari, vengono riportate arteriopatie sia di tipo stenocclusivo che dilatativo responsabili di eventi di tipo sia ischemico che emorragico inclusa l'emorragia sub aracnoidea, in pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 **(184)**. Evidenze cliniche e sperimentali riportano la presenza di un'augmentata incidenza di malattie cardiovascolari, inclusi i disordini ostruttivi vascolari e le vasculopatie, nei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1. Una delle più comuni lesioni vascolari riscontrate in pazienti NF1 è rappresentata dalla stenosi dell'arteria renale associata ad ipertensione sistemica **(185)**. Inoltre, dati in letteratura dimostrano che l'espressione del gene NF1 a livello endoteliale in modelli animali svolge un ruolo critico per il normale sviluppo dell'apparato cardiovascolare. E' stato ipotizzato che la vasculopatia osservata in pazienti NF1 sia dovuta fondamentalmente a fenomeni di disregolazione del sistema Ras associata a *down-regulation* della proteina neurofibromina i quali portano ad un abnorme proliferazione ed iperplasia della neointima delle cellule endoteliali del muscolo liscio dopo danno vascolare contribuendo alla patogenesi di tale disordine **(185)**. Evidenze clinico-diagnostiche suggeriscono che i problemi estetici insieme ai difetti fisici e cognitivi

comunemente associati alla sindrome genetica neurocutanea NF1 portano in generale ad un impatto negativo sulla qualità della vita e a problematiche psicologiche nei bambini e negli adolescenti affetti. Anche se il *self-concept* dei bambini e degli adolescenti con diagnosi di Neurofibromatosi di tipo 1 sembra essere normale (186), sono spesso riportati problemi comportamentali e sociali (187). Per di più, è frequentemente riscontrato nei bambini e negli adolescenti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 una prevalenza del disturbo da *deficit* di attenzione/iperattività (ADHD) molto più elevata che nella popolazione generale (173). Tutti questi dati evidenziano la necessità di sottoporre tutti i pazienti in età pediatrica affetti da Neurofibromatosi di tipo 1, ed in particolare quelli con glioma delle vie ottiche, ad una periodica valutazione clinica, volta al precoce riconoscimento delle possibili complicanze centrali e/o sistemiche associate a tale condizione patologica. Tali complicanze sono osservabili durante l'età pediatrica e poco oltre e la loro incidenza tende a diminuire con il progredire dell'età. In definitiva, è possibile concludere affermando che le problematiche osservate inerenti la sindrome genetica della Neurofibromatosi di tipo 1 vanno di volta in volta affrontate e valutate da un punto di vista clinico in un'ottica multidisciplinare (150, 159). Il gene associato all'insorgenza della Neurofibromatosi di tipo 1 rappresenta uno dei geni più complessi e di più ampie dimensioni dell'intero genoma umano (circa 300-350 Kb) e specificatamente appartiene alla famiglia dei geni onco-soppressori. Il gene NF1, localizzato nel braccio lungo del cromosoma umano 17 (17q11.2), è costituito da almeno 57 esoni, 4 dei quali derivano da meccanismi di *splicing* alternativo, e codifica per un mRNA di 12 kb con una *open reading frame* di 8,454 nucleotidi (2,10) (150, 159, 188) (Fig C). Il prodotto proteico derivato dall'espressione del gene NF1 è una proteina citoplasmatica di grandi dimensioni denominata neurofibromina (320Kda), la cui attività biologica è modificata nei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) (189). Studi sperimentali indicano la presenza in una larga regione intronica di 60 Kb del gene NF1 di tre geni non correlati o *pseudogeni*, rispettivamente EV12A, EV12B ed OMG, i quali sono trascritti in direzione opposta (190) (Fig C). La proteina neurofibromina, già espressa durante l'embriogenesi nell'encefalo e nel midollo spinale, si rileva anche in molti tipi di cellule differenziate, inclusi le cellule piramidali, i neuroni degli strati della corteccia 2 e 5, le cellule di Purkinje, le cellule di Schwann e gli oligodendrociti, i vasi sanguigni, i muscoli e lo scheletro (189, 191). L'analisi strutturale della sequenza aminoacidica della neurofibromina ha permesso di individuare un dominio funzionale ben definito denominato RasGAP (192) e due domini strutturalmente analoghi alle proteine SEC 14p e PH (189). La neurofibromina presenta una regione di 360 aminoacidi, denominata NF1-GRD (*GAP-related domain*), la quale mostra un'omologia con il dominio catalitico delle "GTP-ase activating protein" (GAP) dei mammiferi ed è in grado di svolgere una regolazione negativa sull'attività dell'oncogene

p21ras **(191)**. Questo particolare ruolo biologico svolto dalla neurofibromina consente di inquadrare il gene NF1 nella categoria dei geni oncosoppressori. La neurofibromina quindi, avendo funzione di GAP (*GTPase Activating Protein*), inattiva p21ras bloccando la proliferazione e la differenziazione cellulare **(193)**. La proteina p21ras svolge un ruolo centrale nei processi di differenziamento e di crescita cellulare, trasducendo il segnale dalla membrana plasmatica al nucleo. La neurofibromina, attraverso il suo dominio NF1-GRD, incrementa l'idrolisi del GTP e funziona da oncosoppressore riducendo l'attività di p21ras **(191-193)**. Durante la formazione del complesso p21ras-NF1, la proteina p21ras attivata si lega in una specifica regione del dominio centrale catalitico della proteina NF1 contenente un motivo strutturale costituito da residui di arginina **(193)**. Una volta attivata p21ras è in grado di indurre l'espressione di numerose proteine chinasi e di diversi fattori di trascrizione, quali AMPc e CREB, coinvolti nell'espressione di geni che controllano una serie di processi cellulari, inclusi il ciclo cellulare, l'apoptosi, il differenziamento o la migrazione cellulare. Mutazioni oncogeniche del gene Ras e la riduzione o l'assenza della proteina neurofibromina determinano l'attivazione della proteina p21ras la quale stimola la cascata di segnali cellulari (Raf-MEK-ERK o MAPK) coinvolti nella proliferazione cellulare ed all'insorgenza di un fenotipo tumorale **(191) (Fig D)**. La maggior parte della neurofibromina risiede all'interno del citoplasma (almeno 2/3), solo approssimativamente il 25% è debolmente legato alla membrana cellulare. Numerosi studi mostrano l'esistenza di una specifica interazione tra la proteina neurofibromina ed i microtubuli del citoscheletro sia in modelli sperimentali *in vivo* che *in vitro* **(194)**. E' stato riportato che tale interazione molecolare sembra essere correlata ai processi di sviluppo e differenziazione neuronale **(194-195) (Fig D)**. Osservazioni sperimentali indicano che la neurofibromina è in grado di legare una classe di proteoglicani denominati *syndecan* **(196)**. Tali proteine, largamente espresse nei neuroni e nella glia, svolgono un ruolo chiave nei processi biologici di adesione intercellulare, nel movimento cellulare, nella morfogenesi tessutale e nei fenomeni di *signaling* intracellulari, agendo spesso come recettori o co-recettori di fattori di crescita e/o di differenziazione cellulare. Evidenze sperimentali indicano che il dominio della neurofibromina con funzione GAP è implicato nell'associazione della proteina ai microtubuli e ciò suggerisce una possibile correlazione tra azione inibitrice della neurofibromina sulla proteina p21ras ed associazione ai microtubuli **(194-196)**. Recentemente, alcuni ricercatori hanno dimostrato che la neurofibromina è in grado di legarsi alla CAV-1, una proteina integrale di membrana implicata nella regolazione di molecole coinvolte in processi di trasduzione del segnale, quali p21ras, la proteina chinasi C e vari recettori per fattori di crescita **(197)**. Dati riportati in letteratura mostrano che il complesso neurofibromina-CAV-1 può inattivare e modulare l'espressione di diverse molecole-segnaie p21ras-GDP, p21ras/MAPK, PI3K/Akt, le quali mediano alcuni *pathway* cellulari, inclusi la proliferazione ed il differenziamento

cellulare **(197) (Fig D)**. Inoltre, dati riportati in letteratura indicano che la neurofibromina è coinvolta nell'attivazione dell'AMPC, agendo con effetto diretto sulla funzione cognitiva e sul processo di apprendimento in molte specie animali tra cui *Drosophila melanogaster*. Anche nei mammiferi la neurofibromina contribuisce a regolare i livelli di AMPC nei neuroni, modulando a sua volta la crescita e la differenziazione cellulare **(198)**. Quattro differenti meccanismi di *splicing* alternativi rispettivamente degli esoni 9a, 10a-2, 23a e 48a del gene NF1 sono responsabili della sintesi di cinque diverse *isoforme* di neurofibromina, le quali sono localizzate in specifici tessuti **(191, 199-202)**. La neurofibromina di tipo I rappresenta un eccellente regolatore dell'attività della proteina p21ras ed è stata riscontrata prevalentemente nel cervello dove svolge un ruolo essenziale nel normale sviluppo cognitivo **(191)**. La neurofibromina di tipo II, definita anche GRD2, deriva dall'inserzione dell'esone 23-a ed è espressa in maniera predominante nelle cellule di *Schwann*. Studi sperimentali indicano che tale *isoforma* è essenziale per la normale funzione cerebrale e che il suo dominio catalitico associato alle proteine GAP modula i fisiologici processi di apprendimento e di memoria **(191, 199)**. Le *isoforme* III e IV di neurofibromina sono espresse prevalentemente nel tessuto muscolare cardiaco e scheletrico **(201)**. L'identificazione di tali *isoforme* rappresenta un aspetto insolito dato il ridotto numero di pazienti NF1 con alterazioni muscolari. L'*isoforma* derivante dall'inclusione dell'esone 9a, mostra dei ridotti livelli di espressione nei neuroni e, allo stesso modo dell'*isoforma* II, sembra svolgere un ruolo chiave nei meccanismi di memoria e di apprendimento **(202)**. Infine, recenti studi sperimentali hanno permesso di identificare un'ulteriore *isoforma* di neurofibromina, derivata dall'inserzione alternativa dell'esone 10a-2, la quale è stata evidenziata nella maggior parte dei tessuti dell'organismo e, quindi, sembra svolgere una funzione biologica *housekeeping*, localizzata probabilmente a livello del reticolo endoplasmatico cellulare **(200)**. Crescenti evidenze sperimentali dimostrano che la neurofibromina è una proteina cruciale per la fisiologica istogenesi e l'omeostasi scheletrica durante lo sviluppo embrionale **(191)**. Infatti, elevati livelli di espressione della neurofibromina sono stati riscontrati in alcuni sistemi cellulari rappresentati dai condrociti, osteociti, osteoclasti ed osteoblasti **(203)**. Diversi studi hanno riportato inoltre una ridotta densità ossea ed anomalie scheletriche responsabili di deformità rappresentate dalla scoliosi, dai disordini al midollo spinale e dalla bassa statura in pazienti NF1 **(150, 158, 204)**. Date le elevate dimensioni del gene NF1 e la presenza di numerose varianti genetiche e/o polimorfismi genetici associati a fenomeni di *splicing* alternativi, tutt'oggi non esiste in letteratura una descrizione esaustiva e comprensiva riguardante la correlazione genotipo/fenotipo alla base della sindrome neurogenetica della Neurofibromatosi di tipo 1 **(150, 159, 188)**. Un ridotto numero di studi sperimentali riporta che la sindrome NF1 da microdelezione, in confronto ai pazienti affetti da mutazioni intrageniche associate alla Neurofibromatosi di tipo 1, mostra in generale un quadro

clinico e fenotipico più severo caratterizzato da ritardo mentale, dismorfismi facciali, disabilità cognitive, disturbi della crescita, anomalie cardiovascolari, alterazioni del tessuto connettivo e dell'apparato scheletrico, dalla precoce insorgenza di un gran numero di neurofibromi cutanei e da un elevato rischio di sviluppare nel corso della vita tumori maligni della guaina dei nervi periferici (MPNSTs) **(205-206)**. Nonostante il gene NF1 sia stato individuato già da diversi anni, fino ad oggi le mutazioni responsabili di tale condizione patologica sono state identificate solo in una parte dei pazienti esaminati. Lo studio molecolare del gene NF1 è infatti reso difficile dalle sue notevoli dimensioni (350 Kb), dall'esistenza di un ampio spettro di tipi di mutazioni e dall'esistenza di più di 30 di *pseudogeni* non identificati e di varianti polimorfiche dovute a meccanismi di *splicing* alternativo presenti in differenti regioni del genoma umano, dall'assenza di specifici siti (*hotspots*) mutazionali e dalla mancanza di mutazioni ricorrenti e, quindi, facilmente identificabili **(205, 207)**. La Neurofibromatosi di tipo 1 è causata da mutazioni nel gene NF1 che in circa l'80-90% dei pazienti sono rappresentate da mutazioni puntiformi, mentre delezioni più o meno estese del gene NF1 sono presenti nel restante 10-20% dei pazienti **(207-208)**. Sia la perdita della copia *wild type* del gene, fenomeno che determina la perdita dell'eterozigosità (*loss of heterozygosity*), che la presenza di mutazioni somatiche puntiformi all'interno del gene che ne causano l'inattività, sono state riscontrate in uno svariato numero di neurofibromi **(209)**. Inoltre, studi sperimentali su animali *chimerici* parzialmente costituiti da cellule NF1^{-/-} supportano l'ipotesi in base alla quale la presenza della seconda mutazione nel gene NF1 può portare allo sviluppo di neurofibromi plessiformi **(210)**, attribuendo al gene NF1 un ruolo biologico di mediatore negativo della crescita cellulare. Zhu e collaboratori hanno riportato che lo stato di *aploinsufficienza* del gene NF1 e dei *geni limitrofi* nell'ambito delle cellule somatiche può creare un microambiente apparentemente favorevole alla proliferazione cellulare ed alla crescita tumorale tipici dei neurofibromi NF1^{-/-} **(211-212)**. La completa perdita del prodotto del gene NF1 nelle cellule progenitrici del neurofibroma e l'eterozigosità in cellule non-neoplastiche sono requisiti fondamentali per il processo di tumorigenesi. D'altra parte, è stato osservato che la perdita o la mutazione di un solo allele può essere causa dell'insorgenza delle principali manifestazioni cliniche osservate nei pazienti NF1, sebbene i fattori determinanti associati ai segni clinici non-neoplastici tipici di tale disordine genetico non siano stati ancora del tutto definiti. E' auspicabile ipotizzare che un singolo allele attivo del gene NF1 non sia sufficiente a generare una quantità di proteina funzionalmente attiva in grado di dare una risposta biologica normale **(150, 156, 191)**. E' stato osservato che circa il 70% delle mutazioni identificate determina la produzione di una proteina tronca. Ciò rende possibile lo *screening* del gene mediante il *test* della proteina tronca (PTT), tramite il quale il prodotto proteico anomalo viene evidenziato come una banda di peso molecolare più basso rispetto al normale **(205,**

213). A causa delle limitazioni date dall'applicazione del *test* della proteina tronca (PTT), si è resa necessaria l'introduzione di innovative tecniche complementari fondate per lo più sull'analisi genetico-molecolare e sul sequenziamento diretto al fine di individuare eventuali siti mutazionali patogenetici, più o meno correlabili ad un determinato fenotipo. Evidenze cliniche e sperimentali indicano la presenza di delezioni del gene NF1 alla base di tale disordine neurogenetico in circa il 4-5% dei pazienti e tale condizione è diagnosticabile mediante l'applicazione della tecnica FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) o tramite lo studio dei marcatori polimorfici intragenici **(214)**. Inoltre, per l'analisi molecolare del gene NF1 è stata utilizzata una nuova tecnica definita "*microarray based combinatorial sequencing-by-hybridization (cSBH)*", mediante la quale è stato possibile evidenziare la presenza di inserzioni e piccole delezioni **(215)**. Tali tipi di indagine molecolare sono in grado di identificare piccole delezioni/inserzioni intraesoniche. Di conseguenza, recentemente nel nostro laboratorio abbiamo adottato un nuovo protocollo per la diagnosi genetica di NF1 basato sull'impiego di un'ulteriore metodica molecolare, definita MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Tale tipo di tecnica, basata sull'impiego di un *set* di probe sintetiche standardizzate per le regioni codificanti del gene NF1 ed per altre regioni genomiche utilizzate come *references*, è in grado di identificare alterazioni multiesoniche o di un singolo esone, estesi riarrangiamenti dati da ampie delezioni/duplicazioni, inclusa la delezione genomica dell'intero gene NF1, nei pazienti affetti **(207)**.

OBIETTIVI DELLO STUDIO SPERIMENTALE

Scopo del presente studio sperimentale è stato quello di enfatizzare il ruolo svolto dalle specie radicaliche quali molecole-segnale utili nella regolazione dell'espressione genica e nella *risposta cellulare allo stress* in modelli di studio *in vivo* ed *in vitro*, con particolare riferimento ai principali meccanismi che garantiscono il mantenimento dell'omeostasi ossidoriduttiva e la *tolleranza allo stress*. In aggiunta, uno degli obiettivi delle nostre indagini sperimentali ha riguardato l'attribuzione di un alto valore scientifico al ruolo chiave svolto dai diversi membri del sistema dei *vitageni*, dati principalmente dai sistemi citoprotettivi endogeni dell'HO, della Trx/TRXr e delle altre Hsps, nella modulazione della risposta cellulare allo stress nei principali disordini neurodegenerativi, inclusi la patologia di Alzheimer e l'invecchiamento cerebrale, e di alcune malattie sistemiche, quali la sindrome di Menieré, in condizioni di stress ossidativo e/o nitrosativo. Tale studio, inoltre, evidenzia il ruolo emergente svolto dal sistema dei *vitageni* nei processi biologici redox-dipendenti attraverso modulatori nutrizionali, inclusa la carnosina, quale possibile *target* di interventi terapeutici per il trattamento delle neurodegenerazioni e dell'invecchiamento.

Inoltre, obiettivi del presente studio sperimentale e clinico sono stati quelli di determinare la presenza o meno di eventuali mutazioni puntiformi nel gene NF1 in casi clinici di età pediatrica, mediante l'applicazione di metodiche di amplificazione e di sequenziamento diretto, al fine di identificare una possibile correlazione tra genotipo e fenotipo, ampliando ulteriormente l'orizzonte delle conoscenze relative allo spettro di mutazioni e di varianti polimorfiche che caratterizzano tale disordine neurogenetico. A completamento dell'analisi genetico-molecolare, i casi clinici risultati negativi al sequenziamento diretto sono stati esaminati mediante l'applicazione di un ulteriore *test* genetico basato sull'impiego della metodica MLPA (*Multiple ligation-dependent probe amplification*) al fine di evidenziare ampi riarrangiamenti genomici, da riferire ad estese delezioni e/o duplicazioni del gene NF1 allo stato eterozigote, associati a tale condizione patologica multisistemica. In definitiva, i dati del presente studio ampliano ulteriormente lo spettro delle mutazioni del gene NF1 e sottolineano l'importanza dei test genetico-molecolari per una caratterizzazione diagnostica anche nel campo delle Neurofibromatosi.

METODI

LA MALATTIA DI ALZHEIMER

Permesso Etico

Questo studio sperimentale è stato condotto in conformità alle linee guida del *Comitato Etico Locale* ed il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti reclutati.

Pazienti

Aree cerebrali esaminate. I campioni delle aree cerebrali rispettivamente del lobulo parietale inferiore e del cervelletto sono stati ottenuti da 6 pazienti Alzheimer (AD) e da 6 pazienti controllo (CTRL) reclutati secondo il “*Programma di Autopsia Rapida del Centro di Ricerca sulla Demenza di Alzheimer dell’Università del Kentucky (UK ADRC, U.S.A.)*”. I prelievi autoptici sono stati estratti in un intervallo *post-mortem* (PMIs) di 2.1 h per i pazienti AD e di 2.9 h per i soggetti controllo (**Tabella 1**). Tutti i pazienti affetti da malattia di Alzheimer mostrano un progressivo declino delle facoltà intellettive e rientrano nei *criteri* del *Workgroup* NINCDS-ADRADA per la diagnosi clinica di probabile demenza (**96, 216**). Soggetti volontari controllo sono stati sottoposti a test annuali di verifica dello stato mentale e ad esami clinici semi-annuali di controllo dei parametri fisiologici e neurologici, parte integrante di studi longitudinali sull’invecchiamento su individui volontari non dementi e privi di altri disordini neurologici. Tutti i soggetti controllo presentano dei punteggi per test in un *range* di normalità. Infine, la valutazione neuropatologica del cervello degli individui controllo ha rivelato solo minime alterazioni istopatologiche correlate all’età.

Campioni di plasma e linfociti

I campioni di plasma e di linfociti utilizzati nel presente studio per la valutazione di *marker* di stress ossidativo e/o nitrosativo periferici sono stati ricavati da 18 differenti pazienti (9 uomini, 9 donne) di età compresa tra 62 e 83 anni. Tutti i pazienti AD considerati presentano dei *deficit* cognitivi progressivi da almeno 18 mesi. La diagnosi di Demenza di Alzheimer (AD) è stata effettuata in base ai criteri stabiliti *dall’Istituto Nazionale sui Disordini Neurologici e dall’Associazione sullo Stroke da malattia di Alzheimer e sugli altri disordini ad essa associati* (NINCDS-ADRADA) (**96, 216**). La valutazione del grado di demenza è stata effettuata mediante il test *Mini Mental State Examination* (MMSE), richiesto dalla legge sanitaria italiana al fine di ricevere gratuitamente farmaci inibitori dell’acetilcolinesterasi, utilizzati comunemente nella terapia dell’Alzheimer. Inoltre i pazienti AD diagnosticati, a cui è stato prescritto il trattamento con inibitori delle colinesterasi sotto la supervisione

di cliniche specializzate per i disordini demenziali, sono stati classificati in pazienti con AD *mild* (n=5) e pazienti con AD *moderate* (n=13). La diagnosi è stata, inoltre, confermata da esami mediante risonanza magnetica ad immagini (MRI) e tomografia computerizzata (CT), i quali mostrano una prominente atrofia della regione corticale in tutti i pazienti. Infine, 18 pazienti non dementi (6 uomini, 12 donne) di età compresa tra 64-80 anni sono stati reclutati come soggetti controllo.

Campioni di sangue in toto

I campioni di sangue *in toto* (6 ml) sono stati raccolti per paziente in provette EDTA. Immediatamente dopo il prelievo, aliquote di sangue *in toto* (2 ml) sono state centrifugate a 10.000 g per 5 min a 4°C per separare la frazione del plasma dai globuli rossi. Le rimanenti aliquote di sangue *in toto* (4 ml) sono state utilizzate, invece, per isolare i linfociti. Tutti i campioni sono stati congelati a -80°C prima dei dosaggi.

Isolamento dei linfociti

L'isolamento dei linfociti dai campioni di sangue periferico viene realizzato attraverso il metodo del *Ficoll Paque* seguendo la procedura indicata (*GE Healthcare, Piscataway, NJ*).

Estrazione delle proteine ed analisi mediante Western blot

I campioni di plasma puro sono stati utilizzati direttamente per la determinazione dei livelli di espressione del sistema Hsps mediante *immunoblot* (217-218), mentre il *pellet* linfocitario è stato trattato con un *buffer* di lisi, Triton X-100 e centrifugato a 10.000 g per 10 min a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato usato per l'analisi mediante *Western blot* (217-218) dopo il dosaggio delle proteine. L'espressione delle proteine HO-1, HO-2, Hsp60, Hsp72, iNOS, TRXr-1 così come il contenuto rispettivamente di proteine carboniliche (DPNH), di aldeidi reattive (4-HNE) e di residui proteici di nitrotirosina, sono stati determinati in campioni relativi a pazienti controllo ed Alzheimer mediante *Western immunoblot* (217-218). Un'eguale quantità di proteine (40 µg) per ogni campione è stato separata tramite elettroforesi in gel (12%, 8% per la iNOS) SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE) e trasferita tutta la notte in membrane di nitrocellulosa; i legami non specifici degli anticorpi sono stati bloccati con latte in polvere privo di acidi grassi al 3% in tampone fosfato (PBS) pH 7.5. La rivelazione delle proteine iNOS e nitrotirosina è stata ottenuta mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali specifici rispettivamente rabbit anti-iNOS (sc-651, Santa Cruz Biotechnology U.S.) e rabbit anti-nitrotirosina (06-284, Upstate, Lake Placid, NY) in tampone fosfato (PBS) pH 7.5. La determinazione dei livelli di espressione delle proteine HO-1, HO-2 ed Hsp72, invece, è stata

realizzata mediante l'utilizzo rispettivamente di anticorpi policlonali rabbit anti-HO-1 (SPA-895, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada) ed anti-HO-2 (OSA-200, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada) e di anticorpi monoclonali mouse anti-Hsp72 (SPA-810, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada) in *buffer* fosfato pH 7.5. Per sondare i livelli di espressione delle proteine Hsp60, TRXr-1 e Trx sono stati utilizzati anticorpi policlonali specifici, e precisamente goat anti-Hsp60 (sc-1052, Santa Cruz Biotechnology U.S.), rabbit anti-TRXr-1 (07-613, Upstate, Lake Placid, NY) e rabbit anti-Trx (sc-20146, Santa Cruz Biotechnology U.S.) in tampone PBS pH 7.5. Infine, l'immunoreattività per l'aldeide 4-HNE è stata evidenziata mediante l'incubazione delle membrane con l'anticorpo rabbit anti-4-idrossi-2-nonenale Michael adducts (HNE-11S, Alpha diagnostic International, Lost Lane, San Antonio U.S.A.) in *buffer*. Mentre, il contenuto dei gruppi carbonilici proteici è stato stimato grazie all'impiego dell'anticorpo rabbit anti-Dinitrophenyl (DNP) (BA-0603, Vector Laboratories, Burlingame CA). I blots, una volta incubati con i rispettivi anticorpi primari in tampone PBS pH 7.5 per 2 h a temperatura ambiente, sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi in soluzione salina e quindi incubati con anticorpi secondari HRP-coniugati goat anti-rabbit (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology U.S.) o anti-mouse IgG (SAB-100, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada). L'anticorpo policlonale goat specifico per la β -actina è stato usato come controllo di caricamento (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology U.S.). Infine, l'immunoreattività delle bande è stata valutata mediante una lettura densitometrica delle bande tramite un densitometro (*LKB Ultrascan XL*). Il peso molecolare delle proteine è stato determinato utilizzando una curva *standard* ottenuta con proteine di peso molecolare noto.

Dosaggio del glutatione ridotto (GSH) e del glutatione ossidato (GSSG)

Il glutatione ridotto (GSH) e quello ossidato (GSSG) sono stati dosati con il metodo della GSSG reduttasi NADPH-dipendente come descritto precedentemente (218). I linfociti sono stati omogeneizzati in ghiaccio per 10 sec in tampone fosfato di potassio 100 mM, pH 7.5, contenente 12 mM di Na₂-EDTA. Per il dosaggio del glutatione totale, aliquote (0.1 ml) di omogenato sono state immediatamente aggiunte a 0.1 ml di una soluzione fredda contenente 10 mM di DTNB e 5 mM di EDTA in 100 mM di fosfato di potassio pH 7.5. I campioni sono stati miscelati per agitazione e centrifugati a 12.000 g per 2 min a 4°C. Un'aliquota (50 μ l) di surnatante è stata aggiunta in cuvetta contenente una miscela di reazione costituita da 0.5U di GSSG-reduttasi in 100 mM di fosfato di potassio e 5 mM di EDTA, pH 7.5 (buffer 1). Trascorso 1 min, la reazione è stata innescata con l'aggiunta di 220 nmol di NADPH in buffer 1 per un volume finale di reazione di 1 ml. La formazione del coniugato GSH-DTNB è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 412 nm. La

cuvetta di riferimento contiene uguali concentrazioni di DTNB, NADPH ed enzima, eccetto il campione. Per il dosaggio del GSSG, aliquote di (0.5 ml) di omogenato sono state aggiunte rapidamente a 0.5 ml di una soluzione contenente 10 mM di NEM e 5 mM di EDTA in 100 mM di fosfato di potassio pH 7.5. Il campione è stato miscelato per agitazione e centrifugato a 12.000 g per 2 min a 4°C. Un'aliquota (0.5 ml) del surnatante è stata versata goccia a goccia in colonnine cromatografiche C₁₈ SEP-PAK precedentemente attivate aggiungendo 1 ml di metanolo e dopo lavate con acqua. Le colonnine sono state quindi lavate con 1 ml di buffer 1. Aliquote (0.865 ml) di eluato sono state aggiunte in cuvetta contenente 250 nmol di DTNB e 0.5 U di GSSG-reduttasi. Il dosaggio è stato eseguito come descritto per la determinazione del GSH totale. Campioni *standard* di GSH e GSSG rispettivamente in un *range* di 0-10 nmol e 0.010-10 nmol aggiunti a campioni controllo sono stati utilizzati per ottenere le curve *standard*. I risultati sono stati espressi in nmol di GSH o GSSG per mg di proteine (nmol/mg prot).

Attività enzimatica dell'HO-1

L'attività enzimatica della proteina *heat shock* HO-1 è stata determinata secondo il metodo descritto da Motterlini R. *et al.* (219). In breve, microsomi isolati dalle cellule sono stati addizionati ad una miscela di reazione contenente NADPH, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, *citosol* di fegato di ratto come principale sorgente di biliverdina reduttasi ed il substrato emina. La reazione è stata eseguita a 37°C per 1 h al buio e stoppata mediante l'aggiunta di 1 ml di cloroformio. Dopo aver agitato vigorosamente mediante *vortex*, la bilirubina estratta, ottenuta dopo centrifugazione, è stata calcolata come differenza di assorbanza tra 464 e 530 nm ($\epsilon = 40 \text{ mM/cm}$).

Attività enzimatica dell'ossido nitrico sintetasi (NOS)

L'attività della NOS è stata misurata spettrofotometricamente sfruttando la reazione del NO con l'ossiemoglobina (HbO₂) dando luogo alla formazione di metaemoglobina secondo la procedura di Salter M. *et al.* (220). La miscela di reazione contiene in un volume finale di 1 ml: 1 mM di L-arginina, 1 mM di CaCl₂, 0.1 mM di NADPH, 12 μM di THB₄, 5 μM di HBO₂, 4 μM di FAD, 100 mM di HEPES (pH 7.5) e 0.3 ml di campione. L'attività enzimatica è stata monitorata per via spettrofotometrica seguendo l'ossidazione dell'ossiemoglobina a metaemoglobina. Quest'ultima reazione è sensibile all'inibizione indotta dall'agente L-NMMA (1 mM) in presenza di 1 μM di SOD e di CAT ed è stata misurata a 401 nm in uno spettrofotometro a doppio raggio UV/VIS (*Perkin Helmer, mod. EZ301*), con un programma di lunghezza d'onda multiplo a 22 °C. L'attività della NOS è stata valutata in assenza ed in presenza di 0.1 mM di amino-etil-isotiourea (ITU), un inibitore specifico della iNOS (221) e di 1 mM di metil-L-arginina (L-NMMA), un inibitore non

specifico di tutte e tre le *isoforme* della NOS (222). L'attività della NOS è stata definita come la quantità di enzima richiesta per la riduzione indiretta dell'HBO₂ a metaemoglobina in presenza di THB₄.

LA SINDROME DI MENIERE'

Pazienti

Nel presente studio abbiamo reclutato 39 pazienti (20 maschi e 19 femmine, di età media di 49.5 anni) con diagnosi di sindrome di Menieré effettuata seguendo i *criteri* diagnostici stabiliti dalla *Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* e pubblicati nel 1995 (223), comprendenti: due o più episodi di vertigini di 20 min o più, documentata perdita dell'udito almeno in un'occasione, ronzio alle orecchie, senso di ovattamento nell'orecchio, e 34 individui controllo di pari età. Tale gruppo controllo, comprendente 15 maschi e 19 femmine, con un'età media di 39.5 anni, non presenta disordini cocleo-vestibolari ed altre patologie sistemiche. I *criteri* di esclusione sono stati determinati mediante la valutazione clinica e l'esame audiometrico, per quei pazienti che presentavano perforazione della membrana timpanica, otosclerosi, infezioni o malattie neoplastiche dell'orecchio e del nervo acustico. Tutti i pazienti sono stati valutati secondo il *Profilo of Mood States (POMS)*, il quale permette di valutare gli stati emozionali e lo stress delle settimane passate (224-225). In più a tutti i soggetti è stato dato un questionario comprendente 40 domande a scelta al fine di stabilire l'impatto dei sintomi sulla qualità di vita. Inoltre, nel gruppo di pazienti con diagnosi di sindrome di Menieré, il grado di severità del quadro clinico per ciascun paziente è stata stabilita sulla base della frequenza degli attacchi di vertigini oltre un anno (da 2 ad 8 crisi) (Table 1), l'intensità e la durata dei sintomi (da pochi giorni, a qualche settimana, fino ad un mese nei casi più severi) (226-227). Nel presente studio, il grado di perdita dell'udito è stato misurato strumentalmente permettendo la stadiazione della malattia nei pazienti con sindrome di Menieré (Tabella 2).

Analisi mediante Western Blot

Il *pellet* linfocitario è stato omogeneizzato e centrifugato a 10,000 g per 10 min 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato usato per l'analisi mediante *Western blot* (217-218) dopo il dosaggio delle proteine. Un'eguale quantità di proteine (40 µg) per ogni campione è stata separata tramite elettroforesi in gel SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE) e trasferita tutta la notte in membrane di nitrocellulosa; i legami non specifici degli anticorpi sono stati bloccati con latte in polvere privo di acidi grassi al 3% in tampone fosfato (PBS) pH 7.5. Le membrane sono state quindi incubate con l'anticorpo monoclonale di *mouse* per l'inducibile Hsp72 (SPA-810, Stressgen). Viceversa, i livelli

di espressione di anidraasi carbonica (CAII), DPNH, HNE e Trx sono stati valutati dopo aver incubato le membrane con i rispettivi anticorpi policlonali di *rabbit*: (ab6621, Abcam, Cambridge, UK), (SPA-895, Stressgen), (V0401, DAKO), (HNE11-S Alpha Diagnostic International), (07-613, Upstate Biotechnology). L'anticorpo policlonale goat specifico per la β -actina è stato usato come controllo di caricamento (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology U.S.). I *blots*, una volta incubati con i rispettivi anticorpi primari in tampone PBS pH 7.5 per 2 h a temperatura ambiente, sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi in soluzione salina e quindi incubati con anticorpi secondari HRP-coniugati, rispettivamente goat anti-rabbit (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology U.S.), anti-mouse IgG (SAB-100, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada) o anti-goat (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology U.S.). Infine, l'immunoreattività delle bande è stata valutata mediante una lettura densitometrica delle bande tramite un densitometro (*LKB Ultrosan XL*). Diversi blots sono stati allestiti con tutti i campioni e ciascun campione è stato caricato 3-4 volte al fine di evidenziare eventuali differenze di segnale di espressione. Il peso molecolare delle proteine è stato determinato utilizzando una curva *standard* ottenuta con proteine di peso molecolare noto.

INVECCHIAMENTO

Animali

Tutti i protocolli relativi al mantenimento degli animali da esperimento sono stati approvati dalla *University of Catania Laboratory Animal Care Advisory Committee*. Ratti maschi *Wistar*, acquistati dalla *Harlan (Udine, Italy)*, sono stati mantenuti in stabulario in condizioni di adeguata temperatura ed umidità ed alternanza ogni 12 ore di luce e di buio. Ratti anziani (12 mesi) e senescenti (28 mesi) (n=8 per ciascun gruppo) sono stati alimentati *ad libitum* con una dieta certificata, preparata seguendo le linee guida della AIN. Dopo aver sacrificato gli animali, i cervelli sono stati rapidamente rimossi e sezionati nelle varie aree cerebrali, rispettivamente della corteccia, dell'ippocampo, del setto e dello striato, secondo una procedura *standard* che prevede l'utilizzo di una camera fredda ed un massimo di 50-s di variabilità tra un animale e l'altro. La sostanza nera (SN) è stata sezionata dalla parte più profonda della fossa interpeduncolare. Infine, abbiamo analizzato dei pool relativi a campioni di sostanza nera (SN) o setto, al fine di ottenere una quantità proteica paragonabile a quella misurata per la corteccia o lo striato, inclusi i prodotti di perossidazione lipidica, i gruppi tiolici, gli enzimi e le tracce di metalli.

Dosaggio dei gruppi SH proteici e non-proteici totali

Il contenuto dei gruppi tiolici (SH) proteici e non-proteici totali nelle diverse aree cerebrali è stato determinato mediante il metodo di *Sedlak and Lindsay* (228). Il contenuto dei gruppi SH è espresso in nmol/mg/prot.

Analisi mediante Western blot

I livelli di espressione relativi alle proteine HO-1, Hsp72, Hsp90, TRX1, TRX, il contenuto dei gruppi carbonilici e dell'aldeide reattiva 4-HNE sono stati determinati sul surnatante ottenuto dopo omogenizzazione delle diverse aree cerebrali, centrifugazione a 10,000 g per 10 min e dosaggio delle proteine. Un'eguale quantità di proteine (30 µg) per ogni campione è stata separata tramite elettroforesi in gel SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE) e trasferita tutta la notte in membrane di nitrocellulosa (217-218). Per la rivelazione dei livelli di espressione di HO-1, TRX1, TRX, Hsp90 ed Hsp72 sono state incubate le membrane con i rispettivi anticorpi primari anti-HO-1, anti-TRX, anti-TRX1, anti-Hsp90 (Stressgen, Victoria, BC, Canada) ed il monoclonale anti-Hsp72 (RPN 1197; Amersham) in tampone fosfato pH 7.4. Per la determinazione dei livelli di espressione dell'aldeide reattiva 4-HNE e del contenuto dei gruppi carbonilici, le membrane sono state incubate per 2h a temperatura ambiente, rispettivamente con l'anticorpo anti-HNE Michael adducts; (B 4067; Calbiochem, San Diego, CA) e l'anticorpo policlonale rabbit anti-DPNH (Chemicon, Rosemont, IL). L'anticorpo policlonale goat specifico per la β -actina è stato usato come controllo di caricamento (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology U.S.). I *blots* sono stati quindi incubati con anticorpi secondari HRP-coniugati anti-rabbit (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology U.S.), anti-mouse (SAB-100, Stressgen Biotechnologies, Glanford Ave, Victoria, BC Canada) ed anti-goat (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology U.S.) e successivamente con il reattivo chemiluminescente ECL. Infine, l'immunoreattività delle bande è stata valutata mediante una lettura densitometrica delle bande tramite un densitometro (*LKB Ultrascan XL*). Diverse esposizioni sono state effettuate per ciascun blot al fine di assicurare una linearità di risposta.

STUDI IN VITRO

Cellule di Neuroblastoma SH-SY5Y e trattamenti

Cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y sono state acquistate dalla *ATCC (LGC Promochem Teddington, U.K. CRL-2266)*. Cellule indifferenziate di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y sono state coltivate in fiasche da 75 cm² in presenza del terreno di coltura costituito dal 50% di DMEM comprendente 2mM di L-glutamina, 100U/mL di penicillina e 100µg/mL di streptomina supplementato con siero fetale bovino (FBS-10%) e dal 50% di Nutrient F-12 HAM,

e mantenute a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂. Una parte delle cellule confluenti sono state sottoposte al trattamento con 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), un donatore di perossinitrito, a diverse concentrazioni, rispettivamente di 0.5mM, 1.0mM e 2.0mM, per un tempo di esposizione di 7h e 24h, al fine di determinare i livelli di espressione proteica relativi all'*heat shock protein* HO-1, al contenuto dei gruppi carbonilici (DPNH) e all'aldeide reattiva 4-HNE. Una seconda parte di cellule confluenti è stata invece sottoposta al trattamento con SIN-1 1.0mM, in presenza ed in assenza di carnosina (CRNS) a diverse concentrazioni, rispettivamente di 300µM, 1.0mM, 10mM o di carnosina-trealosio (CRNS-T) 1.0mM, per un tempo di esposizione di 7h, al fine di valutare i livelli di espressione proteica relativi all'*heat shock protein* Hsp72. Dopo i vari trattamenti le cellule sono state lavate con PBS (pH 7.5), screpate e pellettate. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 0.32 M di sucrosio, 1.0mM di EDTA, 10mM di Tris (pH 7.4), 0.5 mM di fenil-metil-sulfonilfluoride (PMSF) ed omogeneizzato prima dell'analisi mediante *Western blot* (217-218). Il lisato cellulare è stato quindi centrifugato a 10000 g per 15 min a 4°C ed aliquote di 30-40µg del contenuto proteico totale corrispondente alla frazione citosolica sono state utilizzate per la determinazione dei livelli di espressione proteica rispettivamente dell'*heat shock proteins* HO-1 ed Hsp72, dell'aldeide reattiva 4-idrossinonenale (4-HNE) e del contenuto di gruppi carbonilici (DPNH) mediante elettroforesi in gel SDS-PAGE.

Studi di sopravvivenza cellulare (saggio MTT) su linee di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y trattate con SIN-1 in presenza ed assenza di CRNS

Cellule indifferenziate di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y sono state piastrate in micropiastre da 96 pozzetti, contenenti il terreno di coltura costituito dal 50% di DMEM supplementato con 2mM di L-glutamina, 100U/mL di penicillina e 100µg/mL di streptomina e siero fetale bovino (FBS-10%) e dal 50% di Nutrient F-12 HAM, e sottoposte al trattamento con 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 1.0mM, un donatore di perossinitrito, in presenza ed in assenza di carnosina (CRNS) a diverse concentrazioni, rispettivamente 300µM, 1.0mM e 10mM e di carnosina-trealosio (CRNS-T) 1.0mM, per un tempo di esposizione di 4h e 7h. La "*cell viability*" è stata quindi determinata mediante il saggio MTT (229), il quale si basa sulla conversione di sali di tetrazolio nel prodotto insolubile formazano in presenza di specifiche deidrogenasi mitocondriali. La soluzione relativa al saggio MTT è stata aggiunta alle cellule presenti nei pozzetti ad una concentrazione finale di 5mg/mL e le micropiastre sono state quindi incubate a 37°C, al 5% di CO₂ per un tempo complessivo di 3h. Trascorso il tempo d'incubazione, le cellule sono state infine dissolte in 100µL di isopropanolo contenente 0.1M di HCl e l'assorbanza derivante è stata misurata mediante un sistema ad immagini (BIO-RAD, *Ultramark Microplate*) ad una lunghezza d'onda di

570nm. I valori ottenuti sono espressi come % di sopravvivenza cellulare (\pm S.E.M.), relativi ad n differenti esperimenti, dei campioni trattati rispetto al campione controllo.

Determinazione del contenuto proteico

La concentrazione delle proteine è stata determinata secondo il metodo di *Smith (230)*, utilizzando come reagente l'acido bicinconinico (*PR23227 BCA assay, Pierce Rockford, IL*).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come medie \pm S.E.M. di n differenti esperimenti, ciascuno dei quali è stato eseguito in triplo. L'analisi statistica è stata eseguita con il test *one-way ANOVA* seguito dal test multiplo del controllo delle differenze di *Duncan*. Le differenze sono state considerate significative per $p < 0.05$, $p < 0.01$.

STUDIO GENETICO-MOLECOLARE DEL GENE NF1 IN CASI CLINICI DI ETA' PEDIATRICA

Linfociti periferici isolati da campioni di sangue in toto

I campioni di linfociti periferici utilizzati nel presente studio per la valutazione clinica e per l'analisi genetica al fine di evidenziare la presenza di eventuali mutazioni nel gene NF1 sono stati isolati da differenti pazienti in età pediatrica dopo aver ottenuto il consenso informato. Tutti i pazienti (totale 50) con sospetto diagnostico relativo alla sindrome di Neurofibromatosi di tipo 1 reclutati presentano almeno due dei segni clinici stabiliti quali *criteri* diagnostici dalla *National Institute of Health Conference (157)*. Un gruppo omogeneo di individui volontari sani è stato inoltre reclutato. La diagnosi di Neurofibromatosi di tipo 1 è stata effettuata principalmente sulla storia clinica e la raccolta dei dati anamnestici relativi ai pazienti reclutati e sull'indagine genetica mediante amplificazione e sequenziamento genico. I casi clinici risultati negativi al sequenziamento diretto sono stati esaminati mediante l'applicazione del test genetico MLPA (*Multiple ligation-dependent probe amplification*) per la diagnosi molecolare e la ricerca di estese delezioni e/o duplicazioni intrageniche. I linfociti periferici sono stati isolati da campioni di sangue *in toto* in provette EDTA dei pazienti reclutati. Il metodo si basa sull'uso di un particolare reagente costituito da sali di ditriazoato di sodio, (*Histopaque-1077, Sigma Sterile Filtered Endotoxin Tested*). Il *pellet* linfocitario è stato risospeso in 1mL di TRI reagent o *trizol* (*Sigma Life Science, Molecular Biology Tested*) ed è stato congelato in *ependorf* da criocongelamento a -80°C (**Fig E**). In un totale di 50

pazienti accettati è stata conclusa l'analisi genetico-molecolare in 33 casi clinici permettendo l'identificazione di 21 tipi differenti di mutazioni nel gene NF1 allo stato eterozigote, comprendenti mutazioni da *splicing* aberrante, microdelezioni *in frame* e *frameshift*, microinserzioni *frameshift*, mutazioni *missense*, *nonsense* e da *delezione genomica*, delle quali sono riportati di seguito i casi più rappresentativi.

Analisi molecolare del gene NF1

Il nostro protocollo di analisi mutazionale del gene NF1 prevede: (1) amplificazione e sequenziamento diretto dei 24 frammenti del trascritto e dei rispettivi esoni del gene NF1 (*Ensembl Genome Browser*, NF1-002 ENST00000356175) per l'identificazione delle mutazioni puntiformi; (2) amplificazione ed analisi mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) per la rivelazione dei riarrangiamenti genomici, incluse estese delezioni/duplicazioni del gene NF1.

L'estrazione dell'acido nucleico RNA da linfociti periferici isolati da campioni di sangue *in toto* sia di pazienti NF1 che di individui controllo è stata eseguita mediante l'utilizzo del Kit QIAamp RNA Blood (*Qiagen, Hilden Germany*). Nel caso di prelievi di sangue effettuati direttamente in provette PAXgene contenenti uno specifico reattivo stabilizzatore, l'estrazione dell'acido nucleico RNA è stata eseguita mediante l'impiego del relativo Kit di estrazione (*PreAnalytiX, PAXgene Blood RNA Kit*). L'acido nucleico RNA estratto è stato risospeso in 30-35 μ L di RNase *free water*, dosato spettrofotometricamente e visualizzato tramite elettroforesi su gel-red 10,000 x (*Biotium*) 0,8-1% TBE 1x *buffer* (**Fig E**).

RT-PCR e sintesi del cDNA del gene NF1

La sintesi del cDNA del gene NF1 a partire da campioni di RNA precedentemente estratti da linfociti periferici di pazienti NF1 e soggetti controllo è stata effettuata mediante l'utilizzo del Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen, Carlsbad USA*). La miscela di reazione risulta costituita dai seguenti componenti: RNA (~1 μ g), DNTs mix 10mM, Oligo(dt) 0.5 μ g/ μ L, Random Primers (*Hexamer*) 50ng/ μ L, DEPC-H₂O sterile, RT buffer 10x, MgCl₂ 25mM, DTT 0.1M, Rnase OUT 40U/ μ L, RT Superscript (SS2) 50U/ μ L, RNAase H (2U/ μ L). Sono state eseguite in successione diverse fasi di incubazione in termociclatore (*Eppendorf Mastercycler epgradient S*) rispettivamente a 65°C 5min, 42°C 90min, 70°C 15min, 4°C 5min. L'ultima fase di incubazione della miscela reazione è stata eseguita in termociclatore a 37°C 20min dopo aver aggiunto l'RNAase H (**Fig E**).

Amplificazione genica mediante PCR

I 24 Frammenti del cDNA (*Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*) ed i relativi esoni comprendenti le mutazioni del trascritto del gene NF1 sono stati amplificati tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando un set di primers disegnati mediante il sito Primer 3 e le seguenti condizioni sperimentali: cDNA o DNA (100ng/μL), H₂O sterile per preparazioni iniettabili, Primer Fw e Rev 5μM (*Invitrogen o TIB*), HotMasterMix 2.5x-1000 Rxns (5 PRIME). La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 25μL in termociclatori (*Eppendorf Mastercycler epgradient S*) con un profilo *standard* di amplificazione (95°C 4min, 95°C 1min, 60°C 1min, 70°C 1min, 70°C 8min 4°C∞) x 35cicli. I Frammenti del cDNA e gli esoni genomici così amplificati sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel-red 10,000 x (*Biotium*) 1% TBE 1x *buffer* (**Fig E**). La purificazione dei prodotti di PCR amplificati, costituiti dai vari Frammenti del cDNA e dai corrispondenti esoni comprendenti le mutazioni riscontrate nel trascritto del gene NF1 è stata effettuata mediante l'utilizzo di piastre da PCR_{μ96} *Millipore* su *Vacuum Manifold* dopo aver risospeso gli amplificati in 80μL di H₂O per preparazioni iniettabili e dopo aver applicato una pressione sottovuoto di 20-25mmHg. I prodotti di PCR purificati sono stati quindi risospesi in un volume di 26μL di acqua per preparazioni iniettabili mediante l'utilizzo di un *microplate shaker*.

Sequenziamento diretto

I prodotti di PCR purificati sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto su analizzatore automatico *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) dopo aver effettuato una reazione di sequenza per ciascun campione in termociclatore (**Fig E**). La reazione di sequenza sui prodotti di PCR purificati corrispondenti ai vari Frammenti del cDNA e degli esoni comprendenti le regioni genomiche mutate del gene NF1 è stata realizzata in termociclatori (*Eppendorf Mastercycler epgradient S*), con un profilo *standard* di amplificazione e sequenziamento (96°C 10sec, 50°C 5sec, 60°C 4min, 4°C ∞), mediante l'impiego del *Kit Dye Deoxy Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*), in un volume finale della miscela di reazione di 10μL ed utilizzando le seguenti condizioni sperimentali: Primers Fw o Rev 2μM (*Invitrogen o TIB*), Buffer Sequencing 5X (*BigDye Terminator V1.1, V3.1, Applied Biosystems, Warrington UK*), Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing RR-100 (*Applied Biosystems, Foster City CA USA*), H₂O sterile o per preparazioni iniettabili. La purificazione dei prodotti derivati dalla reazione di amplificazione e sequenziamento diretto è stata eseguita mediante l'utilizzo del *Montage™ Seq₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit* (*Millipore*). In breve, ogni campione prodotto della reazione di sequenza è stato risospeso in un volume noto (20μL) di *Injection Solution* e posto sull'apposita piastra da

purificazione sul *Vacuum Manifold*. A ciascun campione relativo alle singole reazioni di sequenza è stata applicata una pressione sottovuoto di 20-23mmHg permettendo la filtrazione dei prodotti purificati della reazione di sequenza attraverso la membrana della piastra da purificazione e la completa eliminazione dei residui di fluorescenza in eccesso. I prodotti della reazione di sequenza così purificati sono stati risospesi in un volume di 26µL di *Injection Solution* mediante l'utilizzo di un *microplate shaker* e posti sull'apposito supporto (*MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems*) nell'analizzatore automatico (*ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) per il sequenziamento diretto e l'analisi delle reazioni di sequenza mediante elaborazione degli elettroferogrammi relativi ai singoli campioni. Infine, gli elettroferogrammi corrispondenti ai campioni in esame sono stati analizzati mediante allineamento delle sequenze con una sequenza di riferimento nota (*Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*), utilizzando un *software* definito SeqScape v2.5, al fine di effettuare una diagnosi genetica, evidenziando la presenza di eventuali mutazioni geniche, e di stabilire possibili correlazioni con il fenotipo a completamento della valutazione clinica (**Fig E**).

MLPA analisi (Multiple ligation-dependent probe amplification)

Il DNA di ogni paziente, estratto da sangue in *toto* mediante l'utilizzo del *Kit QIAamp DNA Mini Kit 250*, è stato analizzato mediante un Kit commerciale basato su PCR quantitativa seguita da elettroforesi capillare (*MLPA-NF1 P081/P082 SALSA Kit, MRC-Holland, The Netherlands*) (**207**). La tecnica MLPA (*Multiple ligation-dependent probe amplification*) permette di analizzare i 57 esoni del gene NF1 mediante l'amplificazione sequenza specifica e simultanea effettuata mediante un set di *probe* sintetiche realizzate per la maggior parte degli esoni costitutivi del gene NF1. Inoltre, le due *probe-mix* contengono delle *reference probe* per altre regioni genomiche. I campioni di DNA dei pazienti sono stati analizzati mediante il *Kit SALSA-MLPA NF1* secondo una procedura *standard*, così schematizzata: 1) denaturazione del DNA (150-250ng) a 98°C per 5min; 2) ibridazione delle SALSA-*probe* mediante incubazione a 60°C per 16h; 3) reazione di ligasi: la ligasi termostabile (*Ligasi-65*) si attiva a 54°C per 15min e si inattiva una volta raggiunti i 98°C; 4) reazione di amplificazione eseguita mediante il seguente ciclo termico: 95°C 5min, 95°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 60sec, 72°C 20min per 35 cicli; 5) analisi e separazione mediante elettroforesi capillare (*ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) utilizzando come *standard* interno ROX o LIZ 500; 6) analisi mediante l'utilizzo del *software* GeneMapper ed interpretazione dei dati mediante esportazione dei dati relativi alle aree dei picchi su *file Excel* (*Coffalyser*, dati non mostrati) per l'identificazione di delezioni e/o duplicazioni nel gene NF1. Una riduzione od un

incremento nell'area del picco di <0.7 o >1.3 è considerata indice rispettivamente di delezione o duplicazione intragenica (**Fig E**).

RISULTATI

LA SINDROME DI MENIERE'

In accordo a numerose evidenze sperimentali le quali riportano aumentati livelli di stress ossidativo associati ad alterazioni dello stato tiolico ed alla presenza di ridotte difese antiossidanti nel plasma di pazienti MD (**126**), i nostri dati mostrano un significativo decremento nei livelli di espressione dell'enzima tioredoxina reduttasi (TRX) nei linfociti periferici di pazienti MD (**Fig 1**) ($p>0.01$), sottolineando il coinvolgimento del sistema emergente della TRX nella regolazione dell'equilibrio ossidoriduttivo e dell'omeostasi cellulare (**63-64, 77-78, 89**). In associazione ad evidenze scientifiche le quali indicano modificazioni ossidative di proteine biologiche *target* alla base della patogenesi dei più importanti disordini neurodegenerativi (**1, 4-5, 8-9, 12, 17-18, 36, 130, 132**), inclusa la malattia sistemica di Menierè, i nostri risultati sperimentali evidenziano un significativo incremento nel contenuto dei gruppi carbonilici (DPNH), indicatore biologico del danno ossidativo a carico di molti componenti cellulari incluse le proteine, nei linfociti di pazienti MD rispetto ad individui controllo (**Fig 2**) ($p>0.01$). Tra i prodotti di perossidazione lipidica, l'aldeide reattiva 4-HNE ha ricevuto una considerevole attenzione per il suo contributo nella patogenesi di diversi disordini, incluse le malattie cardiovascolari, renali e neurodegenerative (**18, 96, 136**). L'analisi dei livelli di espressione di prodotti di perossidazione lipidica nei campioni di linfociti ha mostrato un significativo incremento nei livelli di espressione di 4-HNE nei linfociti di pazienti MD rispetto ad individui controllo (**Fig 3**). Infine, in maniera consistente ad ipotesi sperimentali le quali evidenziano il ruolo citoprotettivo dato dal sistema *heat shock* alla base dei meccanismi antidegenerativi, i nostri dati mostrano aumentati livelli di espressione della proteina citoprotettiva Hsp72 nei linfociti di pazienti MD rispetto a soggetti controllo ($p>0.01$) (**12, 17-18, 31, 36, 126**) (**Fig 4**). E' noto come la funzione uditiva dipenda dal mantenimento di un'adeguata composizione ionica dell'endolinfa. A tal riguardo, l'enzima anidrasi carbonica (CAII) svolge un ruolo chiave nel mantenimento di un'adeguata concentrazione ionica nei fluidi dell'orecchio interno. Le nostre indagini sperimentali riportano un significativo incremento dei livelli di espressione ($p>0.01$) di CAII nei linfociti di pazienti MD rispetto ad individui controllo (**Fig 5**).

LA MALATTIA DI ALZHEIMER

Evidenze sperimentali indicano che lo stato tiolico, dato per lo più dal contenuto di glutazione ridotto (GSH), svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'equilibrio redox cellulare (**2, 69, 217**). In accordo ad altri studi sperimentali, i quali mostrano come il cervello di pazienti Alzheimer sia caratterizzato da intensi livelli di stress ossidativo e da un alterato stato tiolico (**231-233**), le nostre indagini sperimentali hanno mostrato un significativo decremento nei livelli di glutazione ridotto (GSH) ed un corrispondente incremento nei livelli di glutazione ossidato (GSSG) su campioni di linfociti periferici prelevati da individui affetti da malattia di Alzheimer (**Fig 6A,B** $p < 0.05$ vs CTRL, $p < 0.05$ vs CTRL). Tali modificazioni biochimiche portano ad una significativa riduzione del rapporto GSH/GSSG nei linfociti di pazienti Alzheimer rispetto ai soggetti controllo (**Fig 6C** $p < 0.01$ vs CTRL). Precedenti dati sperimentali ottenuti nel nostro laboratorio hanno permesso di dimostrare una “*up-regulation*” nell'espressione di proteine citoprotettive in cellule esposte ad insulti di tipo ossidativo (**234-235**). Consistentemente a tali risultati sperimentali, nel presente studio abbiamo osservato un'aumentata espressione di due proteine antiossidanti, l'HO-1 (**Fig 7A,B** $p < 0.01$ vs CTRL) e la TRXr-1 (**Fig 8A,B** $p < 0.01$ vs CTRL), soprattutto a livello della regione cerebrale corrispondente al lobulo parietale inferiore, ovvero un'area caratterizzata da elevati livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo (**232, 236**), nei cervelli di pazienti Alzheimer rispetto ai cervelli di soggetti controllo. L'ipotesi che viene formulata per spiegare l'aumentata espressione di tali due proteine antiossidanti si basa sugli effetti determinati da un forte microambiente ossidante. A rafforzare tale idea, ulteriori esperimenti condotti sui neuroni di pazienti Alzheimer e di soggetti controllo hanno evidenziato nel cervello di individui Alzheimer una riduzione nei livelli di espressione dell'isoforma costitutiva dell'eme ossigenasi, denominata HO-2, a livello della regione cerebrale del lobulo parietale inferiore (**Fig 9A,B** $p < 0.01$ vs CTRL) e l'assenza di una marcata espressione della proteina enzimatica TRXr-1 a livello del cervelletto (**Fig 8C,D**), ossia un'area cerebrale priva di ossidazione alle proteine e di deposizione del peptide β -amiloide a livello delle *placche senili*, uno dei segni neuropatologici predominanti della malattia di Alzheimer (**96, 99**). In conformità ai risultati ottenuti per il cervello, i dati ottenuti sia nei campioni di plasma che in quelli di linfociti di pazienti Alzheimer paragonati ai soggetti controllo hanno mostrato un significativo aumento nei livelli di espressione della proteina da stress HO-1 (**Fig 10A,B** $p < 0.05$ vs CTRL; **Fig 11A,B** $p < 0.01$ vs CTRL), e di conseguenza anche i livelli di attività totale dell'HO-1 si sono rivelati marcatamente elevati (**Fig 11C** $p < 0.01$ vs CTRL). Si può ipotizzare che l'aumentata attività dell'enzima HO-1 nei linfociti di pazienti affetti da malattia di Alzheimer sia probabilmente dovuta ad un incremento nei livelli di espressione della proteina HO-1

(**Fig 11A,B** $p < 0.01$ vs CTRL), il quale si verifica in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli caratterizzati da un intenso stress ossidativo, dal momento che abbiamo osservato una riduzione nei livelli di espressione della proteina HO-2 nei campioni di linfociti di individui Alzheimer (dati non mostrati). La formazione di specie reattive dell'azoto (RNS) è associata a varie condizioni patologiche caratterizzate da danno tissutale accompagnato a processi di neuroinfiammazione e neurodegenerazione. Per quanto riguarda il contributo dato dallo stress nitrosativo nella patogenesi di tale disordine neurodegenerativo, la **Fig 12** mostra significativi livelli di espressione (**Fig 12A,B** $p < 0.01$ vs CTRL) e di attività dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS-2) (**Fig 12C** $p < 0.05$ vs CTRL) nei linfociti di individui Alzheimer rispetto ai soggetti controllo. Inoltre, dal momento che il prodotto dell'enzima NOS-2 è costituito dal NO, il quale in presenza di un eccesso di anioni superossido, può dare origine ad una specie fortemente ossidante, il perossinitrito (ONOO^-), e questo a sua volta può reagire legandosi ai residui tirosinici di proteine *target* (**1, 16**), l'analisi di campioni di plasma e di linfociti di individui Alzheimer ha evidenziato elevati livelli di un *marker* biochimico riguardante lo stress nitrosativo rappresentato dalla 3-nitrotirosina (3-NT) rispetto ai soggetti controllo (**Fig 13A,B**). Come corollario del concetto fondamentale secondo cui durante particolari condizioni da stress proteine e lipidi possono subire modificazioni di tipo ossidativo (**234-235**), la **Fig 13 C,D** mette in risalto il dato sperimentale in base al quale il prodotto aldeidico rappresentato dalla 4-idrossinonenale (4-HNE), quest'ultimo considerato un *marker* di perossidazione lipidica, così come il contenuto di gruppi carbonilici proteici (**Fig 13E,F**), dosati immunochimicamente mediante la rivelazione dell'idrazone prodotto dalla reazione dei gruppi carbonilici con la 2,4-dinitrofenilidrazina (**237**), presentano dei valori di espressione densitometrici significativamente più elevati nei campioni sia di plasma che di linfociti di pazienti Alzheimer rispetto ai soggetti controllo. In riferimento a precedenti indagini sperimentali condotte su cellule cerebrali le quali hanno mostrato un'induzione della proteina da stress citoprotettiva Hsp72, durante condizioni ambientali caratterizzate principalmente da stress nitrosativo ed, inoltre, in virtù di recenti evidenze sperimentali e riferimenti bibliografici i quali indicano che la tioredoxina riduttasi (TRXr-1) è funzionalmente correlata all'induzione dell'*isoforma* HO-1 in presenza di condizioni sfavorevoli dati da un intenso stress nitrosativo (**238**), nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo investigato l'espressione delle *proteine heat shock* Hsp72, Hsp60 e TRXr-1. Come è indicato nella **Fig 14 (A,B)** $p < 0.01$ vs CTRL) l'espressione delle proteine Hsp72 ed Hsp60 è significativamente più elevata nei campioni di linfociti di individui Alzheimer rispetto a quelli di soggetti controllo, mentre i livelli di espressione della TRXr-1 risultano incrementati sia nei campioni di linfociti che di plasma sempre di pazienti Alzheimer paragonati a quelli di individui controllo (**Fig 15A,B** $p < 0.01$ vs CTRL, $p < 0.05$ vs CTRL), attribuendo ancora una volta al *pathway* delle proteine da

stress e della proteina redox TRXr-1 il meccanismo fondamentale di citoprotezione che viene attivato in tutte le cellule al fine di limitare i danni e di garantire il normale bilancio ossidante/antiossidante e l'equilibrio ossidoriduttivo generale del sistema.

L'INVECCHIAMENTO

La misurazione del contenuto dei gruppi tiolici totali e dei livelli di glutazione ridotto (GSH), quali *biomarker* dello stato di invecchiamento, mostra in tutte le aree cerebrali escluso il cervelletto un decremento nel contenuto dei gruppi tiolici totali (**Fig 16**) così come nei livelli di glutazione ridotto (GSH) nei ratti senescenti (28 mesi) rispetto ai ratti invecchiati (12 mesi) (**Fig 17A**). Per contro, il contenuto di glutazione ossidato (GSSG) aumenta significativamente nei ratti senescenti rispetto ai ratti invecchiati (**Fig 17B**). Durante l'invecchiamento, il cervello, uno degli organi particolarmente vulnerabili al danno ossidativo, è sottoposto ad una serie di alterazioni cellulari associate a modificazioni dello stato redox le quali innescano una risposta cellulare allo stress caratterizzata dalla sovraespressione di geni citoprotettivi appartenenti al sistema dei *vitageni* (**1, 12, 17**). Le nostre indagini sperimentali indicano significativi aumentati livelli di espressione rispettivamente delle proteine inducibili appartenenti al sistema delle *heat shock proteins*, Hsp72 (**Fig 18A**) ed HO-1 (**Fig 19A**), in tutte le aree cerebrali esaminate di ratti senescenti ed invecchiati. *Western blots* rappresentativi relativi a campioni di aree cerebrali di ippocampo sono riportati rispettivamente nelle **Figs 18-19B**. Una correlazione positiva tra il decremento nel contenuto di glutazione ridotto (GSH) ed il significativo incremento nei livelli di espressione della proteina Hsp72 è stata osservata in tutte le aree cerebrali esaminate durante l'invecchiamento. Tali osservazioni sono consistenti con l'ipotesi sperimentale in base alla quale lo *switch* dello stato redox tiolico agisce da segnale intracellulare in grado di indurre l'espressione di geni citoprotettivi i quali modulano la *tolleranza cellulare allo stress* (**66, 69, 72, 75, 125**). Nel nostro laboratorio abbiamo, inoltre, valutato i livelli di espressione di altre proteine appartenenti al sistema dei *vitageni*, quali l'Hsp90, la tioredoxina (TRX) ed il suo enzima tioredoxina reduttasi (TRX-red), in aree cerebrali di ratti senescenti ed invecchiati. Per quanto riguarda i livelli di espressione di Hsp90, ratti senescenti mostrano una marcata riduzione nelle aree cerebrali della corteccia e dell'ippocampo, un incremento marcato nella sostanza nera e nessun significativo cambiamento è stato osservato nelle aree cerebrali del setto, dello striato e del cervelletto (**Fig 20A**). Le nostre indagini sperimentali ci hanno permesso di associare tali modificazioni ad un decremento nei livelli di espressione della proteina tioredoxina (TRX) in tutte le aree cerebrali di ratti senescenti, in particolare nella sostanza nera e nell'ippocampo, fatta eccezione per il cervelletto, un'area cerebrale resistente al danno ossidativo

(Fig 21A). In maniera consistente a tali risultati, elevati livelli di espressione dell'enzima tioredoxina reduttasi (TRX-Red) sono stati osservati in ratti senescenti rispetto ai ratti anziani in tutte le aree cerebrali esaminate (Fig 22A). Inoltre, nelle Figs 20-21-22B sono riportati i *western blots* più rappresentativi relativi ai livelli di espressione rispettivamente delle proteine citoprotettive Hsp90, TRX e dell'enzima TRX-Red in aree cerebrali di ippocampo di ratti senescenti e ratti anziani. Indice dello stato di stress ossidativo nel cervello invecchiato è dato dalla misura di proteine carbonilate (231-232). Inoltre, durante l'invecchiamento si manifestano anche evidenti processi di perossidazione lipidica a livello di macromolecole biologiche *target*, valutabili tramite la misura di un'aldeide reattiva (4-HNE) (101, 231). La determinazione dei livelli di espressione di HNE in differenti aree cerebrali sia di ratti senescenti che di ratti invecchiati, mostra aumentati livelli di espressione di 4-HNE in tutte le regioni cerebrali, eccetto nel cervelletto, in maniera consistente agli elevati livelli di GSH riscontrati nella stessa area cerebrale (Fig 23A). Inoltre, un significativo incremento nel contenuto di proteine carbonilate, quale indice di danno ossidativo alle proteine (239), è stato osservato nei ratti invecchiati in tutte le aree cerebrali esaminate (Fig 23B), escluso il cervelletto, dati che confermano i risultati ottenuti per la valutazione dei livelli di espressione di HNE. Nella Figs 23C e D sono riportati i *Western blots* più rappresentativi relativi alla valutazione rispettivamente dei livelli di espressione di 4-HNE e del contenuto di proteine carbonilate in aree cerebrali di ippocampo di ratti senescenti ed invecchiati.

STUDI *IN VITRO*: EFFETTO CITOPROTETTIVO DELLA CARNOSINA (CRNS) E DELLA CARNOSINA-TREALOSIO (CRNS-T) IN CULTURE CELLULARI DI NEUROBLASTOMA SH-SY5Y TRATTATE CON DONATORE DI PEROSSINITRITO (SIN-1)

Esperimenti *in vitro* condotti su linee cellulari di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y ci hanno permesso di valutare il potenziale antiossidante relativo a molecole citoprotettive di recente acquisizione (CRNS, CRNS-T) contro gli effetti citotossici dati da composti ossidanti (SIN-1). Linee cellulari di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y sono comunemente utilizzate quale modello di studio *in vitro* per i processi di differenziazione e di sviluppo dei neuroni, oltre che per lo studio sperimentale degli effetti mediati dall'esposizione ad agenti citotossici o citostatici. Studi di *vitalità cellulare* hanno evidenziato che il trattamento (4h) di cellule SH-SY5Y indifferenziate con SIN-1 (1.0mM), potente donatore di perossinitrito (62), determina una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare rispetto a cellule non trattate e cellule esposte al trattamento con carnosina (CRNS) a diverse concentrazioni (300µM, 1.0mM, 10mM) o carnosina-trealosio (CRNS-T)

(1.0mM) (**Fig 24**). Il pretrattamento a -1h con carnosina o carnosina-trealosio, porta ad un evidente e graduale incremento della *vitalità cellulare* riducendo marcatamente gli effetti ossidanti dati dall'esposizione all'agente nitrosativo SIN-1 (**Fig 24**). La **Fig 25** mostra ancora gli effetti citotossici dati dall'esposizione di cellule SH-SY5Y indifferenziate all'agente ossidante SIN-1 (1.0mM) rispetto a cellule di neuroblastoma controllo e neuroni sottoposti al trattamento con carnosina a diverse concentrazioni (300µM, 1.0mM, 10mM) o carnosina-trealosio (1.0mM), determinando una significativa riduzione nella "*cell viability*". Per di più, il pretrattamento a -6h evidenzia gli effetti citoprotettivi espletati dai due composti antiossidanti (CRNS e CRNS-T), portando ad un incremento significativo della sopravvivenza cellulare rispetto a cellule SH-SY5Y indifferenziate esposte al solo trattamento con SIN-1 (**Fig 25**). Studi di *vitalità cellulare* su cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y indifferenziate sottoposte al trattamento, per un tempo di esposizione di 7h, con l'agente ossidante SIN-1 (1.0mM) in presenza ed in assenza di composti antiossidanti (CRNS, CRNS-T), hanno mostrato un'apprezzabile riduzione della sopravvivenza cellulare di cellule trattate con l'agente stressogeno SIN-1 (1.0mM) rispetto a cellule SH-SY5Y indifferenziate controllo o cellule esposte al trattamento con i due composti antiossidanti, rispettivamente CRNS a diverse concentrazioni (300µM, 1.0mM, 10mM) o CRNS-T (1.0mM) (**Fig 26**). Inoltre, i nostri dati sperimentali indicano che il pretrattamento a -1h con carnosina o carnosina-trealosio induce ancora uno stato di citoprotezione, riducendo significativamente gli effetti citotossici dati dall'esposizione (7h) a SIN-1 (1.0mM) e determinando conseguentemente un incremento della *vitalità cellulare* (**Fig 26**) (**62**). Infine, ulteriori saggi di *vitalità cellulare* hanno evidenziato che il pretrattamento a -6h con carnosina (300µM, 1.0mM, 10mM) o carnosina-trealosio (1.0mM), dopo un tempo di esposizione di 7h, di cellule SH-SY5Y indifferenziate, è ancora in grado di determinare degli effetti antiossidanti e citoprotettivi contro l'azione neurotossica mediata dall'agente ossidante SIN-1 (1.0mM), incrementando la sopravvivenza cellulare seppure in maniera meno accentuata rispetto al pretrattamento a -1h con gli stessi composti antiossidanti e nelle medesime condizioni sperimentali (**Fig 27**) (**34, 39-40, 62**). In accordo ad emergenti studi sperimentali i quali riportano le modificazioni cellulari deleterie mediate dagli effetti di particolari donatori di NO (SIN-1), incluse l'ossidazione di biomolecole contenenti gruppi tiolici, la nitratura di proteine *target*, processi di perossidazione lipidica così come la rottura alle catene del DNA, largamente responsabili della citotossicità indotta dal perossinitrito nei sistemi biologici (**62, 125, 240-241**), esperimenti di *vitalità cellulare* su cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y indifferenziate sottoposte al trattamento con SIN-1 (1.0mM) a vari tempi di esposizione (4h, 7h, 12h, 24h) hanno mostrato una riduzione significativa della "*cell viability*", pressoché costante nei diversi tempi di esposizione, rispetto a cellule controllo non trattate (**Fig 28**). In maniera consistente

a studi sperimentali i quali riportano una particolare suscettibilità di linee cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y al danno ossidativo e/o nitrosativo, l'indagine sperimentale relativa ai livelli di espressione del contenuto di gruppi carbonilici proteici totali in cellule SH-SY5Y indifferenziate esposte al trattamento con dosi crescenti di SIN-1 (0.5mM, 1.0 mM, 2.0mM) a diversi tempi di esposizione, rispettivamente 7h e 24h, ha evidenziato un incremento graduale dose-dipendente nei livelli di espressione di proteine carbonilate, significativamente più marcato dopo trattamento a 24h con SIN-1 alle differenti dosi (0.5mM, 1.0 mM, 2.0mM), rispetto a cellule SH-SY5Y indifferenziate non trattate (**Fig 29**). In accordo a numerose evidenze sperimentali le quali indicano che il processo di perossidazione lipidica, quantificabile dai livelli di 4-HNE, si evidenzia in differenti sistemi biologici sottoposti ad intenso stress ossidativo, la determinazione dei livelli di espressione di 4-HNE in cellule SH-SY5Y indifferenziate (**Fig 30**) ha mostrato un significativo e graduale incremento nei livelli di espressione relativi al contenuto di tale prodotto aldeidico in cellule SH-SY5Y indifferenziate dopo esposizione al trattamento con SIN-1 alle diverse concentrazioni (0.5mM, 1.0mM, 2.0mM), rispettivamente nei tempi di esposizione di 7h e 24h, con aumento cospicuo dell'immunoreattività a 24h dal trattamento con SIN-1 alle dosi di 1.0mM e 2.0mM. Analogamente a quanto riportato da Motterlini e collaboratori (**62**), i quali hanno precedentemente dimostrato che composti donatori di NO, tra cui il SIN-10, un particolare farmaco anti-angina che viene convertito in modo specifico nell'agente attivo SIN-1, determinano incrementati livelli di espressione della proteina citoprotettiva *heat shock* eme ossigenasi in modelli di studio *in vitro* rappresentati da epatociti, portando ad una significativa resistenza al danno ossidativo indotto da composti stressogeni, le nostre indagini sperimentali hanno evidenziato un incremento significativo dose-dipendente nei livelli di espressione proteica dell'HO-1 in cellule SH-SY5Y indifferenziate dopo trattamento con SIN-1 alle diverse concentrazioni (0.5mM, 1.0mM, 2.0mM), soprattutto dopo 24h di esposizione alla concentrazione di SIN-1 2.0mM (**Fig 31**) (**12, 17-18, 31, 36, 126**). Infine, in maniera consistente alle numerose evidenze sperimentali le quali indicano una significativa associazione tra i livelli di espressione delle proteine Hsp70 ed entità del danno cellulare (**12, 17-18, 31**), l'analisi mediante *Western blot* in cellule di neuroblastoma umano tipo SH-SY5Y indifferenziate sottoposte al trattamento a 7h con SIN-1 (1.0mM) in presenza ed in assenza di CRNS a diverse concentrazioni (300µM, 1.0mM, 10mM) ha evidenziato una significativa induzione nei livelli di espressione proteica di Hsp70 dopo trattamento con l'agente ossidante SIN-1 (1.0mM) ed un graduale decremento di tali livelli proteici in seguito al pre-trattamento a -1h con il composto antiossidante CRNS, supportando il ruolo chiave svolto da agenti citoprotettivi nella modulazione di meccanismi molecolari di difesa endogeni rappresentati

dall'attivazione di proteine *heat shock* alla base dei processi riparativi contro gli effetti dannosi mediati da vari insulti citotossici **(34) (Fig 32)**.

STUDIO GENETICO-MOLECOLARE DEL GENE NF1 IN CASI CLINICI DI ETÀ PEDIATRICA

In un totale di 50 pazienti accettati è stata conclusa l'analisi genetico-molecolare in 33 casi clinici permettendo l'identificazione di 21 tipi differenti di mutazioni nel gene NF1 allo stato eterozigote, comprendenti mutazioni da *splicing* aberrante, microdelezioni *in frame* e *frameshift*, microinserzioni *frameshift*, mutazioni *missense*, *nonsense* e da *delezione genomica*, delle quali sono riportati di seguito i casi più rappresentativi. Attualmente, è in corso l'analisi genetica mediante sequenziamento diretto in altri 17 casi clinici pervenuti. L'analisi genetico-molecolare e mutazionale su campioni di linfociti periferici eseguita mediante l'applicazione di metodiche di amplificazione genica e successivo sequenziamento diretto **(205)** dei 24 Frammenti del trascritto cDNA e del DNA genomico del gene NF1 ha permesso di identificare la presenza della sostituzione del nucleotide C con il nucleotide A in posizione 6243 (**c.6243C>A**) del gene NF1 (sequenza di riferimento nota *Ensembl Genome Browser, NF1-002 ENST00000356175*) allo stato eterozigote **(Fig 34)**. Tale mutazione, non precedentemente riportata in letteratura, determina la formazione di un codone di stop in posizione 2081 della proteina (**p.Y2081X**) con degli effetti chiaramente patogenetici per il ruolo biologico svolto dalla proteina neurofibromina. La **Fig 35** mostra la presenza di un'ulteriore neomutazione *nonsense* in posizione 5170 (**c.5170A>T**) nel gene NF1 allo stato eterozigote. L'analisi genetico-molecolare ha evidenziato la sostituzione del nucleotide A con il nucleotide T e formazione di un codone di stop in posizione 1724 (**p.K1724X**) associata alla sintesi di una proteina tronca. Sulla base di tali elementi è stato possibile attribuire anche a tale mutazione genica un significato chiaramente patogenetico. In accordo ad evidenze cliniche e sperimentali le quali riportano l'esistenza di un ampio spettro di mutazioni associate a meccanismi di *splicing* aberrante **(199, 205, 213)** che caratterizzano il gene NF1, la **Fig 36** mostra la presenza della delezione del nucleotide A nel sito accettore di *splicing* dell'introne 23 del gene NF1 allo stato eterozigote (**c.3114-2delA**). Tale alterazione determina uno *splicing* anomalo con "skipping" dell'esone 24 e successiva formazione di un trascritto aberrante del gene NF1. La **Fig 37** mostra la presenza di un'ulteriore mutazione da alterato processo di *splicing*. In particolare, l'indagine genetico-molecolare eseguita ha evidenziato la presenza di una mutazione *missense* patogenetica

caratterizzata dalla sostituzione del nucleotide G con il nucleotide A in posizione 1885 del gene NF1 allo stato eterozigote (**c.1185G>A**). Tale mutazione, precedentemente riportata in letteratura (**242**) determina l'introduzione di un sito di *splicing criptico* nell'esone 17 del gene NF1 con formazione di un trascritto aberrante. Infine, nella **Fig 38** è riportata la presenza di un'altra mutazione da *splicing* aberrante che interessa l'Esone 11 del gene NF1 allo stato eterozigote (**IVS10-2A>G**). Tale mutazione nota (**243**) determina la formazione di un trascritto anomalo caratterizzato dalla delezione *in frame* dei primi cinque codoni dell'Esone 11 del gene NF1. Per di più l'impiego dei nostri test genetici basati sull'amplificazione genica e sul sequenziamento diretto per l'indagine molecolare e la ricerca di mutazioni puntiformi del gene NF1 ha permesso di identificare la presenza di mutazioni da microdelezione *in frame* e *frameshift* nel gene NF1 allo stato eterozigote. In particolare, la **Fig 39** mostra la presenza di una mutazione nota *in frame* caratterizzata dalla delezione dei nucleotidi AACTTT in posizione c.7095-7101 nell'Esone 47 del gene NF1 allo stato eterozigote (**c.7097-7101delAACTTT**) (**244**) (**Fig 39**). Tale mutazione determina la delezione degli aminoacidi Asparagina e Fenilalanina in posizione 2366-2367 (**p.2366-2367Asn-Phedel**) della proteina causando delle alterazioni patogenetiche nella struttura e funzione biologica della neurofibromina. Viceversa, la **Fig 40** riporta la presenza di una neomutazione caratterizzata dalla delezione di un singolo nucleotide in posizione 4577 nel gene NF1 (**c.4577delG**) allo stato eterozigote. Tale mutazione determina un *frameshift* del normale codice di lettura dal codone 1526 e la formazione di un codone di stop in posizione 1552 della proteina (**p.1526Glyfs1552X**), con degli effetti chiaramente patogenetici sulla funzione biologica svolta dalla neurofibromina (**Fig 40**) (**189, 191, 193**). I nostri protocolli diagnostici e le metodiche genetico-molecolari impiegati hanno permesso l'identificazione anche di mutazioni puntiformi da microinserzione nel gene NF1 in ulteriori casi clinici esaminati (**205**). In particolare, l'indagine genetico-molecolare eseguita su ulteriori casi clinici ha evidenziato la presenza della mutazione data dall'inserzione di un singolo nucleotide in posizione 4441 del gene NF1 (**c.4441insT**) allo stato eterozigote (**Fig 41**). Tale mutazione, non precedentemente riportata in letteratura, determina il *frameshift* del normale codice di lettura dalla posizione 1480 e la formazione di un codone di stop in posizione 1508 (**p.1480Aspfs1508X**). Sulla base di tali elementi è possibile attribuire a tale mutazione un significato chiaramente patogenetico (**Fig 41**). Per di più, la **Fig 42** pone in evidenza la presenza di una neomutazione caratterizzata dall'inserzione di 4bp nel gene NF1 allo stato eterozigote in posizione 2930-2931 (**c.2930-2931insATTC**). Tale mutazione sicuramente patogenetica determina la sostituzione aminoacidica in posizione 978 dell'aminoacido Glicina con l'aminoacido Fenilalanina e successiva formazione di un codone di stop in posizione 982 del trascritto (**p.Gly978Phefs982X**) (**Fig 42**). Se da un lato le mutazioni sopra riportate determinano

degli effetti patogenetici sul trascritto e quindi sulla funzione biologica della proteina neurofibromina derivata dall'espressione del gene NF1 (**189, 191, 193**), mutazioni geniche caratterizzate dalla singola sostituzione nucleotidica associate ad un singolo cambio aminoacidico nel trascritto (*missense*) sono di difficile interpretazione. A tal riguardo, le **Fig 43** ed **44** mostrano l'analisi genetico-molecolare del gene NF1 di un caso clinico accertato nella quale si evidenzia la presenza di due differenti mutazioni geniche puntiformi del tipo *missense*. Nel dettaglio, l'indagine eseguita ha evidenziato la sostituzione del nucleotide T con il nucleotide G in posizione 41 (**c.41T>G**) (**Fig 43**) e la sostituzione del nucleotide G con il nucleotide A in posizione 8332 (**c.8332G>A**) (**Fig 44**) del gene NF1 allo stato eterozigote. Tali mutazioni determinano rispettivamente la sostituzione dell'aminoacido Valina con l'aminoacido Glicina in posizione 14 (**p.V14G**) (**Fig 43**) e dell'aminoacido Valina con l'aminoacido Isoleucina in posizione 2778 (**p.V2778I**) (**Fig 44**) della proteina. Tali mutazioni non sono state riportate precedentemente in letteratura. L'analisi di tali sostituzioni mediante il *software Polyphen* ha messo in evidenza la relativa conservazione evolutiva dell'aminoacido Valina coinvolto in entrambe le sostituzioni. Inoltre, l'aminoacido Glicina mostra proprietà chimico-fisiche differenti dall'aminoacido Valina e potrebbe determinare alterazioni strutturali/funzionali della proteina. Viceversa, l'aminoacido Isoleucina mostra proprietà simili alla Valina. Pertanto sulla base di tali elementi ed in riferimento a quanto riportato nei *software Polyphen* ed *Human Mutation Database* è possibile effettuare delle predizioni sulle due mutazioni puntiformi riportate attribuendo un probabile significato patogenetico alla mutazione (**c.41T>G**) (**p.V14G**) (**Fig 43**). L'indagine genetica del gene NF1 mediante sequenziamento diretto dopo amplificazione genica, a volte non consente di identificare le mutazioni puntiformi che rappresentano il 90% circa delle mutazioni riscontrate nei casi clinici NF1. Recentemente, nel nostro laboratorio è stato messo a punto un nuovo protocollo diagnostico basato sull'impiego della metodica MLPA (*Multiple ligation-dependent probe amplification*) per la ricerca dei riarrangiamenti genomici, quali estese duplicazioni e/o delezioni intrageniche (**207**). Quindi, tutti i casi clinici risultati negativi al sequenziamento diretto sono stati esaminati mediante l'applicazione del test genetico MLPA. L'analisi molecolare del gene NF1 mediante MLPA e successiva elettroforesi capillare ha permesso di identificare la presenza di una delezione genomica dell'intero gene NF1 sia nel probando o caso indice affetto che nel genitore (**Fig 45**) e l'esistenza della delezione di un singolo esone (esone 1) del gene NF1 allo stato eterozigote in un altro caso clinico (**Fig 46**) (**207, 214**).

Ulteriori indagini saranno effettuate al fine di ampliare la casistica di mutazioni del gene NF1 e di delucidare i possibili meccanismi biochimici alla base di tali mutazioni genetiche e di stabilire un'eventuale correlazione genotipo-fenotipo.

DISCUSSIONE

Emergenti evidenze sperimentali indicano il coinvolgimento dello stress ossidativo alla base dei meccanismi patogenetici che portano al danno neuronale in diverse condizioni patologiche, inclusi i disordini neurodegenerativi, quali la malattia di Alzheimer, e l'invecchiamento fisiologico (**1, 3, 8, 12, 36, 48, 66**). Il cervello è dotato di un'elevata capacità ossidativa ma di una ridotta abilità nel limitare il danno ossidativo (**1, 3**). All'interno delle cellule, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono prodotte fisiologicamente in una ridotta quantità, come prodotti finali del normale metabolismo aerobico e come secondi messaggeri in diversi *signaling pathways*. In condizioni fisiologiche, si ha un equilibrio tra fattori pro-ossidanti ed agenti antiossidanti, il quale è necessario per assicurare un'efficiente mantenimento delle difese antiossidanti endogene (**3, 5, 12, 31, 65, 77**). Tuttavia, quando il *rate* di produzione di radicali liberi eccede la capacità detossificante delle normali difese antiossidanti si instaura una condizione di stress ossidativo che rappresenta un rischio per l'integrità strutturale e funzionale di molecole importanti come DNA, proteine e lipidi (**1, 3, 7, 10, 16, 21**) (**Fig 1A**). I segni molecolari predominanti associati all'invecchiamento sono dati dall'accumulo abnorme di prodotti derivati da un'alterata espressione genica. Per di più, i disordini neurologici quali la malattia di Alzheimer e di Parkinson e l'atassia di Friedreich sono caratterizzati da un comune meccanismo patogenetico, dato dall'eccessivo accumulo di proteine *target misfolding* e *misfolded* modificate ossidativamente, dalla disfunzione mitocondriale e dallo stress ossidativo, il quale contribuisce alla patogenesi di tali disordini, definiti “*malattie da alterata conformazione proteica*” (**102-103, 108, 232-234, 236, 245-246**). L'invecchiamento è caratterizzato da un progressivo deterioramento delle funzioni fisiologiche e dei processi metabolici. Nell'invecchiamento ed, in generale, in tutti gli stati patologici correlati all'età, inclusi la malattia di Alzheimer o di Parkinson, la perdita delle strutture vitali cellulari può essere associata a diversi fattori, tra i quali la produzione di ROS e/o RNS nel mitocondrio rappresenta un comune denominatore, il quale porta a morte cellulare per apoptosi. Con il termine di invecchiamento si intende un processo biologico estremamente complesso e multifattoriale (**247-249**). Le attuali evidenze suggeriscono che, in generale, la riduzione dell'espressione cellulare e dell'attività di proteine antiossidanti associata ad una diminuzione nell'efficienza dei meccanismi cellulari di riparazione e di degradazione ed il conseguente incremento dei livelli di stress ossidativo e/o

nitrosativo rappresentano una delle cause fondamentali sia dei normali processi d'invecchiamento che delle principali malattie neurodegenerative (1, 9, 12, 34, 96, 249). E' ormai assodato che un'incrementata produzione di specie radicaliche ed una ridotta efficienza dei meccanismi riparativi-degradativi, inclusi le difese antiossidanti endogene ed il sistema proteosomale, sono fattori che primariamente contribuiscono ad elevare i livelli di stress ossidativo determinando l'insorgenza dei disordini neurodegenerativi e causando danno neuronale (1, 9, 18, 27, 31, 45, 235, 248). Il sistema nervoso centrale ha adottato degli efficienti sistemi conservati al fine di ridurre l'accumulo di proteine anomale e di altri fattori citotossici. Uno dei principali sistemi redox intracellulari coinvolti nella neuroprotezione, il sistema dei *vitageni* è emerso quale potenziale neurometico *target* di innovative strategie terapeutiche citoprotettive (15, 17-18). Il sistema dei *vitageni* codifica per proteine *heat shock* citoprotettive, quali Hsp70, HO-1 e per il sistema redox della tioredoxina riduttasi. Studi nutrizionali hanno dimostrato che l'invecchiamento negli animali può essere significativamente influenzato dalla restrizione calorica (18, 66). Di conseguenza, l'impatto dei componenti della dieta sulla salute e sulla longevità è stato oggetto di apprezzabili ricerche di interesse scientifico (11, 15, 17, 19). Studi genetici inoltre hanno mostrato che l'invecchiamento può essere controllato da alterazioni intracellulari nel rapporto NAD/NADH regolato dalle sirtuine, un gruppo di proteine associate all'invecchiamento ed alla tolleranza allo stress in diversi organismi (18, 250). Recenti scoperte suggeriscono che diversi composti fitochimici esibiscono una risposta bifasica nelle cellule, per cui a basse concentrazioni attivano *signaling pathways* correlati ad un'incrementata espressione dei *vitageni* codificanti per proteine citoprotettive, incluso il *pathway* Keap1/Nrf2/ARE attivato dal curcumino, un antiossidante nutrizionale (33, 219, 251). In maniera consistente, è stato dimostrato il ruolo neuroprotettivo svolto da diversi antiossidanti nutrizionali presenti nella dieta, inclusi il curcumino, l'acetil-L-carnitina e la carnosina, attraverso l'induzione di *pathways* redox-sensitivi endogeni (2, 17, 19, 31, 33, 35-38, 219, 251). Sebbene sia ampiamente accettata l'idea della funzione neuroprotettiva svolta dalle proteine *heat shock*, ulteriori studi saranno necessari al fine di correlare il meccanismo di neuroprotezione con specifici *pattern* di risposta cellulare allo stress. I dati del presente studio sperimentale indicano l'importanza del sistema dei *vitageni* alla base della risposta cellulare allo stress ed il potenziale impiego di antiossidanti nutrizionali nella prevenzione e nel trattamento dei disordini neurodegenerativi, dell'invecchiamento e delle patologie sistemiche (12, 17, 251). L'emergente evidenza sperimentale in base alla quale il *network* dei *vitageni* opera quale sistema di difesa nel cervello in seguito ad aumentati livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo apre nuove prospettive nel campo della medicina per il trattamento dei disordini neurodegenerativi e di altre patologie età-dipendenti (2, 12, 14, 31, 249, 251). Di conseguenza, la manipolazione mediata da

composti nutrizionali dei meccanismi endogeni di difesa cellulare rappresenta un innovativo approccio di intervento terapeutico per le neurodegenerazioni e propone potenziali strategie terapeutiche basate sull'attivazione di geni citoprotettivi, appartenenti al programma di *vitalità cellulare*, e sulla repressione di geni pro-infiammatori coinvolti nella morte cellulare programmata (11, 15, 17-18). Sebbene il termine *vitagene* è stato per la prima volta proposto per indicare l'esistenza di geni opposti ai gerontogeni, l'evidenza relativa all'identificazione del sistema dei *vitageni*, ossia di geni citoprotettivi correlati alla risposta cellulare allo stress, inclusi HO-1, Hsps e TrxR, è stata fornita per la prima volta dal nostro gruppo (251) (Fig 1A). I dati del presente studio evidenziano il ruolo centrale svolto da tale sistema di difesa endogeno nella tolleranza cellulare allo stress, con possibili implicazioni terapeutiche nel campo della biologia e della medicina. A tal riguardo il concetto di "*hormesis*" ha ricevuto una grande attenzione da parte della comunità scientifica (14-15, 17-18, 31). Nel campo della biologia e della medicina il concetto di "*hormesis*" è definito come una risposta adattativa delle cellule e degli organismi a condizioni di moderato stress. Recenti scoperte scientifiche hanno permesso di delucidare il *signaling pathway* ed i meccanismi molecolari che stanno alla base della *risposta ormetica*, la quale coinvolge tipicamente enzimi e vari fattori di trascrizione redox-sensitivi inclusi Nrf2 ed NF-KB. Come risultato, la cellula incrementa la produzione di proteine citoprotettive, inclusi i fattori di crescita, enzimi antiossidanti di fase II e proteine *chaperonine* (14-15, 17-18, 251). Una migliore conoscenza del meccanismo ormetico a livello cellulare e molecolare fornisce un innovativo approccio per la prevenzione ed il trattamento di diverse malattie (14-15, 17-18, 31). Numerose evidenze supportano l'ipotesi sperimentale in base alla quale il mantenimento di differenti *pathways* citoprotettivi mediati da interventi esogeni, rappresentati da condizioni di *mild stress* o da composti antiossidanti nutrizionali, aventi come *target* il sistema *heat shock*, inclusi i polifenoli, l'acetil-L-carnitina e la carnosina, riveste un importante significato biologico, quale innovativo approccio terapeutico in grado di ritardare l'esordio di diverse alterazioni cellulari associate all'invecchiamento (2, 17, 19, 31, 33, 35-38, 219, 251). Tra gli antiossidanti, la carnosina (β -alanina-L-istidina, AH) è stata descritta come un enigmatico dipeptide (252). Recentemente, l'identificazione della carnosina e dei suoi analoghi, omocarnosina ed anserina, nel sistema nervoso centrale ed in alcune sue alterazioni, ha suggerito un suo potenziale impiego per il trattamento dei disordini neurodegenerativi (34-35, 37-38, 42, 253). E' stato dimostrato che la carnosina è neuroprotettiva, grazie alla sua abilità di contrastare gli effetti dati sia dallo stress ossidativo che dallo stress nitrosativo associati a diversi stati patologici (35, 37-39, 42, 254). Oltre alle ben documentate attività antiossidanti, antiglicanti, *scavenger* e le proprietà chelanti degli ioni metallici tossici, la carnosina influenza il metabolismo di polipeptidi alterati, il cui accumulo caratterizza il fenotipo senescente (34, 37-38, 42, 252). La teoria

dell'invecchiamento basata sulla produzione di specie radicaliche secondo *Harman* (255-256), considera l'invecchiamento un processo biologico causato da una continua perdita della fedeltà molecolare associata all'inattivazione di macromolecole biologiche essenziali e di strutture sub-cellulari, in seguito ad alterazioni prodotte dalle specie radicaliche. Un ulteriore raffinamento di tale ipotesi è dato dalla teoria mitocondriale sull'invecchiamento, la quale considera il mitocondrio il *pacemaker* del tessuto invecchiato, grazie alla sua continua produzione di radicali superossido e di NO (48, 257-258). I dati sperimentali del presente studio indicano aumentati livelli di stress ossidativo nel cervello durante l'invecchiamento, come indicato da elevati livelli di alcuni *biomarker* rappresentati da un alto contenuto di aldeidi reattive e di gruppi carbonilici. Tali alterazioni sono particolarmente evidenti in alcune aree cerebrali, date dall'ippocampo e dalla sostanza nera, suscettibili al danno ossidativo. Ciò è in accordo con altre osservazioni sperimentali le quali indicano la presenza di processi di atrofia dell'ippocampo durante l'invecchiamento ed in alcuni disordini neurologici associati a perdita della memoria e *deficit* cognitivi (48). Relativamente al sistema delle *heat shock*, i nostri dati mostrano elevati livelli di espressione di Hsp72 in ratti senescenti rispetto a ratti invecchiati, con un profilo di espressione più elevato nell'ippocampo e nella sostanza nera (34). Un *pattern* di espressione simile è stato osservato per quanto riguarda i livelli di espressione di HO-1, ad indicare il coinvolgimento sinergico di tali geni citoprotettivi alla base della *risposta cellulare allo stress* (34). Inoltre, i nostri studi dimostrano un'incrementata espressione dell'enzima tioredoxina riduttasi, associata possibilmente ad un decremento nei livelli di espressione della proteina Trx in tutte le aree cerebrali investigate, avvalorando il ruolo chiave svolto dallo stato redox nell'attivazione di risposte cellulari citoprotettive, inclusa la sintesi di proteine *heat shock* (34). Infine, le nostre indagini hanno mostrato un significativo decremento nei livelli di espressione di Hsp90 nelle aree cerebrali dell'ippocampo e della corteccia, in ratti senescenti rispetto a ratti controllo invecchiati (34). Considerate in una visione d'insieme, i dati sperimentali del presente studio indicano che l'espressione delle Hsps aumenta durante l'invecchiamento ed in presenza di alterazioni dello stato redox, al fine di limitare le conseguenze deleterie date dall'eccessiva produzione di proteine alterate ossidativamente (1, 3, 5, 8, 12). Riguardo ciò, abbiamo rivolto il nostro interesse verso lo sviluppo di innovativi interventi nutrizionali, dati da antiossidanti presenti nella dieta, aventi come *target* tali geni citoprotettivi redox-sensitivi, definiti *vitageni*, coinvolti nella neuroprotezione e nel mantenimento dell'omeostasi e dei processi che assicurano la longevità (2, 123, 251). Il costo dato dall'impatto dei disordini neurodegenerativi e di altre patologie croniche sulla nostra società è destinato ad aumentare, a causa dell'incremento di soggetti anziani nella popolazione. E' dunque auspicabile migliorare le misure di prevenzione che si basano sull'intrinseca attivazione di meccanismi citoprotettivi descritti nel

presente studio. Delucidare la capacità antiossidante di piccole molecole nutrizionali, molte delle quali sono agenti presenti nella dieta, in grado di indurre tali difese endogene, date dal sistema dei *vitageni*, rappresenta un'area di particolare interesse scientifico per futuri sviluppi nel campo della medicina e della biologia **(11, 36)**.

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta un progressivo disordine neurodegenerativo caratterizzato dalla perdita di memoria e della capacità di linguaggio, dal declino delle facoltà cognitive e dal graduale disorientamento **(96)**. Microscopicamente, le caratteristiche istologiche e neuropatologiche più importanti includono la deposizione intracellulare di *matasse neurofibrillari* (NFTs), la formazione extracellulare di *placche neuritiche senili* date dall'accumulo anormale del peptide β -amiloide (A β), derivato dal metabolismo del suo precursore proteico (APP) e dalla riduzione del numero delle sinapsi. E' ormai assodato che il cervello di soggetti Alzheimer è sottoposto ad un esteso ed intenso stress ossidativo e/o nitrosativo, il quale svolge un ruolo chiave nella patogenesi e nella progressione di tale disordine **(9, 69, 96, 99, 259)**. Crescenti evidenze sperimentali indicano che lo stress ossidativo aumenta frequentemente i processi di autossidazione dei lipidi insaturi di membrana ad opera del radicale idrossile. Le aldeidi reattive, le quali si possono formare dalla frammentazione mediata dagli ioni metallici degli idroperossidi lipidici, possono modificare proteine funzionali, comprendenti canali ionici, recettori ed enzimi di membrana, attraverso l'alterazione dei meccanismi d'interazione proteina-proteina e dei legami intramolecolari. Inoltre, le modificazioni biochimiche che avvengono durante l'invecchiamento ed i meccanismi di stress ossidativo possono accelerare sinergicamente il danno alle proteine **(3, 9, 219, 235, 239)**. Un'ampia varietà di altre potenziali fonti di stress ossidativo è considerata alla base degli eventi eziopatogenetici della malattia di Alzheimer. Evidenze sperimentali dimostrano che la concentrazione di ferro, un potente catalizzatore della formazione di radicali ossidrilici, risulta fortemente incrementata nei neuroni che circondano le *matasse neurofibrillari*, uno dei segni patognomici del morbo di Alzheimer **(96, 260)**. Inoltre, un aumento di ferro libero potrebbe determinare in un secondo momento un'accentuata alterazione di proteine funzionali biologicamente importanti, fenomeno dovuto principalmente agli effetti ossidanti dati da ioni metallici e da zuccheri riducenti **(261)**. Un'altra sorgente fondamentale responsabile di un'iperproduzione di radicali liberi nella neurodegenerazione di Alzheimer è fornita anche da un'eccessiva attivazione e proliferazione delle cellule microgliali **(96)**. Inoltre, aumentati processi di perossidazione lipidica e le relative modificazioni strutturali delle membrane biologiche che si osservano nella degenerazione neuronale e neuritica, determinano un influsso di ioni calcio che possono causare una destabilizzazione del citoscheletro con attivazione di specifici enzimi

degradativi della cellula (231, 262). Infine, numerosi studi *post-mortem* riportano una diminuzione dell'attività del complesso IV a livello della corteccia cerebrale di individui affetti da malattia di Alzheimer (96). L'esatto meccanismo molecolare che sta alla base del declino dell'attività cinetica di tale complesso enzimatico non è ancora del tutto chiaro, tuttavia numerose dimostrazioni scientifiche indicano che il complesso IV della catena respiratoria mitocondriale è particolarmente suscettibile al danno ossidativo (263). Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che il metabolismo del NO presenta evidenti alterazioni biochimiche nella degenerazione di Alzheimer (1, 50, 96). Il fattore di derivazione gliale, S-100- β , il quale risulta *up-regolato* in numerose condizioni patologiche, determina una marcata espressione dell'*isoforma* enzimatica inducibile (iNOS) responsabile della sintesi del NO in astrociti, contribuendo in tal modo al processo di morte neuronale per apoptosi mediata da NO in un sistema *in vitro* di co-cultura (1, 50, 96). Inoltre, è stato riportato che il peptide β -amiloide è in grado di attivare la iNOS in una linea cellulare ibrida costituita da cellule di substantia nigra/neuroblastoma (96). L'analisi *post-mortem* di campioni di cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer ha rivelato la presenza di un *biomarker* quantificabile, la nitrotirosina, come risultato di processi di nitrificazione progressiva dati dall'agente ossidante perossinitrito (ONOO^-) e residui di tirosina presenti in proteine biologiche *target*, non osservabile nei cervelli di soggetti controllo di pari età (264). Nonostante le evidenze sperimentali appena descritte le quali sostengono una prominente attivazione del metabolismo del NO nella malattia di Alzheimer, l'analisi della concentrazione dei nitriti+nitrati (prodotti finali stabili derivati dalla degradazione del NO) nel liquido cefalorachidiano (CSF), ha rivelato in pazienti AD dei livelli assolutamente comparabili a quelli ottenuti per gli individui controllo (265). Tale osservazione sperimentale ovviamente non ci consente di dismettere il ruolo svolto dal sistema NO/ ONOO^- nel determinismo patogenetico della malattia di Alzheimer, ma indica semplicemente che la produzione di specie reattive del NO avviene ad un livello che non necessariamente implica un loro incremento nel CSF. Il peptide β -amiloide ($\text{A}\beta$), il principale componente delle *placche senili* ed il più importante *marker* neuropatologico della neurodegenerazione di Alzheimer, riveste un ruolo centrale alla base dei meccanismi eziopatogenetici di tale disordine. Il peptide idrofobico che si accumula nelle *placche neuritiche* consta di 40-42 residui aminoacidici ed è prodotto da eventi proteolitici successivi mediati dall'attività di clivaggio di enzimi β e γ -secretasi a partire da un polipeptide precursore transmembranario definito β -APP. Per di più, è ormai assodato che il cervello di soggetti Alzheimer è sottoposto ad un esteso ed intenso stress ossidativo e/o nitrosativo (9, 96-97, 99, 101). Tali due ultime osservazioni scientifiche possono essere unificate in un unico modello sperimentale che giustifica la neurodegenerazione evidenziabile nella patologia di Alzheimer. Secondo questo modello i radicali liberi associati al peptide β -amiloide inducono

evidenti fenomeni di perossidazione lipidica e di ossidazione delle proteine, la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'accumulo di Ca^{2+} intracellulare e mitocondriale, e portano ad eventuale morte neuronale per apoptosi (**1, 101-103**). Evidenze sperimentali che sostengono l'ipotesi ossidativa alla base della patogenesi del morbo di Alzheimer trovano un riscontro in dati clinici i quali rivelano che i livelli plasmatici dei carotenoidi e, quindi, della vitamina E sono ridotti in pazienti affetti da AD rispetto ai soggetti controllo. Indagini sperimentali e *trials* clinici indicano che il trattamento antiossidante con vitamina E, ad una specifica dose giornaliera, clinicamente previene o modula nei neuroni gli effetti indotti dal peptide β -amiloide (**121, 123**) e rallenta la progressione della malattia di Alzheimer. In accordo a questo modello, composti *scavenger* dei radicali liberi possono bloccare la lipoperossidazione avviata dal peptide A β in sinaptosomi corticali (**266**). Inoltre, l'ossidazione proteica indotta dal peptide amiloide in culture astrocitarie è rivelata dall'incremento del contenuto di gruppi carbonilici può essere abrogata dalla forma più solubile della vitamina E, ossia il *Trolox* (**96, 123**). Crescenti evidenze sperimentali supportano il ruolo delle specie reattive sia dell'ossigeno (ROS) che dell'azoto (RNS) nella patogenesi della malattia di Alzheimer (**1, 5, 9**). NO svolge tre principali funzioni nell'ambito dei sistemi biologici: a) esercita degli effetti citoprotettivi, in quanto blocca l'espressione di molecole di adesione; b) ha una funzione regolatoria, in quanto influenza la comunicazione intracellulare ed i meccanismi di trasduzione del segnale ed è il principale componente nel *pathway* della trasduzione del segnale che regola il tono muscolare, l'aggregazione piastrinica, i processi immunomodulatori; c) può avere anche degli effetti deleteri in quanto reagendo con specie radicaliche altamente elettrofile, quali gli anioni superossido, da origine ad ossidi di azoto che causano danni al DNA ed inducono perossidazione dei lipidi e nitratura delle proteine, apportando delle profonde modificazioni della struttura tridimensionale di quest'ultime ed alterando l'attività di importanti enzimi intracellulari in diverse alterazioni metaboliche centrali e sistemiche. Data l'ampia varietà dei differenti ruoli svolti dall'NO nel sistema nervoso centrale, non sorprende il fatto che in certi modelli sperimentali di neuroinfiammazione, un decremento nei livelli di NO può risultare dannoso (**1, 16, 48, 50-51, 258**). In generale, è stato riportato che la modulazione su base farmacologica dell'attività della NOS in alcune malattie croniche come l'Alzheimer deve essere specifica per l'*isoforma* enzimatica considerata e per i diversi tipi cellulari coinvolti. Nella malattia di Alzheimer, oltre alla manipolazione dell'attività della iNOS, sono stati escogitati innovativi interventi terapeutici nel campo della medicina odierna basati sull'uso di appositi modulatori farmacologici che interferiscono anche sul metabolismo del perossinitrito. Per esempio, recentemente è stato dimostrato, in modelli sperimentali di topi con encefalomielite (EAE), che sia l'acido urico (uno degli *scavenger* del perossinitrito) che il FeTMPS (uno specifico catalizzatore della decomposizione

di ONOO⁻) determinano un'inibizione delle modificazioni associate ai processi infiammatori ed una progressiva riduzione dei fenomeni di demielinizzazione e di alterazione della barriera ematoencefalica (267). Nel presente studio abbiamo dimostrato che nel cervello ed in alcuni distretti periferici dell'organismo rappresentati fondamentalmente da campioni di linfociti e di plasma di pazienti AD rispetto ai soggetti controllo è evidente un quadro clinico riferibile allo stress ossidativo. In maniera del tutto analoga ad indagini sperimentali riportati in letteratura che suggeriscono un'immunoreattività dell'HO-1 a livello di neuroni di *substantia nigra* contenenti inclusioni citoplasmatiche corrispondenti ai *corpi di Lewy* in individui con morbo di Parkinson (268), i nostri dati forniscono una chiara evidenza relativa ad una cospicua espressione dell'HO-1 sia nei linfociti periferici che nel plasma di soggetti AD paragonati ad individui controllo, e corrispondentemente anche i livelli di attività enzimatica totale dell'HO-1 risultano elevati nei linfociti circolanti di pazienti AD. Da ciò si evince che l'incremento nei livelli di espressione e di attività dell'HO-1 osservabili nella patologia di Alzheimer si verificano probabilmente in risposta ad elevati insulti di tipo ossidativo. Tale osservazione è in accordo ad altre evidenze sperimentali secondo cui il gene deputato alla sintesi della proteina HO-1 è regolato dallo stato redox cellulare e, in maniera del tutto simile ad altri enzimi antiossidanti e citoprotettivi (8, 19, 22, 251), nella sua regione promotrice si evidenzia la presenza di particolari sequenze geniche definite *elementi di risposta antiossidante* (ARE). Quindi, il gene per l'HO-1 è sottoposto ad una modulazione redox-sensitiva da parte di specifici fattori di trascrizione responsivi allo stress, inclusi Fos/Jun, NF-kB ed il più recente Nrf2, i quali riconoscono e si legano a siti localizzati all'interno del promotore o nelle regioni *enhancer* distali dello stesso gene attivandone o reprimendone la funzione (8, 12, 19, 22, 96). Per di più, numerose evidenze sperimentali indicano che l'eme ossigenasi-1 (HO-1) è rapidamente *up-regolata* da diverse forme di stress di tipo ossidativo e/o nitrosativo, così come dalla deplezione di uno dei più potenti agenti riducenti endogeni di natura tiolica, ossia il glutatione (66, 69, 72-73). Nell'ultima decade una piccola proteina tiolica, la Trx, ha destato una considerevole attenzione da parte della comunità scientifica, grazie alle sue potenti proprietà anti-radicaliche ed alle sue emergenti funzioni biologiche correlate principalmente alla regolazione dello stato redox cellulare. Alla luce delle attuali evidenze sperimentali, il sistema della tioredoxina/tioredoxina reduttasi (Trx/TRXr) è considerato un particolare regolatore intracellulare, coinvolto nel mantenimento dell'equilibrio ossidoriduttivo, dell'omeostasi tiolica e nella regolazione di molti fattori di trascrizione redox-sensitivi (63-64, 78-79). Nello stato ridotto, infatti, la Trx può riattivare alcuni fattori di trascrizione resi inattivi ossidativamente, come i fattori Jun, Fos, AP-1, il fattore redox-1 (ref-1) ed il più recente fattore nucleare Nrf2, attribuendo al sistema Trx/TRXr un ruolo cruciale alla base dei meccanismi di *signaling* cellulari (77). Crescenti evidenze

sperimentali indicano che l'*isoforma* predominante (Trx-1), dotata di una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e identificata per lo più come una proteina da stress inducibile e solubile, in risposta a vari stimoli chimico-fisici associati allo stress ossidativo e/o nitrosativo, può migrare nel nucleo dove regola l'espressione di particolari *vitageni* (12, 238). La tioredoxina riduttasi (TRXr) è un enzima flavoproteico appartenente alla famiglia delle piridin-nucleotide-disulfidriliche ossidoreduttasi, il quale catalizza la riduzione della proteina ossidata correlata (Trx) in presenza del cofattore NADPH. In più, contrariamente all'*isoforma* TRXr presente nei *lieviti procariotici* ed in *Drosophila*, la quale non contiene selenio, gli *isoenzimi* della TRXr presenti nei mammiferi sono caratterizzati invece da un secondo centro catalitico redox, costituito da un residuo di seleniocisteina (Cys-Sec) localizzato nella porzione C-terminale della proteina (63). Il sistema della TRX sembra svolgere un importante ruolo nella protezione contro lo stress ossidativo e nella regolazione della crescita cellulare e del processo di morte cellulare. Studi sperimentali sia *in vivo* che *in vitro* dimostrano che sia l'enzima TRXr che la proteina TRX possiedono degli effetti citoprotettivi contro la citotossicità data da un'aumentata produzione di specie radicaliche ROS (63-65, 74, 78). In particolare, dati sperimentali ottenuti da indagini sia *in vivo* che *in vitro* dimostrano che il peptide A β (1-42) può riprodurre molte delle alterazioni ossidative alle proteine riscontrate nei cervelli di individui AD (9, 101, 108, 232-233, 236). Per di più, è stato osservato che l'utilizzo di un *oligonucleotide antisense* diretto contro il peptide amiloideo precursore APP porta ad una progressiva perdita del suo prodotto di clivaggio, il peptide A β (1-42), un effetto associato ad una significativa riduzione nei livelli di gruppi carbonilici di specifiche proteine biologiche come l'aldolasi e la tioredoxina perossidasi in cervelli di topi anziani (269). Estendendo nostre precedenti linee di ricerca, abbiamo dimostrato in cervelli di pazienti affetti da malattia di Alzheimer un significativo incremento nell'espressione di alcuni *vitageni* rappresentati principalmente dai geni codificanti per il sistema HO-1, per l'enzima TRXr e per la proteina Hsp60, associato ad un decremento nei livelli di espressione dell'*isoforma* costitutiva HO-2. Parallele modificazioni sono state osservate nei linfociti periferici di individui AD dove si evidenzia un chiaro aumento nei livelli di espressione dell'inducibile ossido nitrico sintetasi (NOS-2 o iNOS) associato ad un incremento significativo dell'espressione rispettivamente delle proteine HO-1, Hsp72, Hsp60 e TRXr. Il cervello di pazienti AD è sottoposto a molte modificazioni biochimiche, inclusa l'alterazione nella sintesi e nella degradazione delle proteine, classicamente associata alla "*cellular stress response*" mediata dall'attivazione e dall'espressione di proteine da stress appartenenti al *pathway heat shock* (96). Queste ultime sono per lo più delle proteine che agiscono da molecole *chaperones* assicurando il mantenimento della corretta conformazione strutturale tridimensionale nativa delle proteine neosintetizzate ed uno stato di citoprotezione da vari tipi di insulti. Data l'ampia proprietà

citoprotettiva della risposta cellulare allo stress, attualmente vi è un forte interesse scientifico verso la scoperta e lo sviluppo di nuovi composti antiossidanti ed agenti farmacologici capaci di indurre le diverse proteine *heat shock* (Hsps) **(12, 17-18, 31, 36, 126)**. In particolare, negli ultimi anni grande attenzione è stata riservata all'impiego di composti naturali, normalmente presenti nella dieta ed altre sostanze esogene capaci di incrementare il potenziale antiossidante cellulare mediante l'attivazione coordinata di specifici *vitageni* e di inibire, ritardare o revertire la patofisiologia della malattia di Alzheimer **(12, 17-18, 96)**. La patologia di Alzheimer è caratterizzata da una risposta infiammatoria cronica associata ad una progressiva deposizione del peptide β -amiloide e danno cerebrale. Considerate in una visione d'insieme, le evidenze sperimentali sopra riportate suggeriscono che la stimolazione di vari meccanismi di riparo da parte di un "*mild stress*" ha degli effetti significativi nel ritardare l'esordio di diverse alterazioni molecolari età-dipendenti alle cellule, ai tessuti ed agli organismi **(14-15)**. In particolare, sostanze naturali presenti nelle verdure e nei frutti, come i flavonoidi ed i composti polifenolici, si sono rivelati di grande utilità terapeutica **(12, 33, 219)**. Infatti, spezie ed erbe contengono particolari sostanze di natura polifenolica le quali hanno delle potenti proprietà antiradicaliche e chemiopreventive, ed è ormai accettato che la porzione fenolica di tali composti è responsabile dei loro effetti antiossidanti. Il curcumino, in particolare, uno dei più potenti antiossidanti estratto dal *curry turmeric* contenente una miscelazione di potenti fitonutrienti conosciuti con il nome di *curcuminoidi*, è emerso quale attivatore della risposta cellulare *heat shock* **(12, 33, 219)**. La supplementazione con antiossidanti naturali potrebbe rappresentare un mezzo alternativo oltre che un valido approccio nutrizionale utile a ridurre il danno ossidativo e la patologia da accumulo di β -amiloide associati alla malattia di Alzheimer **(12, 18, 251)**. Da ciò deriva l'importanza del sistema intracellulare dei *vitageni* quale possibile *target* per nuove strategie citoprotettive efficaci nell'alleviare i difetti neurologici associati al danno neurodegenerativo presente nell'Alzheimer ma anche in altre malattie cerebrali e/o sistemiche correlate a condizioni di stress ossidativo **(1, 12, 17)**.

Classicamente, la triade dei sintomi clinici comprendente episodi di vertigine, perdita neurosensoriale fluttuante dell'udito (ipoacusia), acufeni e senso di pienezza aurale o ovattamento (*fullness*) correlata all'istopatologica idrope endolinfatica sta alla base della sindrome di Menière (MD) **(270-271)**. Circa l'origine e l'eziopatogenesi di questa malattia si sa molto poco. Numerosi fattori svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo dell'idrope endolinfatica e nella patogenesi della disfunzione cocleovestibolare ad essa correlata. Specificatamente, gli agenti eziologici chiave che sono stati identificati quali fattori determinanti per il decorso clinico di tale disordine (esempio esposizione prolungata a rumori, stress) agiscono da fattori scatenanti o stressogeni, interferendo

con la normale funzione biochimica e fisiologica delle principali strutture neurosensoriali dell'orecchio interno o del cervello. L'idrope endolinfatica rappresenta il principale segno clinico riscontrato in numerosi reperti istopatologici relativi alla sindrome di Menieré (126, 130). In generale, dati sperimentali ottenuti da studi sull'osso temporale dell'uomo così come su modelli animali di tale sindrome non sono riusciti a delucidare il meccanismo molecolare in base al quale l'idrope endolinfatica causi la perdita dell'udito (126). Studi sperimentali emergenti indicano che l'ipoacusia neurosensoriale potrebbe essere in parte spiegata ipotizzando la morte per apoptosi dei neuroni gangliari a spirale e che l'idrope endolinfatica potrebbe rappresentare un epifenomeno piuttosto che il fattore iniziale (131, 272). Un numero limitato di dettagliati studi ultrastrutturali ha dimostrato una significativa riduzione nel numero delle terminazioni dendritiche, sollevando la possibilità che i fenomeni di neurotossicità possano svolgere un ruolo cruciale nella patologia della sindrome di Menieré così come nell'idrope endolinfatica sperimentale (130-131). Per di più, le principali alterazioni fisiopatologiche che stanno alla base della triade sintomatologica dell'orecchio interno, altrimenti correlata alla diagnosi della sindrome di Menieré, sono state associate clinicamente ad un'asimmetrica perfusione del cervello, identificata da immagini di tomografia computerizzata del cervello (SPECT), e suggeriscono una possibile interferenza con la normale omeostasi della barriera ematoencefalica e del labirinto uditivo ed una secondaria idrope endolinfatica (126, 273). Crescenti evidenze sperimentali indicano che lo stress ossidativo svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dell'idrope endolinfatica e che il danno cellulare e la morte apoptotica possano contribuire alla perdita neurosensoriale che caratterizza lo stadio finale della sindrome di Menieré (136, 274). I processi di ossidoriduzione che regolano l'espressione genica appaiono fondamentali per la biologia cellulare. Tutte le cellule viventi sono coinvolte in processi di ossidoriduzione che risultano essenziali per la normale funzione cellulare. Un'eccessiva produzione di specie radicaliche dell'ossigeno avviene quando lo stato redox intracellulare diventa negativo (1, 3, 6). Al fine di minimizzare e di ridurre gli effetti negativi dati da una costitutiva od eccessiva esposizione alle specie reattive dell'ossigeno, i diversi tipi cellulari hanno elaborato dei raffinati sistemi di difesa che comprendono un ampio spettro di molecole enzimatiche e non enzimatiche *scavenger* dei radicali ossidanti ed elettrofili. Tra questi il glutathione ridotto (GSH) rappresenta uno dei composti *scavenger* endogeni più importanti, presente in tutti i tipi di cellule dei mammiferi, in grado di neutralizzare l'attacco radicalico da parte di agenti elettrofili (61, 66-67, 69-71). Evidenze sperimentali indicano che i gruppi tiolici proteici svolgono un ruolo chiave nella regolazione dello stato redox cellulare, il quale costituisce un mediatore cruciale per i molteplici processi metabolici, di *signaling* e di trascrizione redox-sensitiva (275). In condizioni ottimali, uno stato di citoprotezione è accompagnato dall'omeostasi proteica e dal controllo della qualità delle proteine,

data da un complesso *network* di interazioni molecolari che bilanciano i processi di sintesi, avvolgimento, traslocazione, assemblaggio/disassemblaggio ed eliminazione proteica (249, 276). L'abilità della cellula di contenere gli effetti deleteri dati dalle eccessive concentrazioni dei ROS e degli RNS richiede l'attivazione di *pathway* di sopravvivenza cellulare così come la produzione di molecole dotate di proprietà antiossidanti ed antiapoptotiche (12, 17-18, 31, 36, 126). Al fine di adattarsi ad alterazioni del bilancio ossidante/antiossidante e dello stato redox, e di sopravvivere a differenti tipi di danno e ad un'ampia varietà di stimoli stressogeni, le cellule eucariotiche hanno sviluppato dei sistemi inducibili altamente raffinati la cui *trans*-attivazione aumenta la resistenza cellulare allo stress. Ciò si realizza mediante un complesso *network* di processi che assicurano la longevità, i quali si basano essenzialmente sull'espressione di un'ampia varietà di geni, indicati per l'appunto con il termine di *vitageni* (12, 17-18, 31, 36, 126). I geni codificanti per le proteine *chaperones*, ossia proteine altamente conservate deputate al mantenimento della corretta conformazione strutturale di macromolecole biologiche, quali proteine funzionali, RNA e DNA, si sono rivelati fondamentali nella protezione della cellula contro un'ampia varietà di insulti tossici. In generale, le *chaperonine* aiutano diverse molecole-segnale *target* a mantenere il loro normale stato di attivazione e regolano i meccanismi di trasduzione del segnale dalla membrana al nucleo. Tra i loro specifici ruoli, recenti studi hanno mostrato che le *chaperonine* agiscono da sistema genetico *buffer* in grado di stabilizzare il fenotipo di vari tipi cellulari ed organismi (16, 18, 249, 251). Tra i diversi *pathways* appartenenti al programma di *vitalità cellulare*, i quali conferiscono protezione contro il danno ossidativo, un ruolo chiave è svolto dai *vitageni* (18, 36). Questi ultimi includono i membri della famiglia delle *heat shock proteins* (Hsps), inclusa Hsp72, ed il sistema antiossidante della tioredoxina/tioredoxina reduttasi (1, 18, 36, 63-64). Nel presente studio abbiamo testato l'ipotesi sperimentale in base alla quale la neurotossicità è un importante mediatore di danno nella sindrome di Menière. Tale osservazione è consistente con la presenza di *biomarkers*, indice di un'aumentata risposta cellulare allo stress, misurabili nei campioni di sangue periferico di pazienti affetti da tale disordine dell'apparato uditivo. I risultati del presente studio sono in accordo ad altri dati sperimentali, i quali mostrano che la produzione di specie radicaliche può contribuire ai fenomeni di ototossicità dati da diversi agenti chimici, come è stato dimostrato utilizzando la tecnica EPR, in grado di rilevare la formazione di specie reattive dell'ossigeno indotta da composti ototossici direttamente nel tessuto cocleare (277). E' possibile ipotizzare che lo stress ossidativo indotto dagli agenti ototossici sia una delle cause della disfunzione uditiva correlata al danno nel tessuto cocleare (277). Le nostre indagini sperimentali mostrano incrementati livelli di espressione dell'inducibile Hsp70, associati a significative alterazioni dello stato redox sistemico, come indicato dai ridotti livelli di espressione della Trx, quali *biomarkers* di stress ossidativo rilevanti per il determinismo

patogenetico nella sindrome di Menieré. Sebbene a tutt'oggi non sia stata scientificamente chiarita la causa che sta alla base della patogenesi della sindrome di Menieré, in generale si evidenzia un'aumentata risposta cellulare allo stress data dall'espressione di proteine *heat shock* nei pazienti affetti (278). Nel presente studio abbiamo testato l'ipotesi sperimentale in base alla quale la neurotossicità rappresenta un importante mediatore primario di danno nella sindrome di Menieré e ciò può essere spiegato da aumentati livelli di *biomarkers* di risposta cellulare allo stress quantificabili in campioni di sangue periferico di pazienti affetti. Tale studio, inoltre, valida l'ipotesi sperimentale in base alla quale alterazioni nello stato redox associati ad un'abnorme attività ed espressione della proteina antiossidante tioredoxina, così come dell'enzima anidrasi carbonica, può contribuire ad aumentare i livelli di stress ossidativo con alterazione dell'omeostasi redox nei neuroni gangliari a spirale e conseguente degenerazione cellulare. E' noto come una fisiologica e normale funzione uditiva dipenda dal mantenimento di un'adeguata composizione ionica nell'endolinfa (130, 132). E' stato suggerito che l'anidrasi carbonica svolge un importante ruolo nella regolazione della concentrazione ionica e dei fluidi nell'orecchio interno. I nostri dati sperimentali indicano in generale che un'aumentata espressione dell'enzima anidrasi carbonica (CAII) può essere rilevante per la patogenesi della sindrome di Menieré. Evidenze sperimentali indicano che l'anidrasi carbonica è un enzima sulfidrilico particolarmente vulnerabile al danno ossidativo, come dimostrato nella neurodegenerazione di Alzheimer (279). In tal modo, è auspicabile associare un suo incremento ad un possibile tentativo di limitare i danni dati dall'eccessiva presenza di specie ossidanti anche nella patologia sistemica di Menieré. In conclusione, possiamo affermare il coinvolgimento dello stress ossidativo nel determinismo patogenetico della sindrome di Menieré (126). L'induzione del sistema dei *vitageni* rappresenta un valido approccio clinico utile nel contrastare gli effetti deleteri dati da uno stato cellulare pro-ossidante. Di conseguenza, la ricerca di innovativi e potenti induttori del sistema dei *vitageni* apre nuove prospettive per lo sviluppo di originali strategie farmacologiche in grado di dare citoprotezione e di massimizzare i meccanismi antidegenerativi, inclusa la risposta cellulare allo stress, anche nei neuroni gangliari a spirale dell'apparato cocleovestibolare, riducendo i principali segni clinici associati alla sindrome di Menieré (16, 18, 249, 251).

La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), o neurofibromatosi classica o periferica, è uno dei più comuni disordini neurogenetici ereditari a carattere autosomico dominante con un'incidenza di 1 su 3000-4000 individui nati vivi, indipendentemente dall'etnicità, dalla razza e dal genere (149-150, 153). *Von Recklinghausen* descrisse per primo in dettaglio un *case report* sulla Neurofibromatosi di tipo 1 pubblicato nel 1882 (280), ma a causa della variabilità e degli aspetti *pleiotropici* correlati alla

malattia, i *criteri* diagnostici non sono stati stabiliti prima del 1988 dalla *National Institutes of Health Consensus Development Conference* (NIH) (157). Infatti, a causa dell'estrema eterogeneità di espressione relativa alla severità di alcuni segni clinici, anche tra i membri della stessa famiglia affetti dalla stessa mutazione, definire dei *criteri* diagnostici clinici risulta problematico. Nel 1988 la *National Institute of Health* (NIH) ha stabilito dei *criteri standard* per la diagnosi clinica di Neurofibromatosi di tipo 1, al fine di distinguere tale malattia genetica da altri disordini multisistemici (157). Le principali manifestazioni cliniche associate a tale sindrome genetica includono la presenza di macchie caffè e latte, *efelidi* ascellari e/o inguinali, amartomi iridei (*noduli di Lisch*), multipli neurofibromi cutanei, la presenza ed il numero dei quali varia enormemente da un paziente all'altro (149, 158-163). Altre complicanze cliniche includono alterazioni dei sistemi, rispettivamente, cardiovascolare, gastrointestinale ed endocrino, associate ad ipertensione essenziale, la presenza di anomalie ortopediche (scoliosi, pseudoartrosi, bassa statura, macrocefalia), deformità facciali e corporee, glioma ottico, *deficit* cognitivi e difficoltà di apprendimento ed un'aumentata predisposizione allo sviluppo di neoplasie, quali leucemie, gliomi e feocromocitomi (149, 158-160). La Neurofibromatosi di tipo 1 è caratterizzata dall'insorgenza di manifestazioni cliniche pigmentate tipicamente della cute e dallo sviluppo di un'ampia varietà di tumori benigni e maligni sia nel sistema nervoso periferico che centrale (161, 208). I neurofibromi plessiformi sono dei tumori benigni presenti in più della metà dei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1). Tali tipi di tumori causano spesso serie complicanze e possono progredire in tumori maligni della guaina dei nervi periferici (MPNSTs), che rappresentano una delle principali cause di morte tra i pazienti NF1. I neurofibromi sono dei tumori benigni, i quali originano dal tessuto fibroso che circonda la guaina dei nervi periferici e sono costituiti da cellule di Schwann, da fibroblasti, cellule perineurali e *mast-cellule*. Malgrado la loro composizione multicellulare, i neurofibromi presentano un'origine clonale ed è stato riportato che soltanto le cellule di *Schwann* mostrano una seconda mutazione a carico del gene NF1 (166-167, 281). I neurofibromi plessiformi differiscono dai neurofibromi cutanei, in quanto essi originano dalla guaina dei nervi periferici e tendono a svilupparsi per tutta la loro lunghezza. Tali lesioni sono già presenti alla nascita ma continuano ad apparire durante la tarda adolescenza. La Neurofibromatosi di tipo 1 rappresenta una condizione genetica dai segni clinici estremamente eterogenei. Alcuni pazienti NF1 presentano delle manifestazioni cliniche lievi, altri invece risultano severamente affetti (161-163, 282). La diagnosi di Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) viene posta esclusivamente per mezzo di valutazione clinica, in base alla presenza di almeno due dei *criteri* diagnostici stabiliti dalla *National Institute of Health* (NIH), come indicato nella **Fig A** (157, 283). La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) rappresenta un comune disordine neurogenetico monogenico, a

carattere autosomico, che origina da fenomeni di *aploinsufficienza* del gene oncosoppressore NF1 (149, 284). Il meccanismo molecolare che sta alla base della variabilità clinica di tale sindrome multisistemica rimane ancora non del tutto conosciuto, probabilmente per la complessità dei molteplici fattori coinvolti nella sua patofisiologia. L'eterogeneità allelica delle mutazioni che interessano il gene NF1 rappresenta uno dei fattori che spiega l'eterogeneità fenotipica (285). Più della metà dei casi NF1 sono dati da mutazioni sporadiche, ed un enorme numero di differenti mutazioni patogenetiche sono state riportate (213, 284-285). Tra queste ultime, il 5-10% delle mutazioni sono delle estese delezioni che interessano l'intero gene ed i geni adiacenti. Tali mutazioni geniche sono state associate in genere ad un quadro clinico severo (214, 285). Dall'altro, per i pazienti NF1 affetti con mutazioni puntiformi intrageniche (90% dei casi clinici), non è stato possibile stabilire una precisa correlazione fenotipica (286-287), fatta eccezione per un caso clinico caratterizzato da una piccola delezione di 3bp (c.2970-2972 delAAT) a livello dell'esone 17 del gene NF1 il quale mostra un quadro clinico moderato associato ad una significativa riduzione di molte complicità peculiari della sindrome Neurofibromatosi di tipo 1 e dalla completa assenza di neurofibromi, sia dermali, sottocutanei che superficiali e plessiformi (288). Studi clinici e sperimentali dimostrano l'esistenza di una forte componente genetica e suggeriscono il coinvolgimento di *geni modificatori* alla base della variabilità di espressione di tale disordine neurogenetico (285). La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) è una condizione genetica multisistemica la quale origina da mutazioni allo stato eterozigote, inattivanti il gene *tumor suppressor* NF1, localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma umano 17 (17q11.2). Il gene NF1, il quale ricopre una regione di 280 kb dell'intero genoma umano, comprende 60 esoni e codifica per un trascritto di 12 kb (149, 213, 284-285). Il prodotto del gene NF1, la neurofibromina, è una proteina ubiquitaria citoplasmatica di 2818 residui aminoacidici, con una struttura e funzione simili a quelle delle proteine GAP (GTPasi-activating protein), un gruppo di proteine conservate evolutivamente. L'analisi della struttura della neurofibromina ha permesso di identificarla quale regolatore negativo della proteina Ras, una proteina chiave intracellulare coinvolta nel *signaling pathway* che regola i processi di crescita e di sopravvivenza cellulare. La regione altamente conservata della proteina corrisponde al dominio catalitico GRD (GAP-related domain) del gene NF1, il quale è codificato dagli esoni 20-27 e *downregola* la proteina Ras (189, 191). Inoltre, due domini strutturali addizionali sono stati descritti per la proteina neurofibromina: il dominio ricco di residui cisteinici (CSRD) ed il dominio Sec14p. Il gene NF1 appartiene alla categoria dei geni oncosoppressori, in quanto la sua perdita di funzione è associata all'insorgenza di tumori benigni e maligni nei tessuti di derivazione neuroectodermica e neoplasie di origine mieloide (188, 285, 289). L'assenza di neurofibromina nei tessuti, a causa di mutazioni geniche a carico del gene NF1, si

traduce in un'augmentata attività della proteina Ras e della cascata di segnali intracellulari i quali portano ad un'incontrollata proliferazione cellulare. La deregolazione della proteina Ras porta all'attivazione di diversi importanti segnali intracellulari, i quali includono molecole *target* della proteina mTOR dei mammiferi. Oltre a regolare l'attività di Ras, la neurofibromina controlla positivamente i livelli intracellulari di AMPc (159). Evidenze sperimentali indicano che aumentati livelli di AMPc sono associati ad una ridotta crescita cellulare, mediata dall'interferenza con i molteplici *signaling pathway* della mitosi. La neurofibromina, prodotto proteico del gene NF1, costituisce un gene oncosoppressore espresso in molti tipi differenti di cellule, in primo luogo nei neuroni, negli astrociti, nelle cellule di Schwann e nei melanociti (191). Tale proteina rappresenta un regolatore chiave dell'attività Ras-GAP ed, in quanto tale, interferisce con i normali processi di proliferazione e differenziamento cellulare (290). Mutazioni del gene NF1 causano la formazione di proteina neurofibromina non biologicamente attiva associata ad aumentata proliferazione cellulare che sta alla base del processo di trasformazione neoplastica. Dati clinici e sperimentali indicano che la vasculopatia è un'importante complicanza clinica tra i pazienti NF1 (185). Tale processo in genere interessa il sistema arterioso e la stenosi dell'arteria renale costituisce una delle manifestazioni cliniche più comuni, presenti almeno nell'1% dei pazienti NF1 affetti (185, 291). La patogenesi delle lesioni che interessano il sistema vascolare nei soggetti NF1 non è del tutto nota. Poiché, il gene NF1 è normalmente espresso nelle cellule endoteliali e controlla la crescita delle cellule muscolari lisce attraverso la regolazione della proteina Ras, sue mutazioni geniche potrebbero contribuire all'insorgenza dei disordini vascolari riportati nei pazienti NF1 (149, 185, 291). In contrasto alla neuropatia associata alla Neurofibromatosi di tipo 2, la neuropatia correlata alla Neurofibromatosi di tipo 1 è stata documentata quale primario *deficit* sensoriale senza alcun segno di deterioramento clinico neuropsicologico (173). *Deficit* neurocognitivi sono frequenti complicanze cliniche osservate nei pazienti NF1 (292). Nei bambini NF1 la difficoltà di apprendimento ed il ritardo mentale possono includere *deficit* video-spaziali e video-motori e disordini nel linguaggio. Oltre a specifici *deficit* nel linguaggio verbale e non verbale, riscontrati nel 30%-65% dei bambini NF1, alterazioni della coordinazione motoria sono state riportate (181). Il fenotipo cognitivo tipico del paziente NF1 include una marcata incidenza dei disordini autistici ed ADHD (*attention-deficit/hyperactivity disorder*) ed alterazioni nel comportamento con una ridotta *performance* scolastica (186). I pazienti NF1 normalmente mostrano un quoziente intellettivo (QI) entro il limite di *range* di normalità ed un'augmentata incidenza di ritardo mentale (159). Specifiche alterazioni scheletriche nei pazienti NF1 includono la bassa statura, la scoliosi distrofica, la pseudoartrosi con incurvamento tibiale e la displasia dell'ala dello sfenoide (293). Una delle più comuni anomalie ortopediche è rappresentata dall'ipotonìa e dalla ridotta coordinazione motoria.

Insieme al numero e alla grandezza delle macchie caffè e latte, la manifestazione clinica ortopedica della displasia dell'ala dello sfenoide è sufficiente per porre diagnosi clinica di NF1 **(149, 155, 158, 171)**. Infine, il processo di pseudoartrosi generalmente interessa il 3% dei pazienti NF1 affetti e coinvolge le ossa distali della tibia e della fibula. Il glioma ottico (OPGs), astrocitoma pilocitico, è uno dei più comuni tumori intracranici maligni osservati nei pazienti NF1. Il glioma ottico è un tumore del nervo ottico presente nel 15-20% dei pazienti affetti da tale disordine neurogenetico **(174)**. E' tipicamente un tumore a crescita lenta e si presenta clinicamente ridotta acuità visiva, atrofia del nervo ottico e precoce pubertà. Periodici controlli neuroftalmologici sono richiesti nel *management* dei bambini NF1 per la valutazione di tali lesioni che si manifestano in maniera asintomatica. Altri tipi inusuali di tumori che si manifestano inoltre con aumentata frequenza nei soggetti NF1 includono feocromocitomi, leucemia mieloide cronica, rhabdomyosarcomi, tumori cerebrali. Viceversa, tumori comuni nella popolazione normale, quali i tumori al seno, polmone, rene, colon e prostata, si manifestano con una ridotta incidenza nei pazienti NF1 **(158)**. Significativi progressi scientifici sono stati raggiunti nell'ultima decade per quanto riguarda la comprensione dei principali meccanismi molecolari alla base della patofisiologia di tale sindrome genetica multisistemica. L'analisi mutazionale del gene NF1 ed i test genetici vengono utilizzati quale supporto e conferma della diagnosi clinica, soprattutto in quei casi clinici che non soddisfano pienamente i *criteri* diagnostici o quando la diagnosi prenatale è richiesta. Il tasso di mutazioni della linea germinale per il gene NF1 è 10 volte più elevato di quello osservato per altri geni responsabili di malattie a carattere ereditario e mutazioni *de novo* sono presenti nella metà dei casi clinici NF1 **(149, 164)**. Recentemente, test molecolari sono stati resi disponibili clinicamente per la diagnosi genetica di Neurofibromatosi di tipo 1 **(188, 190)**. A causa dell'enorme grandezza e complessità del gene NF1, della mancanza di siti *hotspots* mutazionali noti, dell'estrema variabilità fenotipica e della presenza di *pseudogeni*, in genere è richiesto un protocollo *multi-step* per la diagnosi molecolare di NF1 **(150)**. Come riportato da evidenze cliniche, un esaustivo approccio molecolare di *screening* per il gene NF1 ha permesso l'identificazione di differenti tipi di mutazioni geniche in più del 95% dei casi clinici testati (incluse mutazioni geniche spontanee ed ereditarie) **(157, 213-214)**. Complessivamente, le strategie e le principali metodologie previste per lo *screening* e la diagnosi genetica dei soggetti NF1 richiede l'applicazione di differenti tipi di indagine molecolare comprendenti tecniche di amplificazione (PCR), il test della proteina tronca (PTT), la ricerca dei polimorfismi a singolo-*strand* (SSCP) o la cromatografia liquida denaturante ad elevata pressione (DHPL), con un differente grado di sensibilità per ciascun metodo **(207, 213, 294)**. Il sequenziamento genico diretto è in genere utilizzato per la conferma su DNA genomico delle mutazioni riscontrate mediante l'utilizzo di queste tecniche; in più, l'ibridazione fluorescente *in situ*

(FISH) è abitualmente utilizzata per rivelare la presenza di estese delezioni nel gene NF1 **(180)**. I test genetico-molecolari non sono indicati per la cura e la diagnosi di *routine* nei pazienti NF1, ma rivestono una notevole importanza per la conferma della diagnosi clinica, soprattutto in quei casi in cui i segni clinici non sono evidenti, o nei casi di diagnosi genetica prenatale. Un limite nell'applicazione di tali test genetico-molecolari è dato dalla mancanza di una precisa correlazione genotipo-fenotipo. La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) costituisce una sindrome genetica caratterizzata da un'ampia variabilità genetica, anche all'interno dello stesso nucleo familiare. Fino ad oggi sono state riportate circa 800 differenti tipi di mutazioni a carico del gene NF1 (*Human mutation database*), senza alcuna evidenza di *clustering* genico localizzato **(149, 205, 207)**. Più del 90% di tali mutazioni geniche sono mutazioni puntiformi, incluse delezioni o inserzioni intraesoniche, mutazioni da *splicing*, mutazioni *missense* e *nonsense* **(205)**. Una ridotta percentuale di pazienti NF1 (4%) presenta un'estesa delezione del gene NF1 (1.2-1.4 Mb) e dei geni contigui **(207)**. Questi individui NF1 in genere presentano un quadro clinico ed un fenotipo particolarmente severi caratterizzati dalla precoce comparsa di numerosi neurofibromi, un ridotto quoziente intellettivo (QI), *deficit* cognitivi, ritardo mentale, dismorfismi facciali non familiari ed un'elevata incidenza di tumori maligni della guaina dei nervi periferici **(207, 289)**. E' stato ipotizzato che la co-delezione del gene NF1 e dei *geni adiacenti* potrebbe influenzare l'eterogeneità di espressione dei principali segni clinici associati a tale disordine ereditario, in particolare per ciò che concerne il numero cospicuo di neurofibromi cutanei **(295)**. Così, sono stati identificati dei potenziali *geni modificatori* all'interno della regione del gene NF1, la cui *aploinsufficienza* potrebbe creare un microambiente in grado di promuovere la crescita dei neurofibromi ed atipiche delezioni **(285)**. La maggior parte dei pazienti NF1 presenta mutazioni puntiformi intrageniche. Un ampio spettro di mutazioni *missense*, *nonsense*, piccole delezioni/inserzioni, mutazioni da *splicing* aberrante e delezioni dell'intero gene, è stato riportato **(205, 214)**. Altre alterazioni geniche includono sostituzioni aminoacidiche e riarrangiamenti cromosomici. In accordo a tali evidenze cliniche e sperimentali, i dati riportati nel presente studio mostrano chiaramente la presenza di un ampio spettro di differenti tipi di mutazioni riscontrate in diversi casi clinici, incluse mutazioni patogenetiche *missense*, *nonsense*, piccole delezioni/inserzioni, le quali portano alla sintesi di un prodotto proteico aberrante. Per di più, l'analisi mutazionale del gene NF1 indica che circa il 30% dei pazienti NF1 presenta delle mutazioni da alterato meccanismo di *splicing*, il quale determina la formazione di trascritti aberranti. Il processo di *splicing* alternativo rappresenta un importante meccanismo che contribuisce a creare una diversità genica e a regolare l'espressione genica in diversi tipi di tessuti **(296)**. I dati sperimentali e clinici del presente studio indicano che il meccanismo di *splicing* nel gene NF1 è estremamente complesso **(242-243)**. Infatti, nel nostro

laboratorio abbiamo identificato in diversi casi clinici delle mutazioni *missense* nel sito accettore di *splicing* o intraesoniche, nel gene NF1 allo stato eterozigote, le quali possono causare o la microdelezione *in frame* di codoni, o attivare siti critici di *splicing* intraesonici o addirittura promuovere lo *skipping* dell'esone di interesse. In tutti questi casi si ha una profonda alterazione dei meccanismi canonici di *splicing*, la quale determina la formazione di trascritti aberranti e patogenetici (242-243). Nonostante casi di delezione dell'intero gene NF1 siano stati ampiamente studiati, piccoli riarrangiamenti riguardanti un numero esiguo di esoni del gene NF1 non sono stati investigati estesamente a causa dei limiti dati dalle metodiche *standard* di analisi genetica. Al fine di identificare ridotti riarrangiamenti del gene NF1, incluse piccole delezioni/duplicazioni, abbiamo adottato recentemente nel nostro laboratorio un nuovo protocollo diagnostico basato sull'impiego della tecnica MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), per testare tutti i casi clinici NF1 risultati negativi al sequenziamento diretto per la ricerca di mutazioni puntiformi (180, 207). Variazioni di un singolo esone e multi-esoniche, quest'ultime da riferire a delezione genomica dell'intero gene NF1, sono state riscontrate in due differenti casi clinici NF1. Lo spettro dei riarrangiamenti genomici caratterizzato mediante l'impiego della metodica MLPA riguarda delezioni singole e multi-esoniche distribuite lungo l'intera sequenza del gene NF1. E' stato osservato che pazienti NF1 affetti da delezione genomica dell'intero gene NF1, in genere, presentano un quadro clinico più devastante, caratterizzato da un elevato numero di neurofibromi plessiformi e cutanei, dismorfismi facciali ed un elevato rischio di sviluppare tumori maligni (177, 207, 289). Di conseguenza, l'introduzione di metodiche sensibili di diagnosi genetico-molecolare riveste un ruolo chiave in quanto aiuta a differenziare differenti tipi di mutazioni di rilevanza clinica per il *management* dei pazienti NF1. Una delle caratteristiche peculiari di tale sindrome multisistemica è data dall'estrema variabilità di espressione delle principali manifestazioni cliniche, la quale rende difficile poter stabilire un'adeguata prognosi e consulenza genetica (149-150). Per di più, evidenze riportano l'esistenza di altre varianti cliniche con fenotipo sovrapponibile a quello NF1, ma poco conosciute da un punto di vista molecolare (297). Una piccola ma significativa percentuale di pazienti NF1 presenta infatti macchie cutanee iperpigmentate senza neurofibromi. Inoltre, recentemente mutazioni geniche nel gene SPRED1 responsabili della *sindrome di Legius* (LS), sono state identificate in numerose famiglie caratterizzate dalla presenza di macchie caffè-latte. Crescenti evidenze sperimentali indicano l'esistenza di mutazioni geniche del gene SPRED1 nello 0.5% dei casi NF1 e nel 5% dei pazienti aventi un fenotipo simile a quello NF1 (299). Il gene SPRED1, localizzato nel cromosoma 15 (15q13.2), contiene 7 esoni e codifica per la proteina SPRED1 (297-299). Le proteine Sprouty (SPRY1) e SPRED (SPRED1) fanno parte di una famiglia di proteine di membrana conservate evolutivamente, regolatori negativi di fattori di crescita i quali

attivano un *signaling pathway* dipendente da proteine chinasi (ERK). Le similarità tra LS ed NF1 possono essere spiegate mediante un comune meccanismo patogenetico, il quale prevede la disregolazione del *pathway* RAS-MAPK, un'importante cascata di segnali intracellulari coinvolti in processi di proliferazione, di differenziamento e di vitalità cellulare e di apoptosi **(300)**. Ulteriori studi saranno necessari al fine di caratterizzare l'incidenza delle mutazioni geniche riguardanti SPRED1, l'esatto spettro fenotipico e le putative complicanze associate alla *sindrome di Legius*, causate dalla disregolazione del *signaling pathway* Ras-MAPK. Tali osservazioni, inoltre, suggeriscono la necessità di testare tutti quei casi clinici negativi per mutazioni puntiformi e non dei geni rispettivamente NF1 e SPRED1, per ulteriori geni candidati coinvolti nella cascata di segnali dipendente da Ras-MAPK. Attualmente, il *management* del soggetto NF1 prevede la consulenza genetica ed il trattamento sintomatico di specifiche complicanze. *Trials* clinici sono in corso al fine di valutare l'efficacia di innovativi trattamenti farmacologici per ridurre l'incidenza di alcuni segni clinici, in primo luogo i neurofibromi plessiformi, i *deficit* cognitivi, il glioma ottico, i quali sono frequente causa di morbilità in questi pazienti. In particolare, numerosi studi hanno valutato le potenzialità di nuovi agenti terapeutici utili nel trattamento dei neurofibromi, quali il *sirolimus* avente come target mTOR (un noto regolatore della crescita cellulare nel sistema nervoso centrale) **(301)**. In conclusione, considerate in una visione d'insieme, le osservazioni scientifiche riportate nel presente studio suggeriscono la necessità di un *management* multidisciplinare per la cura ed il trattamento clinico di tale disordine multisistemico. Ulteriori studi clinici e sperimentali saranno necessari al fine di delineare meglio un'eventuale correlazione genotipo-fenotipo. Il nostro studio, ad ogni modo, amplia le conoscenze e lo spettro delle mutazioni relative al gene NF1 e sottolinea l'importanza dell'analisi genetico-molecolare alla base di una caratterizzazione diagnostica anche nel campo clinico delle Neurofibromatosi.

LEGEND

Fig 1 Thioredoxin reductase (TRXr) expression levels in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Meniere' diseased patients (MD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 2 Protein carbonyls (DPNH) in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Meniere' diseased patients (MD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 3 4-HNE in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Meniere' diseased patients (MD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 4 Hsp72 expression in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Meniere' diseased patients (MD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 5 Anhydrase carbonic II (CAII) expression levels in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Meniere' diseased patients (MD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 6 Thiol status in lymphocytes of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.05$ vs CTRL (A,B), * $p < 0.01$ vs CTRL (C).

Fig 7 HO-1 expression levels in inferior parietal lobule of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 8 TRXr-1 expression levels in inferior parietal lobule and cerebellum of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.01$ vs CTRL (B).

Fig 9 HO-2 expression levels in inferior parietal lobule of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 10 Plasma HO-1 expression levels of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.05$ vs CTRL.

Fig 11 Lymphocytes HO-1 expression levels and activity of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 12 Lymphocytes NOS-2 expression levels and activity of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). ** $p < 0.01$ vs CTRL, * $p < 0.05$ vs CTRL.

Fig 13 Lymphocytes and plasma expression levels of nitrotyrosine, 4-HNE and DPNH of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD).

Fig 14 Lymphocytes Hsp72 (A) and Hsp60 (B) expression levels of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). * $p < 0.01$ vs CTRL.

Fig 15 Lymphocytes (A) and plasma (B) TRXr-1 expression levels of control healthy volunteers (CTRL) and Alzheimer diseased patients (AD). ** p<0.01 vs CTRL (A), * p<0.05 vs CTRL (B).

Fig 16 Regional distribution of total sulfhydryl groups in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 17 Regional distribution of reduced glutathione (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 18 Regional distribution of Hsp72 in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 19 Regional distribution in the levels of HO-1 immunoreactivity in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 20 Regional distribution of Hsp90 in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 21 Regional distribution of Trx protein in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 22 Regional distribution of Tiorodoxin reductase (TRXr-1) in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 23 4-HNE and carbonyl levels in different brain regions of senescent and aged rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats. * p<0.05 vs aged (12 month) rats.

Fig 24 Neuroblastoma SH-SY5Y *cell viability* after SIN-1 (4h) treatment in presence and absence of CRNS. * p<0.05 vs CTRL, ** p<0.05 vs SIN-1.

Fig 25 Neuroblastoma SH-SY5Y *cell viability* after SIN-1 (4h) treatment in presence and absence of CRNS. * p<0.05 vs CTRL, ** p<0.05 vs SIN-1.

Fig 26 Neuroblastoma SH-SY5Y *cell viability* after SIN-1 (7h) treatment in presence and absence of CRNS. * p<0.05 vs CTRL, ** p<0.05 vs SIN-1.

Fig 27 Neuroblastoma SH-SY5Y *cell viability* after SIN-1 (7h) treatment in presence and absence of CRNS. * p<0.05 vs CTRL, ** p<0.05 vs SIN-1.

Fig 28 Neuroblastoma SH-SY5Y *cell viability* after SIN-1 (1mM) treatment at different times.

Fig 29 Carbonyl groups content (DPNH) in Neuroblastoma SH-SY5Y cell line after SIN-1 treatment at different concentrations and times.

Fig 30 4-HNE expression levels in Neuroblastoma SH-SY5Y cell line after SIN-1 treatment at different concentrations and times.

Fig 31 HO-1 induction in Neuroblastoma SH-SY5Y cell line after SIN-1 treatment at different concentrations and times. * p<0.01 vs CTRL.

Fig 32 Hsp72 expression levels in Neuroblastoma SH-SY5Y cell line after SIN-1 (1mM) treatment in presence and absence of CRNS at different concentrations and times. * p<0.01 vs CTRL.

Fig 1A Schema illustrativo dei *vitageni* coinvolti nella “*cellular stress response*”.

Fig 34 NF1 heterozygous *nonsense* mutation in exon 41 (c.6243C>A; p.Y2081X).

Fig 35 NF1 heterozygous *nonsense* mutation in exon 36 (c.5170A>T ; p.K1724X).

Fig 36 NF1 heterozygous *splicing* mutation in intron 23 (acceptor site) causing exon 24 *skipping* (IVS23-2delA; c.3114-2delA).

Fig 37 NF1 heterozygous *missense* mutation in exon 17 activating a *criptic splicing* site (c.1885G>A). Gasparini P. et al., *Hum. genet.* 199, 97(4):492-495.

Fig 38 NF1 heterozygous *missense* mutation in exon 11 (acceptor site) causing five codons *in frame* deletion (IVS10-2A>G). Ars E. et al., *J. Med. Genet.* 2003, 40(6):e82.

Fig 39 NF1 heterozygous *in frame* microdeletion mutation in exon 17 (c.7097-7101delAACTTT; p.2366-2367Asn-Phedel). Abernathy et al., *Human Mutation* 1994, 3:347-352.

Fig 40 NF1 heterozygous *frameshift* microdeletion mutation in exon 34 causing a premature stop codon. (c.4577delG; p.1525fs1552X).

Fig 41 NF1 heterozygous *frameshift* microinsertion mutation in exon 33 causing a premature stop codon. (c.4577delG; p.1525fs1552X). (c.4441 insT; p.1480Aspfs1508X).

Fig 42 NF1 heterozygous *frameshift* microinsertion mutation (insATTC) in exon 22 causing a premature stop codon. (c.2930-2931insATTC; p.Gly978Phefs982X).

Fig 43 NF1 heterozygous *missense* mutation in exon 1. (c.41T>G ; p.V14G).

Fig 44 NF1 heterozygous *missense* mutation in exon 57. (c.8332G>A; p.V2778I).

Fig 45 MLPA-NF1. Genomic deletion of gene NF1.

Fig 46 MLPA-NF1. Exon 1 deletion of NF1 gene.

REFERENCES

1. Calabrese V., Butterfield D.A., Scapagnini G., Giuffrida Stella A.M., Maines M.D. 2006. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. *Antioxid. Redox Signal.* 8:444-477.
2. Calabrese V., Giuffrida Stella A.M., Calvani M., Butterfield D.A. 2006. Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J. Nutrit. Biochemistry* 17:73-88.
3. Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004. Free radicals and brain aging. *Clin. Geriatr. Med.* 20:329-359.
4. Stefani M. 2004. Protein *misfolding* and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim. and Biophys. Acta* 1739:5-25.
5. Calabrese V., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M. 2000. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 65:1315-1341.
6. Calabrese V., Scapagnini G., Giuffrida Stella A.M., Bates T.E., Clark J.B. 2001. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.* 26:739-764.
7. Boveris A., Oshino N., Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *J. Biochem.* 128:617-630.
8. Calabrese V., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A., Scapagnini G. 2004. Redox regulation in neurodegeneration and longevity: role of the heme oxygenase and HSP70 systems in brain stress tolerance. *Antioxid. Redox Signal.* 6:895-913.
9. Butterfield D.A., Boyd-Kimball D., Castegna A. 2003. Proteomics in Alzheimer's disease: insights into mechanisms of neurodegeneration. *J. Neurochem.* 86:1313-1327.
10. McCord J.M., Fridovich I. 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Rad. Biol. Med.* 5:363-369.
11. Vina J., Borras C., Gomez-Cabrera M.C., Orr W.C. 2006. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Rad. Res.* 40:111-119.

12. Calabrese V., Guagliano E., Sapienza M., Panebianco M., Calafato S., Puleo E., Pennisi G., Mancuso C., Butterfield D.A., Giuffrida A.M. 2007. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem. Res.* 32:757-773.
13. Hayden M.R., Tyagi S.C., Kerklo M.M., Nicolls M.R. 2005. Type 2 Diabetes Mellitus as a Conformational Disease. *JOP* 6:287-302.
14. Calabrese E.J. 2008. Hormesis and medicine. *J. Br. Clin. Pharmacol.* 66:594-617.
15. Mattson M.P. 2008. Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Res. Rev.* 7:43-48.
16. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Stella A.M. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:766-775.
17. Calabrese V., Cornelius C., Stella A.M., Calabrese E.J. Cellular Stress Responses, Mitostress and Carnitine Insufficiencies as Critical Determinants in Aging and Neurodegenerative Disorders: Role of Hormesis and Vitagenes. *Neurochem. Res.* 2010 Nov 13.
18. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A.T., Calabrese E.J., Mattson M.P. 2010. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid. Redox Signal.* 13:1763-1811.
19. Calabrese V., Ravagna A., Colombrita C., Guagliano E., Scapagnini G., Calvani M., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. 2005. Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J. Neurosci. Res.* 79:509-521.
20. Calabrese V., Cornelius C., Trovato A., Cavallaro M., Mancuso C., Di Rienzo L., Condorelli D., De Lorenzo A., Calabrese E.J. 2010. The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Curr. Pharm. Des.* 16:877-883.
21. Joshi G., Perluigi M., Sultana R., Agrippino R., Calabrese V., Butterfield D.A. 2006. *In vivo* protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Neurochem. Int.* 48:318-327.
22. Otterbein L.E., Choi A.M. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279:1029-1037.

23. Errico S., Shohreh R., Barone E., Pusateri A., Mores N., Mancuso C. 2010. Heme oxygenase-derived carbon monoxide modulates gonadotropin-releasing hormone release in immortalized hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 471:175-178.
24. Mancuso C., Monsignore A., Di Stasio E., Mordente A., Motterlini R. 2003. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 66:2355-2366.
25. Mancuso C., Monsignore A., Capone C., Di Stasio E., Pani G. 2006. Albumin-bound bilirubin interacts with nitric oxide by a redox mechanism. *Antioxid. Redox Signal.* 8:487-494.
26. Scapagnini G., D'Agata V., Calabrese V., Pascale A., Colombrita C., Alkon D., Cavallaro S. 2002. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* 954:51-59.
27. Kim S.Y., Kang H.T., Choi H.R., Park S.C. 2010. Biliverdin reductase A in the prevention of cellular senescence against oxidative stress. *Exp. Mol. Med.* Nov 24.
28. Öllinger R., Pratschke J. 2010. Role of heme oxygenase-1 in transplantation. *Transpl. Int.* 23:1071-1081.
29. Martin D., Rojo A.I., Salinas M., Diaz R., Gallardo G., Alam J., De Galarreta C.M., Cuadrado A. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* 279:8919-8929.
30. Sun J., Hoshino O., Takaku K., Nakajima O., Muto A., Suzuki H., Tashiro S., Takahashi S., Shibahara S., Alam J., Taketo M., Yamamoto M., Igarashi K. 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *J. EMBO* 21:5216-5224.
31. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A.T., Calabrese E.J. 2009. Vitagenes, cellular stress response, and acetylcarnitine: relevance to hormesis. *Biofactors* 35:146-160.
32. Takeda A., Perry G., Abraham N.G., Dwyer B.E., Kutty R.K., Laitinen J.T., Petersen R.B., Smith M.A. 2000. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *J. Biol. Chem.* 275:5395-5399.
33. Scapagnini G., Colombrita C., Amadio M., D'Agata V., Arcelli E., Sapienza M., Quattrone A., Calabrese V. 2006. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8:395-403.

34. Bellia F., Calabrese V., Guarino F., Cavallaro M., Cornelius C., De Pinto V., Rizzarelli E. 2009. Carnosinase levels in aging brain: redox state induction and cellular stress response. *Antioxid. Redox Signal.* 11:2759-2775.
35. Kang J.H. 2010. Protective effects of carnosine and homocarnosine on ferritin and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *BMB Rep.*43:683-687.
36. Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Barone E., Calafato S., Bates T., Rizzarelli E., Kostova A.T. 2009. Vitagenes, dietary antioxidants and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Front. Biosci.* 14:376-397.
37. Calabrese V., Colombrita C., Guagliano E., Sapienza M., Ravagna A., Cardile V., Scapagnini G., Santoro A.M., Mangiameli A., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M., Rizzarelli E. 2005. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem. Res.* 30:797-807.
38. Reddy V.P., Garrett M.R., Perry G., Smith M.A. 2005. Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 4:pe12.
39. Spina-Purrello V., Giliberto S., Barresi V., Nicoletti V.G., Giuffrida Stella A.M., Rizzarelli E. Modulation of PARP-1 and PARP-2 Expression by L-carnosine and Trehalose After LPS and INF γ -Induced Oxidative Stress. *Neurochem. Res.* 2010 Oct 30.
40. Attanasio F., Cascio C., Fisichella S., Nicoletti V.G., Pignataro B., Savarino A., Rizzarelli E. 2007. Trehalose effects on alpha-crystallin aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:899-905.
41. Izmitli A., Schebor C., McGovern M.P., Reddy A.S., Abbott N.L., de Pablo J.J. Effect of trehalose on the interaction of Alzheimer's A β -peptide and anionic lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010 Oct 1.
42. Tsai S.J., Kuo W.W., Liu W.H., Yin M.C. Antioxidative and Anti-Inflammatory Protection from Carnosine in the Striatum of MPTP-Treated Mice. *J. Agric. Food Chem.* 2010 Oct 6.
43. Zheng Z., Kim J.Y., Ma H., Lee J.E., Yenari M.A. 2008. Antiinflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28:53-63.
44. Kelly S., Zhang Z.J., Zhao H., Xu L., Giffard R.G., Sapolsky R.M., Yenari M.A., Steinberg G.K. 2002. Gene transfer of HSP72 protects cornu ammonis 1 region of the hippocampus neurons from global ischemia: influence of Bcl-2. *Ann. Neurol.* 52:160-167

45. van der Weerd L., Lythgoe M.F., Badin R.A., Valentim L.M., Akbar M.T., de Belleruche J.S., Latchman D.S., Gadian D.G. 2005. Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia-an MRI study. *Exp. Neurol.* 195: 257-266.
46. Soti C., Csermely P. 2007. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J. Biosci.* 32:511-515.
47. Kim H.L., Cassone M., Otvos L. Jr., Vogiatzi P. 2008. HIF-1 α and STAT3 client proteins interacting with the cancer chaperone Hsp90: therapeutic considerations. *Cancer Biol. Ther.* 7:10-14.
48. Navarro A., Boveris A. 2008. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:1534-1544.
49. Benhar M., Forrester M.T., Stamler J.S. 2009. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:721-732.
50. Aliev G., Palacios H.H., Lipsitt A.E., Fischbach K., Lamb B.T., Obrenovich M.E., Morales L., Gasimov E., Bragin V. 2009. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. *Neurotox. Res.* 16:293-305.
51. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A. 2009c. Nitric oxide in cell survival: a Janus molecule. *Antioxid. Redox Signal.* 11:2717-2739.
52. Der P., Cui J., Das D.K. 2006. Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in the ischemic and preconditioned hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 40:313-320.
53. Zhou P., Qian L., Iadecola C. 2005. Nitric oxide inhibits caspase activation and apoptotic morphology but does not rescue neuronal death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25:348-357.
54. Sergent O., Griffon B., Morel I., Chevanne M., Dubos M.P., Cillard P., Cillard J. 1977. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 25:122-127.
55. Nakamura T., Lipton S.A. 2007. S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding. *Cell Death Differ.* 14:1305-1314.
56. Gonzalez D.R., M Sc A.T., Sun Q.A., Stamler J.S., Hare J.M. S-nitrosylation of cardiac ion channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009 Aug 14.
57. Foster M.W., Hess D.T., Stamler J.S. 2009. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol. Med.* 15:391-404.

58. Mattson M.P., Gleichmann M., Cheng A. 2008b. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60:748-766.
59. Yamamoto T., Maruyama W., Kato Y., Yi H., Shamoto-Nagai M., Tanaka M., Sato Y., Naoi M. 2002. Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 109:1-13.
60. Kaji T., Kaieda I., Hisatsune T., Kaminogawa S. 2002. 3-Morpholiniosydnonimine hydrochloride induces p53-dependent apoptosis in murine primary neural cells: a critical role for p21(ras)-MAPKp19(ARF) pathway. *Nitric Oxide* 6:125-134.
61. Cao Z., Hallur S., Qiu H.Z., Peng X., Li Y. 2004. Induction of endogenous glutathione by the chemoprotective agent, 3H-1,2-dithiole-3-thione, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells affords protection against peroxynitrite-induced cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:1043-1049.
62. Motterlini R., Hidalgo A., Sammut I., Shah K.A., Mohammed S., Srail K., Green C.J. 1996. A Precursor of the Nitric Oxide Donor SIN-1 Modulates the Stress Protein Heme Oxygenase-1 in Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:167-172.
63. Arnè E.S.J., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267:6102-6109.
64. Nakamura H. 2005. Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antiox. Redox Signal.* 7:823-828.
65. Das K.C. 2005. Thioredoxin and its role in premature newborn biology. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1740-1743.
66. Cho C.G., Kim H.J., Chung S.W., Kyung K.J., Shim K.H., Yu B.P., Yodoi J., Chung H.Y. 2003. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp. Gerontol.* 38:539-548.
67. Sun Q.A., Kirnarsky L., Sherman S., Gladyshev V.N. 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3673-3678.
68. Bias S., Chida A.S., Rahman I. 2006. Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* 71:551-564.
69. Butterfield D.A., Pocernich C.B., Drake J. 2002. Elevated glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Drug Disc. Res.* 56:428-437.

70. Drake J., Kanski J., Varadarajan S., Tsoras M., Butterfield D.A. 2002. Elevation of brain glutathione by gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects against peroxynitrite-induced oxidative stress. *J. Neurosci Res.* 68:776-784.
71. Hammond C.L., Lee T.K., Ballatori N. 2001. Novel roles for glutathione I gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J. Hepatol.* 34:946-954.
72. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57:145-155.
73. Dringen R., Hirrlinger J. 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* 384:505-516.
74. Rundolf A.K., Arnè E.S.J. 2004. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antiox. Redox Signal.* 6:41-52.
75. Casagrande S., Bonetto V., Fratelli M., Gianazza E., Eberini I., Massignan T., Salmons M., Chang G., Holmgren A., Ghezzi P. 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:9745-9749.
76. Watanabe R., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J. 2010. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol. Ther.* 127:261-270.
77. Nakamura H. 2004. Thioredoxin as a key molecule in redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 6:15-17.
78. Hirota K., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J. 2002. Thioredoxin Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 957:189-199.
79. Powis G., Mustacich D., Coon A. 2000. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Rad. Biol. Med.* 29:312-322.
80. Nonn L., Williams R.R., Erickson R.P., Powis G. 2003. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell Biol.* 23:916-922.
81. Tagaya Y., Maeda Y., Mitsui A., Kondo N., Matsui H., Hamuro J., Brown N., Arai K., Yokota T., Wakasugi H., Yodoi J. 1989. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *J. EMBO* 8:757-764.

82. Nordberg J., Arner E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1287-1312.
83. Mustacich D., Powis G. 2000. Thioredoxin reductase. *J. Biochem.* 346:1-8.
84. May J.M., Morrow J.D., Burk R.F. 2002. Thioredoxin reductase reduces lipid hydroperoxides and spares alpha-tocopherol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:45-49.
85. Klotz L.O., Sies H. 2003. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol. Lett.* 140-141:125-132.
86. Jimenez A., Huikko M.P., Gustafsson J.A., Miranda-Vizuet A. 2006. Characterization of human thioredoxin-like-1: Potential involvement in the cellular response against glucose deprivation. *FEBS Lett.* 580:960-967.
87. Patenaude A., Murthy M.R., Mirault M.E. 2005. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1063-1080.
88. Kim Y.C., Yamaguchi Y., Kondo N., Masutani H., Yodoi J. 2003. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene* 22:1860-1865.
89. Biaglow J.E., Miller R.A. 2005. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 4:6-13.
90. Masutani H., Bai J., Kim Y.C., Yodoi J. 2004. Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 29:229-242.
91. Trigona W.L., Mullarky I.K., Cao Y., Sordillo L.M. 2006. Thioredoxin reductase regulates the induction of heme oxygenase-1 expression in aortic endothelial cells. *J. Biochem.* 394:207-216.
92. Das K.C., Das C.K. 2000. Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277:443-447.
93. Rhee S.G., Kang S.W., Chang T.S., Jeong W., Kim K. 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52:35-41.
94. Krapfenbauer K., Engidawork E., Cairns N., Fountoulakis M., Lubec G. 2003. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 967:152-160.
95. Rybnikova E., Damdimopoulos A.E., Gustafsson J.A., Spyrou G., Pelto-Huikko M. 2000. Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 12:1669-1678.

96. Calabrese V., Sultana R., Scapagnini G., Guagliano E., Sapienza M., Bella R., Kanski J., Pennisi G., Mancuso C., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A. 2006. Nitrosative stress, cellular stress response and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antiox. Redox Signal.* 8:1975-1986.
97. Mattson M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.
98. Sahin H.A., Emre M., Ziabreva I., Perry E., Celasun B., Perry R. 2006. The distribution pattern of pathology and cholinergic deficits in complex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 111:115-125.
99. Gibson G.E., Huang M.H. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol. of Aging* 26:575-578.
100. Butterfield D.A., Perluigi M., Sultana R. 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur. J. Pharmacol.* 545:39-50.
101. Sultana R., Perluigi M., Butterfield D.A. 2006. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal.* 8:2021-2037.
102. Markesbery W.R., Lovell M.A. 2006. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8:2039-2045.
103. Keller J.N., Schmitt F.A., Scheff S.W., Ding Q., Chen Q., Butterfield D.A., Markesbery W.R. 2005. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 64:1152-1156.
104. Butterfield D.A., Griffin S., Munch G., Pasinetti G.M. 2002. Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. *J. Alzheimers Dis.* 4:193-201.
105. Huang S.M., Mouri A., Kokubo H., Nakajima R., Suemoto T., Higuchi M., Staufenbiel M., Noda Y., Yamaguchi H., Nabeshima T., Saido T.C., Iwata N. 2006. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J. Biol. Chem.* 281:17941-17951.
106. Butterfield D.A., Boyd-Kimball D. 2005. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1703:149-156.
107. Sultana R., Butterfield D.A. 2006. Regional expression of key cell cycle proteins in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem. Res.* Sep 28.

108. Butterfield D.A., Poon H.F., St Clair D., Keller J.N., Pierce W.M., Klein J.B., Markesbery W.R. 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 22:223-232.
109. Luth H.J., Munch G., Arendt T. 2002. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res.* 953:135-143.
110. Hu J.R., Ferreira A., Van Eldik L.J. 1997. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J. Neurochem.* 69:2294-2301.
111. Corregidor C., De Pasamonte J. 1996. Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 94:411-414.
112. Caspersen C., Wang N., Yao J., Sosunov A., Chen X., Lustbader J.W., Xu H.W., Stern D., McKhann G., Yan S.D. 2005. Mitochondrial A β : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *J. FASEB* 19:2040-2041.
113. Beere H.M. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117:2641-2651.
114. Sahara N., Murayama M., Mizoroki T., Urushitani M., Imai Y., Takahashi R., Murata S., Tanaka K., Takashima A. 2005. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating *tau* aggregation. *J. Neurochem.* 94:1254-1263.
115. Wu Y., Luo Y. 2005. *Transgenic C. elegans* as a model in Alzheimer's research. *Curr. Alzheimer Res.* 2:37-45.
116. Magrane J., Smith R.C., Walsh K., Querfurth H.W. 2004. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J. Neurosci.* 24:1700-1706.
117. Premkumar D.R., Smith M.A., Richey P.L., Petersen R.B., Castellani R., Kutty R.K., Wiggert B., Perry G., Kalaria R.N. 1995. Induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65:1399-1402.
118. Chiueh C.C., Andoh T., Chock P.B. 2005. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1042:403-418.
119. Lovell M.A., Xie C., Gabbita S.P., Markesbery W.R. 2000. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic. Biol. Med.* 28:418-427.

120. Vina J., Lloret A., Orti R., Alonso D. 2004. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 25:117-123.
121. Butterfield D.A., Koppal T., Subramaniam R., Yatin S. 1999. Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.*10:141-149.
122. Yatin S.M., Varadarajan S., Link C.D., Butterfield D.A. 1999. In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol. Aging* 20:325-330.
123. Scapagnini G., Dinotta F., Calabrese V. 2000. Oxidative stress and neurodegenerative disorders: the role of vitamin E in nutritional neuroscience. *Dermatologia* 1:97-107.
124. Voss P., Horakova L., Jakstadt M., Kiekebusch D., Grune T. 2006. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: protection by antioxidants. *Free Rad. Res.* 40:673-683.
125. Calabrese V., Signorile A., Cornelius C., Mancuso C., Scapagnini G., Ventimiglia B., Ragusa N., Dinkova-Kostovak A. 2008. Practical Approaches to Investigate Redox Regulation of Heat Shock Protein Expression and Intracellular Glutathione Redox State. *Methods in Enzymology*, Vol. 441.
126. Calabrese V., Cornelius C., Maiolino L., Luca M., Chiaramonte R., Toscano M.A., Serra A. Oxidative Stress, Redox Homeostasis and Cellular Stress Response in Meniere's Disease: Role of Vitagenes. *Neurochem. Res.* 2010 Nov 3.
127. Melki S.J., Heddon C.M., Frankel J.K., Levitt A.H., Momin S.R., Alagramam K.N., Megerian C.A. 2010. Pharmacological protection of hearing loss in the mouse model of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 120:1637-1645.
128. Menieré P. 1861. Sur une forme de surdit  grave d pendant d'une lesion de l'oreille interne. *Gaz M d de Paris.* 16:29.
129. Megerian C.A., Cliff A. 2005. Diameter of the cochlear nerve in endolymphatic hydrops: implications for the etiology of hearing loss in Meniere's disease. *Laryngoscope* 9:1525-1535.
130. Semaan M.T., Alagramam K.N., Megerian C.A. 2005. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 13:301-307.

131. Merchant S.N., Adams J.C., Nadol J.B. 2005. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol. Neurotol.* 26:74-81.
132. Ishiyama G., López I.A., Ishiyama A. 2006. Aquaporins and Meniere's disease. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14:332-336.
133. Alexander T.H., Harris J.P. 2010. Current epidemiology of Meniere's syndrome. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 43:965-970.
134. Morrison A.W., Johnson K.J. 2002. Genetics (molecular biology) and Meniere's disease. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 35:497-516.
135. Frykholm C., Larsen H.C., Dahl N., Klar J., Rask-Andersen H., Friberg U. 2006. Familial Ménière's disease in five generations. *Otol. Neurotol.* 27:681-686.
136. Hayashi K., Kobayashi R., Kitamura K., Goto F., Ogawa K., Matsumoto T. 2010. A novel model for prognosis of Meniere's disease using oxidative stress susceptibility of lymphoblastoid cell lines. *BioScience Trends.* 4:72-78.
137. Labbe' D., Teranishia M., Hessa A., Blochb W., Michel O. 2005. Activation of caspase-3 is associated with oxidative stress in the hydropic guinea pig cochlea. *Hear Researche* 202:21-27.
138. Raponi G., Alpini D., Volontè S., Capobianco S., Cesarani A. 2003. The role of free radicals and plasmatic antioxidants in Meniere's syndrome. *Int. Tinnitus J.* 9:104-108.
139. Anne S., Kisley L.B., Tajuddin S.T., Leahy P., Alagramam K.N., Megerian C.A. 2007. Molecular changes associated with the endolymphatic hydrops model. *Otol. Neurotol.* 28:834-841.
140. Michel O., Hess A., Su J., et al. 2000. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the hydropic cochlea of guinea pigs. *Hear Res.* 143:23-28.
141. Furness D.N., Lawton D.M. 2003. Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea. *J. Neurosci.* 23:11296-11304.
142. Furness D.N., Hulme J.A., Lawton D.M., et al. 2002. Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 3:234-247.
143. Hakuba N., Koga K., Gyo K., et al. 2000. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J. Neurosci.* 20: 8750-8753.
144. Yin S.H., Tang A.Z., Cai H.W., Chen P., Tan S.H., Xie L.H. 2010. Caspase-3 activation in the guinea pig cochlea exposed to salicylate. *Neuroscience Letters* 479:34-39.

145. Todt I., Ngezahayo A., Ernst A., Kolb H.A. 2001. Hydrogen peroxide inhibits gap junctional coupling and modulates intracellular free calcium in cochlear Hensen cells. *J. Membr. Biol.* 2:107-114.
146. Calabrese V., Mancuso C., Ravagna A., Perluigi M., Cini C., De Marco C., Butterfield D.A., Giuffrida A. 2007. In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state. *J. Neurochem.* 10:709-717.
147. Calabrese V., Mancuso C., Sapienza M., Puleo E., Calafato S., Cornelius C., Finocchiaro M., Mangiameli A., Di Mauro M., Giuffrida A., Castellino P. 2007. Oxidative stress, and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperons* 12:299-306.
148. Abi-Hachem R.N., Zine A., Van De Water T.R. 2010. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotective strategies. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 5:147-163.
149. Lu-Emerson C., Plotkin S.R. 2009. The Neurofibromatoses. Part 1: NF1. *Rev. Neurol. Dis.* 6:E47-E53.
150. Boyd K.P., Korf B.R., Theos A. 2009. Neurofibromatosis type 1. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61:1-14.
151. Asthagiri A.R., Parry D.M., Butman J.A., Kim H.J., Tsilou E.T., Zhuang Z., Lonsler R.R. 2009. Neurofibromatosis type 2. *Lancet* 373:1974-1986.
152. Hüffmeier U., Zenker M., Hoyer J., Fahsold R., Rauch A. 2006. A variable combination of features of Noonan syndrome and neurofibromatosis type I are caused by mutations in the NF1 gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 140:2749-2756.
153. De Schepper S., Boucneau J., Lambert J., Messiaen L., Naeyaert J.M. 2005. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. *Pigment Cell Res.* 18:13-24.
154. Poyhonen M. 2000. A clinical assessment of neurofibromatosis type 1 (NF1) and segmental NF in Northern Finland. *J. Med. Genet.* 37:E43.
155. Shah K.N. 2010. The diagnostic and clinical significance of café-au-lait macules. *Pediatr. Clin. North Am.* 57:1131-1153.
156. Crawford A.H., Schorry E.K. 2006. Neurofibromatosis update. *J. Pediatr. Orthop.* 26:413-423.

157. National Institute of Health Consensus Development Conference 1988. Neurofibromatosis: Conference Statement. 1987 *Arch. Neurol.* 45:575-578.
158. Tonsgard J.H. 2006. Clinical Manifestations and Management of Neurofibromatosis Type 1. *Seminars in Pediatric Neurology* 2-7.
159. Williams V.C., Lucas J., Babcock M.A., Gutmann D.H., Korf B., Maria B.L. 2009. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 123:124-133.
160. Savar A., Cestari D.M. 2008. Neurofibromatosis type I: genetics and clinical manifestations. *Semin. Ophthalmol.* 23:45-51.
161. Ferner R.E., Huson S.M., Thomas N., Moss C., Willshaw H., Evans D.G., Upadhyaya M., Towers R., Gleeson M., Steiger C., Kirby A. 2007. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J. Med. Genet.* 44:81-88.
162. Gromova M., Gerinec A. 2008. Ocular manifestations of neurofibromatosis 1 - von Recklinghausen. *Bratisl Lek Listy* 109:246-247.
163. Richetta A., Giustini S., Recupero S.M., Pezza M., Carlomagno V., Amoroso G., Calvieri S. 2004. Lisch nodules of the iris in neurofibromatosis type 1. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18:342-344.
164. Gabriele A.L., Ruggieri M., Patitucci A., Magariello A., Conforti F.L., Mazzei R., Muglia M., Ungaro C., Di Palma G., Citrigno L., Sproviero W., Gambardella A., Quattrone A. A novel NF1 gene mutation in an Italian family with neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv. Syst.* 2010 Oct 7.
165. Rutkowski J.L., Wu K., Gutmann D.H., Boyer P.J., Legius E. 2000. Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* 9:1059-1066.
166. Sehgal V.N., Srivastava G., Aggarwal A.K., Oberai R. 2009. Plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *Int. J. Dermatol.* 48:971-974.
167. Gesundheit B., Parkin P., Greenberg M., Baruchel S., Senger C., Kapelushnik J., Smith C., Klement G.L. 2010. The role of angiogenesis in the transformation of plexiform neurofibroma into malignant peripheral nerve sheath tumors in children with neurofibromatosis type 1. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32:548-553.
168. Babovic-Vuksanovic D., Petrovic L., Knudsen B.E., Plummer T.B., Parisi J.E., Babovic S., Platt J.L. 2004. Survival of Human Neurofibroma in Immunodeficient Mice and Initial Results of Therapy With Pirfenidone. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004:79-85.

169. Babovic-Vuksanovic D., Ballman K., Michels V., McGrann P., Lindor N., King B., Camp J., Micic V., Babovic N., Carrero X., Spinner R. 2006. Phase II trial of pirfenidone in adults with neurofibromatosis type 1. *O'Neill B. Neurology* 67:1860-1862.
170. Albers A.C., Gutmann D.H. 2009. Gliomas in patients with neurofibromatosis type 1. *Expert Rev. Neurother.* 9:535-539.
171. Vitale M.G., Guha A., Skaggs D.L. 2002. Orthopaedic manifestations of neurofibromatosis in children: an update. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 401:107-118.
172. Krab L.C., Aarsen F.K., de Goede-Bolder A., Catsman-Berrevoets C.E., Arts W.F., Moll H.A., Elgersma Y. 2008. Impact of neurofibromatosis type 1 on school performance. *J. Child Neurol.* 23:1002-1010.
173. Hyman S.L., Arthur Shores E., North K.N. 2006. Learning disabilities in children with neurofibromatosis type 1: subtypes, cognitive profile, and attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 48:973-977.
174. Thiagalingam S., Flaherty M., Billson F., North K. 2004. Neurofibromatosis type 1 and optic pathway gliomas: follow-up of 54 patients. *Ophthalmology* 111:568-577.
175. Crawford A.H., Herrera-Soto J. 2007. Scoliosis associated with neurofibromatosis. *Orthop. Clin. North Am.* 38:553-562.
176. Alwan S., Tredwell S.J., Friedman J.M. 2005. Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)? *Clin. Genet.* 67:378-390.
177. Dimou J., Jithoo R., Pitcher M., White G. 2009. Recurrent malignant peripheral nerve sheath tumour in a patient with neurofibromatosis Type 1: a case report. *J. Clin. Neurosci.* 16:1221-1223.
178. Kluwe L., Friedrich R.E., Peiper M., Friedman J., Mautner V.F. 2003. Constitutional NF1 mutations in neurofibromatosis 1 patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Hum. Mutat.* 22:420.
179. Su W., Sin M., Darrow A., Sherman L.S. 2003. Malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion is facilitated by Src and aberrant CD44 expression. *Glia* 42:350-358.
180. Messiaen L., Vogt J., Bengesser K., Fu C., Mikhail F., Serra E., Garcia-Linares C., Cooper D.N., Lazaro C., Kehrer-Sawatzki H. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum. Mutat.* 2010 Nov 30.
181. Huijbregts S., Swaab H., de Sonnevile L. 2010. Cognitive and motor control in neurofibromatosis type I: influence of maturation and hyperactivity-inattention. *Dev. Neuropsychol.* 35:737-751.

182. Payne J.M., Moharir M.D., Webster R., North K.N. 2010. Brain structure and function in neurofibromatosis type 1: current concepts and future directions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81:304-309.
183. Sangster J., Shores E.A., Watt S., North K.N. 2010. The Cognitive Profile of Preschool-Aged Children with Neurofibromatosis Type 1. *Child Neuropsychol.* 25:1-16.
184. Rea D., Brandsema J.F., Armstrong D., Parkin P.C., Deveber G., Macgregor D., Logan W.J., Askalan R. 2009. Cerebral Arteriopathy in Children With Neurofibromatosis Type 1. *Pediatrics* 124:e476-e483.
185. Xu J., Ismat F.A., Wang T., Yang J., Epstein J.A. 2007. NF1 regulates a Ras-dependent vascular smooth muscle proliferative injury response. *Circulation* 116:2148-2156.
186. Barton B., North K. 2007. The *self-concept* of children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Child Care Health Dev.* 33:401-408.
187. Noll R.B., Reiter-Purtill J., Moore B.D., Schorry E.K., Lovell A.M., Vannatta K., Gerhardt C.A. 2007. Social, emotional, and behavioral functioning of children with NF1. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A:2261-2273.
188. Pasmant E., Sabbagh A., Spurlock G., Laurendeau I., Grillo E., Hamel M.J., Martin L., Barbarot S., Leheup B., Rodriguez D., Lacombe D., Dollfus H., Pasquier L., Isidor B., Ferkal S., Soulier J., Sanson M., Dieux-Coeslier A., Bièche I., Parfait B., Vidaud M., Wolkenstein P., Upadhyaya M., Vidaud D.; members of the NF France Network. 2010. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum. Mutat.* 31:E1506-E1518.
189. Welti S., Kühn S., D'Angelo I., Brüügger B., Kaufmann D., Scheffzek K. Structural and biochemical consequences of NF1 associated non-truncating mutations in the Sec14-PH module of neurofibromin. *Hum. Mutat.* 2010 Nov 18.
190. Shen M.H., Harper P.S., Upadhyaya M. 1996. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J. Med. Genet.* 33:2-17.
191. Trovó-Marqui A.B., Tajara E.H. 2006. Neurofibromin: a general outlook. *Clin. Genet.* 70:1-13.
192. Cichowski K., Santiago S., Jardim M., Johnson B.W., Jacks T. 2003. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev.* 17:449-454.
193. Welti S., D'Angelo I., Scheffzek K. 2008. Structure and function of neurofibromin. Neurofibromatoses Monogr. *Hum. Genet. Basel Karger* 16:113-128.

194. Lee M.J., Stephenson D.A. 2007. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.* 20:135-141.
195. Li C., Cheng Y., Gutmann D.A., Mangoura D. 2001. Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 130:231-248.
196. Hsueh Y.P., Roberts A.M., Volta M., Sheng M., Roberts R.G. 2001. Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 21:3764-3770.
197. Boyanapalli M., Lahoud O.B., Messiaen L., Kim B., Anderle de Saylor M.S., Duckett S.J., Somara S., Mikol D.D. 2006. Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:1200-1208.
198. Tong J.J., Schriener S.E., McCleary D., Day B.J., Wallace D.C. 2007. Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 39:476-485.
199. Vandenbroucke I., Callens T., De Paepe A., Messiaen L. 2002. Complex splicing pattern generates great diversity in human NF1 transcripts. *BMC Genomics* 3:13.
200. Kaufmann D., Muller R., Kenner O. et al. 2002. The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:496-503.
201. Gutmann D.H., Geist R.T., Rose K. et al. 1995. Expression of two new protein isoforms of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, in muscle tissues. *Dev. Dyn.* 202:302-311.
202. Gutmann D.H., Zhang Y., Hirbe A. 1999. Developmental regulation of a neuron-specific neurofibromatosis 1 isoform. *Ann. Neurol.* 46:777-782.
203. Schindeler A., Little D.G. 2008. Recent insights into bone development, homeostasis, and repair in type 1 neurofibromatosis (NF1). *Bone* 42:616-622.
204. Trovo-Marqui A.B., Goloni-Bertollo E.M., Valerio N.I. et al. 2005. High frequencies of plexiform neurofibromas, mental retardation, learning difficulties, and scoliosis in Brazilian patients with neurofibromatosis type 1. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1441-1447.
205. Messiaen L.M., Wimmer K. 2008. NF1 Mutational Spectrum. *Neurofibromatoses Monogr. Hum. Genet. Basel. Karger* 16:63-77.
206. Tinschert S. 2008. Clinical phenotypes in patients with NF1 microdeletions. *Neurofibromatoses Monogr. Hum. Genet. Basel. Karger* 16:78-88.

- 207.** De Luca A., Bottillo I., Dasdia M.C., Morella A., Lanari V., Bernardini L., Divona L., Giustini S., Sinibaldi L., Novelli A., Torrente I., Schirinzi A., Dallapiccola B. 2007. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J. Med. Genet.* 44:800-808.
- 208.** Upadhyaya M., Spurlock G., Kluwe L., Chuzhanova N., Bennett E., Thomas N., Guha A., Mautner V. 2009. The spectrum of somatic and germline NF1 mutations in NF1 patients with spinal neurofibromas. *Neurogenetics* 10:251-263.
- 209.** Nystroma A.M., Ekvalla S., Allansonb J., Edebya C., Elindera M., Holmstromc G., Bondesona M.L., Annerena G. 2009. Noonan syndrome and neurofibromatosis type I in a family with a novel mutation in NF1. *Clin. Genet.* 76:524-534.
- 210.** Cichowski K., Shih T.S., Schmitt E., Santiago S., Reilly K., McLaughlin M.E., Bronson R.T., Jacks T. 1999. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286:2172-2176.
- 211.** Zhu Y., Ghosh P., Charnay P., Burns D.K., Parada L.F. 2002. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296:920-922.
- 212.** Assum G., Schmegner C. 2008. NF1 Gene Evolution in Mammals. *Neurofibromatoses Monogr. Hum. Genet. Basel Karger* 16:103-112.
- 213.** De Luca A., Schirinzi A., Buccino A., Bottillo I., Sinibaldi L., Torrente I., Ciavarella A., Dottorini T., Porciello R., Giustini S., Calvieri S., Dallapiccola B. 2004. Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mutat.* 23:629.
- 214.** Kluwe L., Siebert R., Gesk S., Friedrich R.E., Tinschert S., Kehrer-Sawatzki H., Mautner V.F. 2004. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum. Mutat.* 23:111-116.
- 215.** Schirinzi A., Drmanac S., Dallapiccola B., Huang S., Scott K., De Luca A., Swanson D., Drmanac R., Surrey S., Fortina P. 2006. Combinatorial sequencing-by-hybridization: analysis of the NF1 gene. *Genet. Test* 10:8-17.
- 216.** McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- 217.** Calabrese V., Scapagnini G., Ravagna A., Colombrita C., Spadaro F., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. 2004. Increased expression of heat shock proteins in rat

- brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech. Ageing Dev.* 125:325-335.
- 218.** Calabrese V., Testa G., Ravagna A., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M. 2000. HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:397-400.
- 219.** Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Green C.J. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1303-1312.
- 220.** Salter M., Knowles R.G. 1998. Assay of NOS activity by the measurement of conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by NO. *Methods Mol. Biol.* 100:61-65.
- 221.** Saetre T., Gundersen Y., Thiemermann C., Lilleaasen P., Aasen A.O. 1998. Aminoethyl-isothiourea, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase activity, improves liver circulation and oxygen metabolism in a porcine model of endotoxemia. *Shock* 9:109-115.
- 222.** Jansson A., Mazel T., Andbjør B., Rosen L., Guidolin D., Zoli M., Sykova E., Agnati L.F., Fuxe K. 1999. Effects of nitric oxide inhibition on the spread of biotinylated dextran and on extracellular space parameters in the neostriatum of the male rat. *Neuroscience* 91:69-80.
- 223.** Soderman A.C., Bagger-Sjoberg D., Bergenius J., Langius A. 2002. A Factors influencing quality of life in patients with Meniere's disease, identified by a multidimensional approach. *Otol. Neurotol.* 23:941-948.
- 224.** Semaan M.T., Megerian C.A. 2010. Contemporary perspectives on the pathophysiology of Meniere's disease: implications for treatment. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*
- 225.** Best C., Eckhardt-Henn A., Tschann R., Dieterich M. 2009. Psychiatric morbidity and comorbidity in different vestibular vertigo syndromes. Results of a prospective longitudinal study over 1 year. *J. Neurol.* 256:58-65.
- 226.** Brambilla D., Mancuso C., Scuderi M.R., Bosco P., Cantarella G., Lempereur L., Di Benedetto G., Pezzino S., Bernardini R. 2008. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr. J.* 30:7-29.
- 227.** Takeda T., Takeda S., Kakigi A., Okada T., Nishioka R., Taguchi D., Nishimura M., Nakatani H. 2010. Hormonal aspects of Me'nier'e's disease on the basis of clinical and experimental studies. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 71:1-9.

228. Sedlak J., Lindsay R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205.
229. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.
230. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
231. Butterfield D.A., Lauderback C.M. 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32:1050-1060.
232. Castegna A., Thongboonkerd V., Klein J.B., Lynn B., Markesbery W.R., Butterfield D.A. 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 85:1394-1401.
233. Sultana R., Boyd-Kimball D., Poon H.F., Cai J., Pierce W.M., Klein J.B., Markesbery W.R., Zhou X.Z., Lu K.P., Butterfield D.A. 2006. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol. Aging* 27:918-925.
234. Calabrese V., Lodi R., Tonon C., D'Agata V., Sapienza M., Scapagnini G., Mangiameli A., Pennisi G., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A. 2005. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* 233:145-162.
235. Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59:478-493.
236. Castegna A., Aksenov M., Aksenova M., Thongboonkerd V., Klein J.B., Pierce W.M., Booze R., Markesbery W.R., Butterfield D.A. 2002. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain: Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.* 33:562-571.
237. Sultana R., Ravagna A., Mohammad-Abdul H., Calabrese V., Butterfield D.A. 2005. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J. Neurochem.* 92:749-758.

238. Wiesel P., Foster L.C., Pellacani A., Layne M.D., Hsieh C.M., Huggins G.S., Strauss P., Yet S.F., Perrella M.A. 2000. Thioredoxin facilitates the induction of heme oxygenase-1 in response to inflammatory mediators. *J. Biol. Chem.* 275:24840-24846.
239. Butterfield D.A., Stadtman E.R. 1997. Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* 2:161-191.
240. Szabo C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141:105-112.
241. Reynolds M.R., Berry R.W., Binder L.I. 2005. Site- Specific Nitration and Oxidative Dityrosine Bridging of the tau Protein by Peroxynitrite: Implications for Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 44:1690-1700.
242. Gasparini P., D'Agruma L., Pio de Cillis G., Balestrazzi P., Mingarelli R., Zelante L. 1996. Scanning the first part of the neurofibromatosis type 1 gene by RNA-SSCP: identification of three novel mutations and of two new polymorphisms. *Hum. Genet.* 97:492-495.
243. Ars E., Kruyer H., Morell M., Pros E., Serra E., Ravella A., Estivill X., Lázaro C. 2003. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *J. Med. Genet.* 40:e82.
244. Abernathy C.R., Colman S.D., Kousseff B.G., Wallace M.R. 1994. Two NF1 mutations: *frameshift* in the GAP-related domain, and loss of two codons toward the 3' end of the gene. *Hum. Mutat.* 3:347-352.
245. Kvam E., Nannenga B.L., Wang M.S., Jia Z., Sierks M.R., Messer A. 2009. Conformational targeting of fibrillar polyglutamine proteins in live cells escalates aggregation and cytotoxicity. *PLoS One.* 4:e5727.
246. Lovell M.A., Markesbery W.R. 2008. Oxidatively modified RNA in mild cognitive impairment. *Neurobiol. Dis.* 29:169-175.
247. Di Domenico F., Perluigi M., Butterfield D.A., Cornelius C., Calabrese V. Oxidative Damage in Rat Brain During Aging: Interplay Between Energy and Metabolic Key Target Proteins. *Neurochem. Res.* 2010 Oct 21.
248. Perluigi M., Di Domenico F., Giorgi A., Schininà M.E., Coccia R., Cini C., Cambria M.T. Redox proteomics in aging rat brain: involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J. Neurosci. Res.* 88:3498-3507.

249. Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Lentile R., Stella A.M., Butterfield D.A. 2010. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol. Biol.* 610:285-308.
250. Someya S., Yu W., Hallows W.C., Xu J., Vann J.M., Leeuwenburgh C., Tanokura M., Denu J.M., Prolla T.A. 2010. Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction. *Cell* 143:802-812.
251. Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennisi G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E. 2008. Cellular Stress Response: A Novel Target for Chemoprevention and Nutritional Neuroprotection in Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochem. Res.* 33:2444-2471.
252. Hipkiss A.R. 2009. On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. *Exp. Gerontol.* 44:237-242.
253. Hipkiss A.R. 2007. Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis.* 11:229-240.
254. Fontana M., Pinnen F., Lucente G., Pecci L. 2002. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. *Cell Mol. Life Sci.* 59:546-551.
255. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11:298-300.
256. Harman D. 2006. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1067:10-21.
257. Navarro A., Boveris A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292:C670-C686.
258. Lam P.Y., Yin F., Hamilton R.T., Boveris A., Cadenas E. 2009. Elevated neuronal nitric oxide synthase expression during ageing and mitochondrial energy production. *Free Radic. Res.* 43:431-439.
259. Butterfield D.A., Drake J., Pocernich C., Castegna A. 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* 7:548-554.
260. Smith M.A., Harris P.L., Sayre L.M., Perry G. 1997. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 94:9866-9868.

261. Smith M.A., Richey P.L., Taneda S., Kutty R.K., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G. 1994. Advanced Maillard reaction end products, free radicals, and protein oxidation in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 738:447-454.
262. Mattson M.P., Chan S.L. 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34:385-397.
263. Sullivan P.G., Brown M.R. 2005. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 29:407-410.
264. Owen J.B., Sultana R., Aluise C.D., Erickson M.A., Price T.O., Bu G., Banks W.A., Butterfield D.A. 2010. Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer disease: implications for A β accumulation in AD brain. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1798-1803.
265. Surtees R., Clelland J., Heales S. 1998. Cerebrospinal fluid concentrations of nitrate plus nitrite during the treatment of acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Leuk. Res.* 22:751-754.
266. Yatin S.M., Varadarajan S., Butterfield D.A. 2000. Vitamin E prevents Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced neuronal protein oxidation and reactive oxygen species production. *J. Alzheimers Dis.* 2:123-131.
267. Hooper D.C., Scott G.S., Zborek A., Mikheeva T., Kean R.B., Koprowski H., Spitsin S.V. 2000. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *J. FASEB* 14:691-698.
268. Yoo M.S., Chun H.S., Son J.J., De Giorgio L.A., Kim D.J., Peng C., Son J.H. 2003. Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110:76-84.
269. Poon H.F., Farr S.A., Banks W.A., Pierce W.M., Klein J.B., Morley J.E., Butterfield D.A. 2005. Proteomic identification of less oxidized brain proteins in aged senescence-accelerated mice following administration of antisense oligonucleotide directed at the Abeta region of amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 138:8-16.
270. Takumida M., Akagi N., Anniko M. 2009. Effect of inner ear blood flow changes in Meniere's model mice. *Acta Otolaryngol.* 129:244-253.
271. Suslu N., Yilmaz T., Gursel B. 2009. Utility of immunologic parameters in the evaluation of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol.* 129:1160-1165.
272. Gibson WP. 2010. Hypothetical mechanism for vertigo in Meniere's disease. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 43:1019-1027.

273. Shulman A., Strashun A.M. 2009. Fluid dynamics vascular theory of brain and inner-ear function in traumatic brain injury: a translational hypothesis for diagnosis and treatment. *Int. Tinnitus J.* 15:119-129.
274. Fushiki H., Junicho M., Kanazawa Y., Aso S., Watanabe Y. 2010. Prognosis of sudden low-tone loss other than acute low-tone sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 130:559-564.
275. Trott A., West J.D., Klaić L., Westerheide S.D., Silverman R.B., Morimoto R.I., Morano K.A. 2008. Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. *Mol. Biol. Cell* 19:1104-1112.
276. Morimoto R.I. 2006. Stress, aging and neurodegenerative disease. *N. Engl. J. Med.* 355:2254-2255.
277. Clerici W.J., Hensley K., DiMartino D.L., Butterfield D.A. 1996. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res.* 98:116-124.
278. Prasad R., Kawaguchi S. 2010. A nucleus-based quality control mechanism for cytosolic proteins. *Mol. Biol. Cell* 21:2117-2127.
279. Sultana R., Perluigi M., Newman S.F., Pierce W.M., Cini C., Coccia R., Butterfield D.A. 2010. Redox proteomic analysis of carbonylated brain proteins in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 12:327-336.
280. Brosius S. 2010. A history of von Recklinghausen's NF1. *J. Hist. Neurosci.* 19:333-348.
281. Staser K., Yang F.C., Clapp D.W. 2010. Plexiform neurofibroma genesis: questions of Nf1 gene dose and hyperactive mast cells. *Curr. Opin. Hematol.* 17:287-293.
282. Cohen R., Shuper A. 2010. Developmental manifestation in children with neurofibromatosis type 1. *Harefuah.* 149:49-52, 61.
283. Gilboa Y., Josman N., Fattal-Valevski A., Toledano-Alhadeif H., Rosenblum S. 2010. The handwriting performance of children with NF1. *Res. Dev. Disabil.* 31:929-935.
284. Pemov A., Park C., Reilly K.M., Stewart D.R. 2010. Evidence of perturbations of cell cycle and DNA repair pathways as a consequence of human and murine NF1-haploinsufficiency. *BMC Genomics* Mar 22;11:194.
285. Sabbagh A., Pasmant E., Laurendeau I., Parfait B., Barbarot S., Guillot B., Combemale P., Ferkal S., Vidaud M., Aubourg P., Vidaud D., Wolkenstein P. Members

- of the NF France Network. 2009. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum. Mol. Genet.* 18:2768-2778.
- 286.** Mattocks C., Baralle D., Tarpey P., French-Constant C., Bobrow M., Whittaker J. 2004. Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain. *J. Med. Genet.* 41:e48.
- 287.** Castle B., Baser M.E., Huson S.M., Cooper D.N., Upadhyaya M. 2003. Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. *J. Med. Genet.* 40:e109.
- 288.** Upadhyaya M., Huson S.M., Davies M., Thomas N., Chuzhanova N., Giovannini S., Evans D.G., Howard E., Kerr B., Griffiths S. et al. 2007. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* 80:140-151.
- 289.** Pasmant E., Vidaud D., Harrison M., Upadhyaya M. Different sized somatic NF1 locus rearrangements in neurofibromatosis 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *J. Neurooncol.* 2010. Aug 5.
- 290.** Lee da Y., Yeh T.H., Emmett R.J., White C.R., Gutmann DH. 2010. Neurofibromatosis-1 regulates neuroglial progenitor proliferation and glial differentiation in a brain region-specific manner. *Genes Dev.* 24:2317-2329.
- 291.** Han M., Criado E. 2005. Renal artery stenosis and aneurysms associated with neurofibromatosis. *J. Vasc. Surg.* 41:539-543.
- 292.** Shilyansky C., Lee Y.S., Silva A.J. 2010. Molecular and cellular mechanisms of learning disabilities: a focus on NF1. *Annu. Rev. Neurosci.* 33:221-243.
- 293.** Alwan S., Armstrong L., Joe H., Birch P.H., Szudek J., Friedman J.M. 2007. Associations of osseous abnormalities in Neurofibromatosis 1. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A:1326-1333.
- 294.** Upadhyaya M., Osborn M., Cooper D.N. 2003. Detection of NF1 mutations utilizing the protein truncation test (PTT). *Methods Mol. Biol.* 217:315-27.
- 295.** Mensink K.A., Ketterling R.P., Flynn H.C., Knudson R.A., Lindor N.M., Heese B.A., Spinner R.J., Babovic-Vuksanovic D. 2006. Connective tissue dysplasia in five new patients with NF1 microdeletions: further expansion of phenotype and review of the literature. *J. Med. Genet.* 43:e8.
- 296.** Pros E., Fernández-Rodríguez J., Canet B., Benito L., Sánchez A., Benavides A., Ramos F.J., López-Ariztegui M.A., Capellá G., Blanco I., Serra E., Lázaro C. 2009.

- Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum. Mutat.* 30:454-462.
- 297.** Lane K.A., Anninger W.V., Katowitz J.A. 2010. Expanding the phenotype of a neurofibromatosis type 1-like syndrome: a patient with SPRED1 mutation and orbital manifestations: retraction. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* 26:145.
- 298.** Stevenson D., Viskochil D., Mao R., Muram-Zborovski T. Legius Syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. 2010 Oct 14.
- 299.** Muram-Zborovski T.M., Stevenson D.A., Viskochil D.H., Dries D.C., Wilson A.R., Rong Mao. 2010. SPRED 1 mutations in a neurofibromatosis clinic. *J. Child Neurol.* 25:1203-1209.
- 300.** Spurlock G., Bennett E., Chuzhanova N., Thomas N., Jim H.P., Side L., Davies S., Haan E., Kerr B., Huson S.M., Upadhyaya M. 2009. SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. *J. Med. Genet.* 46:431-437.
- 301.** Hegedus B., Banerjee D., Yeh T.H., Rothermich S., Perry A., Rubin J.B., Garbow J.R., Gutmann D.H. 2008. Preclinical cancer therapy in a mouse model of neurofibromatosis-1 optic glioma. *Cancer Res.* 68:1520-1528.