



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Sezione di Patologia Generale

Dottorato di Ricerca in

MEDICINA SPERIMENTALE

Curriculum: Patologia molecolare e cellulare di malattie correlate
all'invecchiamento

XXXI CICLO

**“Ruolo di eme ossigenasi-1 nell'adattamento allo stress
ossidativo”**

Candidato: Dott. Lorenzo Brondolo

Coordinatore: Prof. Giambattista Bonanno

Tutore: Dott.ssa Mariapaola Nitti

Anno accademico 2017/2018

INDICE

Capitolo I. Introduzione	4
1.1 Equilibrio redox cellulare e stress ossidativo.....	5
1.1.1 <i>Meccanismi di adattamento dei neuroni allo stress ossidativo</i>	7
1.2 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) e geni target	8
1.3 Eme Ossigenasi-1 (HO-1)	12
1.3.1 <i>Ruolo protettivo di HO-1 nelle cellule nervose</i>	14
1.3.2 <i>HO-1 nella neurodegenerazione</i>	16
1.3.3 <i>HO-1 nei tumori cerebrali</i>	18
1.4 BTB domain and CNC homolog 1 (Bach1).....	20
1.5 Ruolo dei micro-RNA nella regolazione del signalling Nrf2/HO-1 e nella sopravvivenza neuronale.....	22
Capitolo II. Scopo della tesi	24
Capitolo III. Materiali e Metodi	26
3.1 Colture cellulari, differenziamento e trattamenti	27
3.2 Vitalità cellulare	28
3.3 Silenziamento di HO-1	29
3.4 Estrazione dell' RNA totale.....	30
3.5 Trascrizione inversa e Reazione a Catena della Polimerasi semiquantitativa (RT-PCR).....	31
3.5.1 <i>Real Time quantitative PCR (RT-qPCR)</i>	32
3.6 Estrazione delle proteine totali	33
3.7 Estrazione delle proteine frazionate.....	33
3.8 Dosaggio delle proteine.....	34
3.9 Western Blotting	35
3.10 Immunoprecitazione.....	37
3.11 Saggio di immunoprecitazione della cromatina (ChIP)	38
3.12 Immunofluorescenza	40
3.13 Trasfezione con l'inibitore specifico del microRNA-494, trattamenti e analisi dei ROS.....	41
Capitolo IV. Risultati	42
4.1 Il differenziamento riduce la capacità di indurre HO-1 e incrementa la sensibilità allo stress ossidativo in cellule di neuroblastoma della linea SH-SY5Y	43
4.1.1 <i>Effetti del differenziamento indotto da acido retinoico</i>	43

4.1.2	<i>Il differenziamento aumenta la sensibilità delle cellule allo stress ossidativo.</i>	44
4.1.3	<i>Il differenziamento non cambia i livelli di espressione di GCLM e GCLC</i>	46
4.1.4	<i>Il differenziamento diminuisce la up-regolazione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo.</i>	47
4.1.5	<i>L'induzione di HO-1 garantisce la sopravvivenza delle cellule indifferenziate allo stress ossidativo</i>	49
4.1.6	<i>La supplementazione con bilirubina protegge la cellula differenziata dalla tossicità di H₂O₂</i>	50
4.1.7	<i>L'esposizione a H₂O₂ riduce i livelli di espressione di Keap1</i>	51
4.1.8	<i>Il differenziamento non altera la traslocazione nucleare di Nrf2 ma ne modifica significativamente la capacità di legame al DNA in risposta allo stress ossidativo.</i>	52
4.1.9	<i>Il differenziamento modifica la risposta di Bach1 allo stress ossidativo</i>	54
4.2	<i>Il micro RNA 494 favorisce l'induzione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo</i>	57
4.2.1	<i>Il differenziamento riduce i livelli di miR-494 in cellule SH-SY5Y</i>	57
4.2.2	<i>Il differenziamento riduce i livelli di miR-494 anche nella linea SK-N-BE(2C)</i>	57
4.2.3	<i>L'inibizione di miR-494 aumenta la sensibilità delle cellule allo stress ossidativo</i>	60
4.2.4	<i>L'inibizione di miR-494 incrementa i livelli di ROS e limita l'induzione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo</i>	63
Capitolo V. Discussione		67
Capitolo VI. Conclusione		73
Bibliografia		75

CAPITOLO I

Introduzione

1.1 Equilibrio redox cellulare e stress ossidativo

L'utilizzo dell'ossigeno per compiere le reazioni metaboliche è vantaggioso dal punto di vista energetico ma espone cellule e tessuti al potenziale danno da parte delle specie reattive dell'ossigeno, dall'acronimo inglese ROS (Reactive Oxygen Species). Infatti, la riduzione dell'ossigeno determina inevitabilmente la generazione di molecole instabili e reattive, potenzialmente dannose, denominate, appunto, ROS, tra cui anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), radicale idrossile (HO^{\cdot}) e perossido di idrogeno (H_2O_2). Molti sono i sistemi enzimatici in grado di generare ROS come prodotti secondari di reazione, in primis la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale e gli enzimi deputati alla detossificazione presenti nel reticolo endoplasmatico liscio. Sistemi come NADPH ossidasi, invece, generano ROS (anione superossido e derivati) come prodotto principale di reazione, e svolgono un ruolo cruciale non solo nella generazione di specie tossiche necessarie per completare la fagocitosi in cellule deputate, ma sono anche importanti nella regolazione redox di molti processi fisiologici cellulari. Ovviamente, la generazione di ROS è indotta anche da una pletera di stimoli esogeni di natura fisica (radiazioni) o chimica (sostanze tossiche, farmaci) e amplificata durante la reazione infiammatoria. I ROS sono in grado di danneggiare DNA, proteine, lipidi e la loro fisiologica produzione deve essere bilanciata dalla presenza di difese antiossidanti in modo da garantire la sopravvivenza della cellula. I sistemi di difesa si compongono di meccanismi enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, perossidasi ecc) e non enzimatici (glutazione, vitamine A, E, C).

Inoltre, una più fine regolazione dell'equilibrio redox è garantita dall'attivazione di specifiche vie di segnale "redox-sensibili". Diverse proteine chinasi quali AKT, PKC, MAP chinasi (MAPK) e Jun chinasi (JNK) regolano l'attivazione di fattori di trascrizione redox-sensibili come Nrf2, NFκB e AP-1 (Zhang et al., 2015). In questa condizione si possono osservare diverse risposte cellulari come la proliferazione, il differenziamento ma anche l'attivazione dei meccanismi di apoptosi. Al contrario, quando la produzione di ROS supera la capacità detossificante degli enzimi antiossidanti, la cellula va incontro ad una condizione nota come "stress ossidativo" (Fig.1). La perdita dell'equilibrio redox si riscontra in diverse condizioni fisiopatologiche (Ursini et al., 2016) (Pham-Huy et al., 2008) (Holmström and Finkel, 2014) ed ha molteplici effetti. Si riscontrano danni irreversibili a varie componenti cellulari come una marcata denaturazione delle proteine, mutazioni al DNA e la perossidazione dei lipidi di membrana. Come conseguenza, lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi di diverse malattie correlate

all'invecchiamento quali patologie cardiovascolari, neurodegenerative, cataratta, diabete e cancro (Jacob et al., 2013) (Butterfield et al., 2012a).

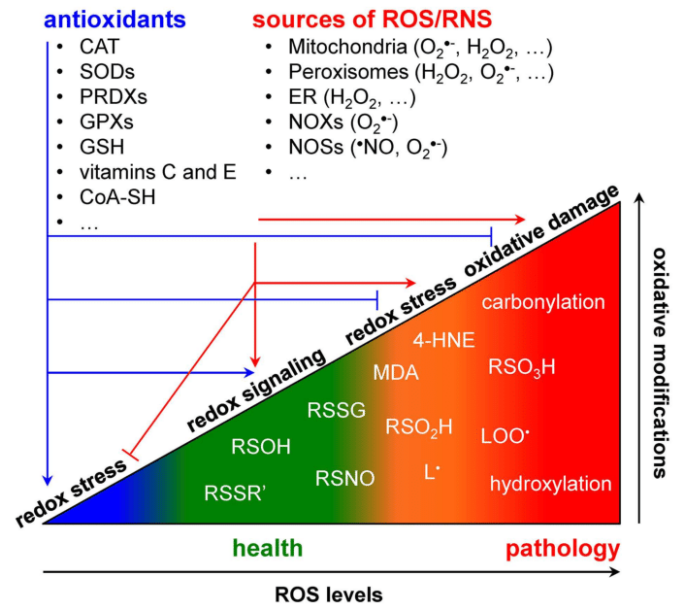


Fig.1. Fattori coinvolti nell'omeostasi redox e nel danno ossidativo

1.1.1 Meccanismi di adattamento dei neuroni allo stress ossidativo

Nonostante i neuroni non siano cellule in grado di rigenerarsi, il cervello umano rimane intatto, dal punto di vista strutturale e funzionale, per diverse decadi. Questo riflette la capacità di omeostasi di cui il tessuto nervoso è dotato; infatti, sia i neuroni che le cellule gliali possiedono meccanismi di adattamento utili a contrastare le perturbazioni dell'ambiente circostante come l'aumento di ROS, in modo da garantire il mantenimento dell'integrità e la funzionalità cellulare (Dringen et al., 2005).

Tuttavia è risaputo che i neuroni possiedono una limitata capacità di risposta allo stress ossidativo, infatti esprimono bassi livelli di catalasi e hanno un modesto contenuto di GSH, questo è dovuto in gran parte alla scarsa attivazione di Nrf2 (Bell et al., 2015). Inoltre, l'elevata attività metabolica di cui sono dotati e l'attività sinaptica richiedono un notevole consumo di ATP (Herrero-Mendez et al., 2009), determinando inevitabilmente la generazione di una notevole quota di ROS (Poyton et al., 2009) (Murphy, 2009). Tuttavia, i mitocondri non risultano essere l'unica sorgente di ROS. Infatti, nel metabolismo neuronale un ruolo chiave è svolto anche dall'enzima NADPH ossidasi, coinvolto nella modulazione di alcuni fattori di trascrizione (Hongpaisan et al., 2003) o nell'allungamento dei neuriti (Nitti et al., 2010). Risulta chiaro che l'elevata attività metabolica neuronale richiede la presenza di meccanismi di adattamento allo stress ossidativo. È risaputo che buona parte delle difese antiossidanti neuronali deriva dalle cellule circostanti, in particolare dagli astrociti (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Questi ultimi, possiedono un'elevata capacità di produrre e immagazzinare GSH per poi rilasciarlo nel mezzo extracellulare, da dove gli amminoacidi di cui è composto vengono internalizzati dai neuroni e utilizzati per sintetizzare nuovo GSH (Vargas and Johnson, 2009) (Dringen et al., 1999). Quindi, gli astrociti giocano un ruolo chiave nel garantire il supporto antiossidante ai neuroni adiacenti in termini di amminoacidi utili alla sintesi del GSH. Tuttavia, questa, come altre risposte antiossidanti non possono prescindere dall'attivazione di Nrf2 e dalla sintesi dei suoi geni target, che nei neuroni risultano quindi cruciali (Baxter et al., 2015) (Hall et al., 2012) (Hasel et al., 2015).

1.2 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) e geni target

Nrf2 è un fattore di trascrizione fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi redox cellulare. E' una proteina costituita da 589 amminoacidi e quindi con un peso molecolare predittivo di 66,1 kDa. La presenza di open reading frame determina un peso molecolare compreso tra 95-100 kDa (Lau et al., 2013). Nrf2 appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione caratterizzati dalla presenza di una sequenza *Cap'n'Collar* (CNC), costituita da circa 43 amminoacidi e contenente un dominio a cerniere di leucina (bZIP) (Moi et al., 1994).

La struttura di Nrf2 è costituita da 7 domini funzionali (Fig.2) (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014) (Jaramillo and Zhang, 2013):

- Neh1: dimerizza con le piccole proteine Maf (small Maf proteins, sMaf) consentendo a Nrf2 di legarsi a specifiche sequenze di risposta antiossidante (Antioxidant Response Elements, ARE) (Hirotsu et al., 2012) .
- Neh2: è il dominio di legame con la proteina *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) che rappresenta il principale regolatore dell'espressione di Nrf2 (Tong et al., 2006).
- Neh3: situato nella regione C-terminale, è un dominio di transattivazione in grado di legare *chromo-ATPase/helicase DNA binding protein family* (CHD6) (Hayes and McMahon, 2009).
- Neh4 e Neh5: anche essi sono domini di transattivazione coinvolti nel reclutamento di proteine quali *cAMP response element binding protein* (CREB) e *cAMP binding protein* (CBP) (Kim et al., 2013).
- Neh6: media la degradazione di Nrf2 indipendente da Keap1 mediante il reclutamento della proteina dimerica *β -transducin repeat-containing-protein* (β -TrcP) (Rada et al., 2011)
- Neh7: media l'interazione con il *retinoid X receptor α* (RXR α) che rappresenta un repressore di Nrf2 (Wang et al., 2013)

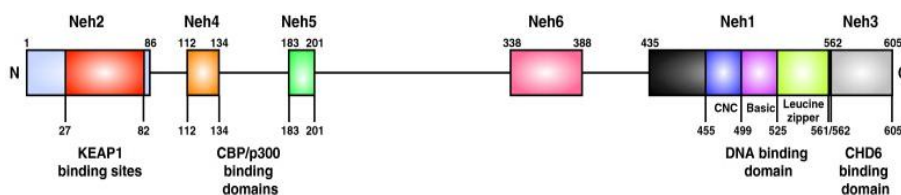


Fig.2. Struttura di Nrf2

In condizioni basali, Nrf2 è mantenuto nel citoplasma da Keap1 che rappresenta il suo principale regolatore negativo. Keap1 fa parte di un complesso enzimatico chiamato Cullin3 (Cul3) che promuove la costante degradazione di Nrf2 mediante la via ubiquitina-proteasoma. Il rapido turn-over di Nrf2 (circa 20-30 minuti) fa sì che in condizioni basali i suoi geni target non vengano trascritti.

In presenza di stress ossidativo o elettrofilo, mentre Keap1 subisce modificazioni su specifici residui di cisteina, si ha l'inibizione del complesso Cul3 che porta al rilascio di Nrf2. Nrf2 libero può traslocare all'interno del nucleo, dove, mediante la formazione di un eterodimero con le proteine sMaf riesce a legare le sequenze ARE presenti sul DNA, attivando la trascrizione dei suoi geni target (Fig.3) (Rushmore et al., 1991).

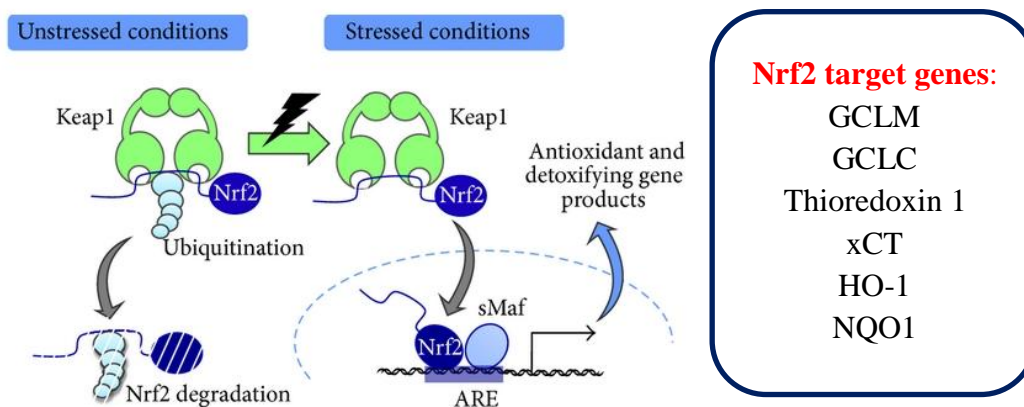


Fig.3 Schema della localizzazione di Nrf2 a livello basale e della sua traslocazione nucleare in risposta allo stress ossidativo che porta alla trascrizione dei suoi geni target

L'interazione con le proteine sMaf risulta essere necessaria per il legame di Nrf2 al DNA (Tebay et al., 2015) (Otsuki et al., 2016). Altri regolatori negativi di Nrf2 sono CRIF1, una proteina mitocondriale in grado di legarsi e degradare Nrf2 in modo redox-indipendente (Kang et al., 2010) e SIAH2, un regolatore della risposta ipossica che in condizioni di ipossia interagisce con Nrf2 portandone alla degradazione (Baba et al., 2013).

Tra i regolatori positivi di Nrf2 invece, notevole importanza ha BRCA1, che promuove la trascrizione di Nrf2 sia direttamente che indirettamente mediante il reclutamento di altri fattori come CEBP (Gorrini et al., 2013); molecole come sequestosome 1 (SQSTM1), invece, sono in grado di attivare indirettamente Nrf2 prevenendo il suo legame con di Keap1 (Komatsu et al., 2010).

L'attività di Nrf2 è anche regolata da modificazioni post-trascrizionali. È stato osservato che la fosforilazione di Nrf2 è necessaria per la sua traslocazione nucleare e per l'induzione dei suoi geni target (Bryan et al., 2013). La fosforilazione di Nrf2 vede il coinvolgimento di vie di segnale redox-sensibili come PKC δ e PI3K (Jaiswal, 2004). Controverso sembra essere invece il ruolo di ERK1/2; diversi studi affermano che ERK1/2 stabilizzerebbero l'attività di Nrf2 (Wang et al., 2015); tuttavia, è stato anche osservato come l'inibizione di ERK1/2 non influenzi l'attivazione di Nrf2 (Bloom and Jaiswal, 2003). Questi risultati contrastanti sarebbero riconducibili a differenze tra i vari tipi cellulari e tra i diversi tipi di stress a cui le cellule venivano sottoposte (Zhang and Forman, 2009). Inoltre, è stato ipotizzato che la fosforilazione di Nrf2 operata dall'asse PI3K/AKT-GSK-3 β -Fyn sia importante nella regolazione dell'esporto nucleare di Nrf2 e nella sua degradazione citoplasmatica (Zhou et al., 2015). Nrf2 va incontro anche ad altre modifiche post-trascrizionali come la sumoilazione. Sono stati evidenziati potenziali siti di legame per SUMO1 in cellule stellate epatiche di ratto ed è stato dimostrato che l'interazione di Nrf2 con SUMO1 è necessaria per la dimerizzazione di Nrf2 con le sMaf e quindi per l'induzione dei suoi geni target (Tomasi et al., 2014). Al contrario, SUMO2-3 non sembrerebbero essere coinvolte nella regolazione di Nrf2 (Malloy et al., 2013). Infine, è stato anche riportato il ruolo di diversi enzimi quali l'istone acetil-transferasi (HAT) p300, CREB-binding protein (CBP) e l'istone acetil transferasi MOF nell'acetilazione di vari residui lisinici di Nrf2. E' stato dimostrato che questo favorisce l'attivazione di Nrf2 e la sua traslocazione nucleare (Kato et al., 2001) (Sun et al., 2009) (Li et al., 2002).

Nrf2 trascrive una vasta gamma di geni con funzione antiossidante e detossificante; in più, recentemente è stato scoperto che diverse molecole con attività anti-infiammatoria e coinvolte nel metabolismo sono regolate da Nrf2.

Sulla base della loro funzione cellulare i geni target di Nrf2 possono essere suddivisi in 5 gruppi (Menegon et al., 2016) (Paladino et al., 2018).

- Gruppo 1: a questo gruppo appartengono enzimi implicati nella sintesi e nella rigenerazione del glutatione. Tra questi di notevole importanza sono le sub-unità modulatore (GCLM) e catalitica (GCLC) della γ -glutamylcisteina sintetasi, la perossiredoxina (Prx) e gli enzimi che producono NADPH (McBean et al., 2015).
- Gruppo 2: include diversi enzimi con attività detossificante verso sostanze come xenobiotici, farmaci e aldeidi tra cui NAD(P)H chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1),

glutathione S-transferasi (GST) e il trasportatore per la cisteina x-CT (Higgins and Hayes, 2011).

- Gruppo 3: comprende gli enzimi implicati nel metabolismo dei gruppi eme come HO-1 e ferrochetalasi, che prevengono l'accumulo ferro libero e metallotioneine
- Gruppo 4: di questo gruppo fanno parte gli enzimi che controllano la corretta degradazione delle proteine come SQSTM1.
- Gruppo 5: comprende vari enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico e nell'omeostasi del glicogeno come l'enzima ramificante il glicogeno (GBE).

Infine, alcune citochine pro-infiammatorie come IL-6 e IL-1 β , che sono state recentemente correlate all'attività di Nrf2 (Uruno et al., 2016).

1.3 Eme Ossigenasi-1 (HO-1)

Tra i vari enzimi coinvolti nella risposta antiossidante notevole importanza ha eme ossigenasi-1 (HO-1). Il gene HO-1 (HMOX1) è localizzato sul cromosoma 22q12 e codifica una proteina costituita da 728 amminoacidi e con un peso molecolare di 32-36 kDa. HMOX1 presenta diversi siti di legame per vari fattori di trascrizione tra cui NF- κ B, HIF1, AP1, AP2 e Nrf2, che rappresenta il suo principale attivatore a livello del SNC. Mediante l'attivazione di molteplici vie di segnale, HO-1 è in grado di rispondere a una vasta gamma di stimoli quali ROS, radiazioni, fattori di crescita, citochine infiammatorie (Maines, 1988) (Piras et al., 2017). Substrato dell'attività di HO-1 sono i gruppi eme che derivano dal catabolismo cellulare e vengono convertiti in monossido di carbonio (CO), biliverdina e Fe^{2+} libero. Il CO presenta proprietà anti-apoptotiche e anti-infiammatorie (Loboda et al., 2015) (Motterlini et al., 2012), la biliverdina viene convertita dall'enzima biliverdina reductasi (BVR) in bilirubina, che è in grado di limitare la produzione di ROS prevenendo la perossidazione di lipidi e proteine ed esercitando quindi un elevato potere antiossidante (Stocker et al., 1987), anti-infiammatorio (Loboda et al., 2016) e anti-apoptotico. Il ferro libero (Fe^{2+}), è progressivamente legato dalla ferritina che è sintetizzata in parallelo all'induzione di HO-1; inoltre, l'attivazione della Fe-ATPase permette l'efflusso citosolico del Fe^{2+} , contribuendo alla riduzione del contenuto intracellulare di Fe^{2+} e prevenendo il danno ossidativo indotto dalla reazione di Fenton (Fig.4) (Balla et al., 1992) (Watts et al., 2003).

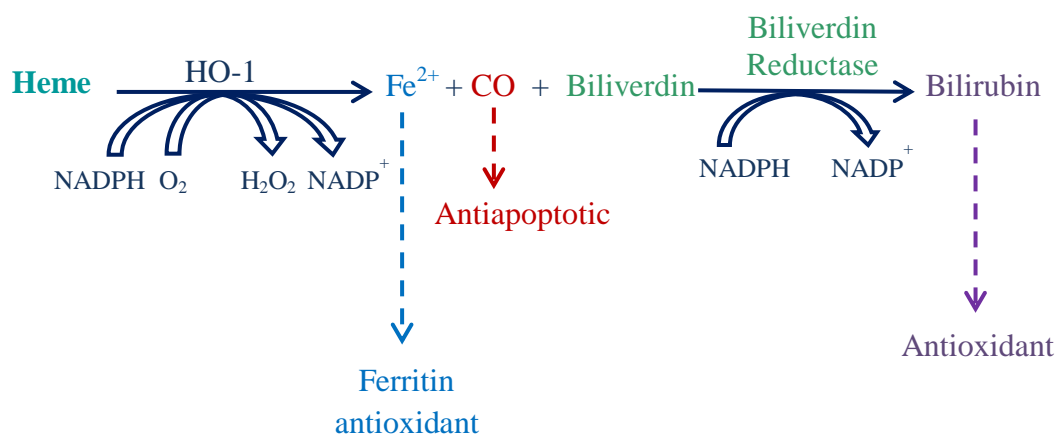


Fig.4. Schema della funzione cellulare di HO-1. Degradazione di Eme in Fe^{2+} , CO e Biliverdina che viene ridotta in Bilirubina dall'enzima Biliverdina Reduttasi

HO-1 rappresenta l'isoforma inducibile di HO; nel cervello, i livelli di espressione di HO-1 sono bassi e circoscritti a piccoli gruppi di neuroni e cellule gliali (Barañano and Snyder, 2001). Al contrario, il mRNA di HO-1 è presente ad alti livelli nella corteccia e nell'ippocampo indicando la presenza di una riserva cellulare di trascritto primario di HO-1 pronto ad essere tradotto in proteina (Calabrese et al., 2002) (Scapagnini et al., 2002).

HO-2 rappresenta invece l'isoforma costitutiva di HO e risulta essere espressa prevalentemente a livello cerebrale. E' stato dimostrato che la maggior parte della bilirubina endogena prodotta dall'attivazione di HO è riconducibile a HO-2 e che il CO prodotto da HO-2 avrebbe un ruolo molto simile a quello dell'ossido nitrico nella cellula nervosa (Chen et al., 2003).

Tuttavia, HO-2 non risponde modificazioni dello stato redox e allo stress ossidativo e quindi il ruolo di HO-1 nella risposta adattativa neuronale resta cruciale e ancora largamente sconosciuto.

1.3.1 Ruolo protettivo di HO-1 nelle cellule nervose

Negli ultimi anni, il coinvolgimento di HO-1 nella sopravvivenza delle cellule neuronali è stato ampiamente studiato sotto vari aspetti. Sono state caratterizzate le principali vie di segnale che portano all'attivazione di Nrf2 e inducono trascrizione di HO-1. Sia JNK (Kim et al., 2017) che ERK1/2 sono coinvolte nella up-regolazione dell'asse Nrf2/HO-1. ERK1/2, in particolare, attraverso questa via, svolge un ruolo importante nel favorire il differenziamento neuronale indotto dal fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) favorendo l'allungamento dei neuriti e alla crescita degli assoni (Miloso et al., 2004). Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento di cellule di feocromocitoma murino con molecole di origine vegetale attiva non solo il pathway di ERK1/2 ma anche quello di AKT/PI3K; anche quest'ultimo sembra favorire la traslocazione nucleare di Nrf2 e la trascrizione di HO-1, il cui aumento è anche in grado di potenziare l'effetto neurogenico del fattore di crescita neurale (NGF) (Zhao et al., 2015).

Un altro aspetto approfondito da diversi autori riguarda il ruolo protettivo dei prodotti di reazione di HO-1. Sia in colture di cellule neuronali che in colture di cellule gliali, la bilirubina endogena prodotta da HO-1 regola la fosforilazione di ERK1/2 e AKT generando un meccanismo a feed-back positivo che favorisce a sua volta la up-regolazione di HO-1, oltre che il rilascio di BDNF dalle cellule neuronali e del fattore neurotrofico derivato dalla glia (GDNF) dalle cellule gliali. Al tempo stesso, è stato osservato che il trattamento delle cellule gliali con un donatore di CO aumenta il rilascio di BDNF e GDNF mediante l'attivazione di un'altra via di segnale, quella di sGC-PKG (Hung et al., 2010), sottolineando il ruolo del CO come neuroprotettore. Il ruolo protettivo di HO-1 e dei suoi prodotti di reazione è stato osservato anche in diversi studi *in vivo*. In topi knock-out per il gene HO-1 è stato riscontrato un grave deficit nella generazione di bilirubina con un drastico aumento del tasso di morte cellulare in risposta ad agenti pro-ossidanti come l'acetato di piombo (Ye et al., 2016).

Inoltre è stato dimostrato che HO-1, mediante i suoi prodotti di reazione, è in grado di contrastare il danno ossidativo indotto dall'accumulo di aggregati proteici fibrillari coinvolti in patologie neurodegenerative come il morbo Parkinson (PD) o la malattia di Alzheimer (AD). In cellule di neuroblastoma umano M17, infatti, l'over-espressione di HO-1 sembra aumentare la degradazione al proteasoma della proteina tau attraverso la down-regolazione del pathway di ERK (Song et al., 2009) (Schipper et al., 2009). Nello

stesso modello sperimentale, è stato anche osservato come il CO e il ferro prodotti dall'attività di HO-1 siano in grado di attivare la degradazione proteasomale della α -sinucleina, il cui accumulo è comunemente associato all'insorgenza del morbo di Parkinson (Takeda et al., 2000).

1.3.2 HO-1 nella neurodegenerazione

Nonostante molti autori abbiano descritto gli effetti neuroprotettivi di HO-1, altri hanno associato la up-regolazione di HO-1 ad un danno neuronale e alla neurodegenerazione. HO-1 risulta essere over-espresso in cervelli di soggetti affetti da AD soprattutto nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale, a livello degli astrociti e delle cellule gliali, rispetto ai controlli sani (Schipper et al., 2006) (Schipper, 2004). La up-regolazione di HO-1 e il conseguente aumento dei suoi prodotti di reazione, in concomitanza con la generazione di ROS da mitocondri senescenti, l'accumulo di A β e la produzione di citochine infiammatorie sono stati collegati un notevole danno ossidativo nei tessuti colpiti da AD (Hettiarachchi et al., 2014) (Schipper et al., 2009). A sostegno di questo sono stati prodotti studi *in vitro* su astrociti di ratto trasfettati col gene HMOX1, nei quali la over-espressione di HO-1 favorisce la biogenesi di inclusioni citoplasmatiche morfologicamente e chimicamente simili a corpora amilacea (CA), ovvero aggregati di natura prevalentemente glicoproteica il cui accumulo avviene fisiologicamente durante l'invecchiamento ma risulta essere decisamente più marcato in pazienti AD (Song et al., 2014). Inoltre, in animali transgenici che over-esprimono HO-1 nel compartimento gliale, il trattamento con inibitori di nuova sintesi di HO-1 come OB-28, sarebbe in grado di attenuare i deficit comportamentali e le alterazioni neuropatologiche associate alla malattia di Alzheimer, suggerendo che HO-1 sarebbe un potenziale target farmacologico per la cura di AD (Gupta et al., 2014).

Un altro importante aspetto inerente la up-regolazione di HO-1 nella patogenesi di AD riguarda l'omeostasi del colesterolo nel compartimento gliale. Durante il normale invecchiamento cerebrale l'omeostasi del colesterolo viene mantenuta grazie al funzionamento della pompa liver-x-receptor (LXR) che garantisce l'efflusso cellulare di colesterolo e la cui attivazione è stimolata dal CO e dal Fe²⁺ prodotti di HO-1 (Hascalovici et al., 2009). In soggetti AD, invece, la sostenuta up-regolazione gliale di HO-1 stimola la biosintesi di colesterolo e la formazione di ossisteroli. Mentre nelle fasi precoci della patologia l'eccesso di colesterolo riesce ancora ad essere bilanciato dall'efflusso via LXR, nelle fasi più avanzate si riscontra un deficit nel funzionamento della pompa con il conseguente accumulo di colesterolo libero che a sua volta favorisce la deposizione di A β aggravando il quadro neurodegenerativo (Vaya and Schipper, 2007).

La up-regolazione di HO-1 è stata associata anche alla patogenesi della malattia di Parkinson. Una caratteristica istologica tipica del PD è la presenza, a livello dei neuroni

dopaminergici, di aggregati fibrillari di α -sinucleina chiamati corpi di Lewy, a livello dei quali è stata rilevata anche la presenza di HO-1. In un modello di ratto PD, è stata osservata la up-regolazione di HO-1 dipendente da NF-kB e c-Jun/AP-1 che sembra essere associata ad una drastica perdita di neuroni dopaminergici nella sostanza nigra (Tsou et al., 2015). Inoltre, l'over-espressione di HO-1 è stata associata ad un deficit nella produzione di dopamina, un aumento del rilascio di GABA, una sregolata deposizione di ferro intracellulare ed un danno alla membrana mitocondriale (Song et al., 2017). Anche nel compartimento gliale, l'over-espressione di HO-1 promuove una sregolata deposizione di ferro intracellulare nonché un deficit mitocondriale nel funzionamento della catena di trasporto degli elettroni (Song et al., 2006). Tutti questi fattori, nel loro insieme, porterebbero all'insorgenza di un fenotipo parkinsoniano.

1.3.3 HO-1 nei tumori cerebrali

Diversi lavori riportano che l'over-espressione di HO-1 a livello cerebrale è correlata alla crescita tumorale, al grado di malignità, alla capacità di metastatizzare e alla resistenza alle terapie (Nitti et al., 2017). In linee cellulari di glioma umano, è stato riscontrato che l'over-espressione di HO-1 favorisce la resistenza all'apoptosi nonché la up-regolazione dei fattori di crescita VEGF e BDNF (Morita et al., 2009). Anche nel neuroblastoma (NB), uno dei tumori più comuni dell'età infantile, l'attivazione dell'asse Nrf2/HO-1 sembra correlata ad una resistenza alle terapie. Infatti, in linee cellulari di NB umano HO-1 risulta essere over-espresso anche in presenza di agenti chemioterapici come il bortezomib (Furfaro et al., 2012) (Furfaro et al., 2014) (Furfaro et al., 2016b). L'esposizione a sostanze antiossidanti come l'acido lipoico favorisce la localizzazione nucleare di HO-1 che sembra avere un ruolo nella regolazione di vari geni implicati nella chemioresistenza (Tibullo et al., 2018). Inoltre, anche nel NB è stata osservata una correlazione tra l'over-espressione di HO-1 e l'aumento dei livelli di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-xl. Tuttavia, il trattamento con inibitori specifici di HO-1 come la zinco-protoporfirina (ZnPPIX) favorisce la up-regolazione di Bcl-2 e Bcl-xl inducendo la morte cellulare (Fest et al., 2016).

Il ruolo di HO-1 sembra quindi essere abbastanza controverso e fortemente dipendente dall'ambiente cellulare e dal contesto fisiopatologico in cui viene espresso. Infatti, HO-1, mediante la generazione dei suoi prodotti metabolici, è in grado di esercitare una fisiologica funzione protettiva verso il danno ossidativo. Tuttavia, l'over-espressione sostenuta e prolungata di HO-1, mediante la produzione sregolata dei suoi prodotti di reazione, può provocare un danno ossidativo di notevole entità a livello cellulare, aggravando il quadro patologico di alcune malattie neurodegenerative e favorendo la progressione di varie forme tumorali (Fig.5).

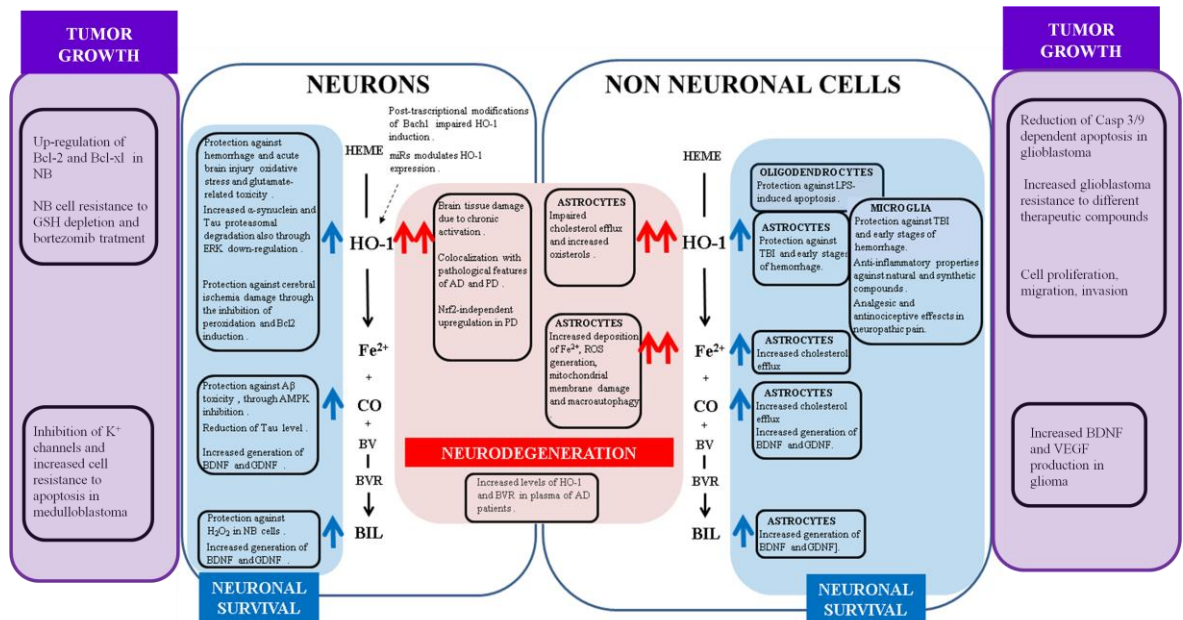


Fig.5 Rappresentazione schematica dell'attivazione di HO-1 nei neuroni, nei diversi tipi di cellule gliali e nei tumori del sistema nervoso. Le differenti risposte cellulari come la sopravvivenza piuttosto che la neurodegenerazione risultano essere strettamente correlate all'intensità con cui HO-1 viene attivato e al conseguente aumento di Fe²⁺, CO e bilirubina che si generano. Le frecce blu indicano il coinvolgimento di HO-1 e dei suoi prodotti metabolici nella sopravvivenza neuronale; le frecce rosse indicano il coinvolgimento di HO-1 e dei suoi prodotti metabolici nella neurodegenerazione; i riquadri viola indicano il ruolo svolto da HO-1 nella crescita dei tumori cerebrali. La freccia tratteggiata indica il coinvolgimento di vari micro RNA (miRs) che, agendo su differenti target molecolari, regolano l'espressione di HO-1. Schema modificato da: Heme Oxygenase-1 in the nervous system: does it favour cell survival or induce neurodegeneration? (Nitti, 2018).

1.4 BTB domain and CNC homolog 1 (Bach1)

BTB domain and CNC homolog 1 (Bach1) è una proteina costituita da 721 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 92 kDa e appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione CNC-bZip che esplica la sua attività a livello nucleare. La proteina Bach presenta due isoforme: Bach1, espressa in modo ubiquitario e Bach2 che risulta essere espressa prevalentemente nei monociti e nei neuroni (Hoshino and Igarashi, 2002). Bach1 rappresenta il principale regolatore negativo di HO-1; restando ancorato alle sequenze ARE impedisce il legame di Nrf2 e la conseguente trascrizione dei suoi geni target tra cui HO-1. Tuttavia, esiste anche un meccanismo di esporto nucleare che, in presenza di stress ossidativo, impedisce l'accumulo nucleare di Bach1 garantendo quindi l'attivazione della risposta antiossidante Nrf2-dipendente. Infatti, Bach1 contiene delle sequenze di esporto nucleare (NES) tramite le quali si lega alla proteina Crm1, responsabile del suo esporto dal nucleo al citoplasma, dove Bach1 viene degradato prevalentemente via ubiquitina-proteasoma (Kaspar and Jaiswal, 2010) (Suzuki et al., 2003). Diversi studi hanno confermato che l'esposizione ad induttori di Nrf2 come il tetraclorobenzochinone (TCBQ) oppure la fosforilazione di Bach1 in siti specifici come la tirosina 486 ne determinano il rapido esporto nucleare ed un conseguente aumento dell'espressione di HO-1 (Su et al., 2016) (Kaspar and Jaiswal, 2010). Quando i livelli di ROS non sono elevati, invece, l'esporto nucleare di Bach1 viene inibito; nel nucleo Bach1 forma degli eterodimeri con le proteine sMaf in grado di legarsi al DNA inibendo quindi la trascrizione dei geni Nrf2-dipendenti (Fig.6).

Inoltre, Bach1 possiede 4 dipeptidi cisteina-prolina che gli consentono un'interazione diretta con i gruppi eme. L'omeostasi dei gruppi eme viene mantenuta da un meccanismo a feedback; quando i livelli di eme sono elevati, l'interazione diretta con Bach1 riduce la sua capacità di legarsi al DNA, consentendo quindi la trascrizione di HO-1, il quale a sua volta può agire degradando i gruppi eme (Zhou et al., 2016) (Kaspar and Jaiswal, 2010). E' stato anche osservato che i gruppi eme sono in grado di indurre la poli-ubiquitinazione e la degradazione di Bach1 mediante l'attivazione di specifici enzimi ubiquitin-protein ligasi come HOIL-1 (Zenke-Kawasaki et al., 2007).

Negli ultimi anni è stato anche dimostrato che durante l'invecchiamento, l'espressione di Bach1 è associata alla riduzione dell'espressione di GCLC, di conseguenza, i livelli di GSH risultano ridotti (Shenvi et al., 2012). Recentemente, è stato anche dimostrato che in cellule epiteliali bronchiali umane (HBE) di persone anziane (60-69 anni), l'espressione di

GCLM, GCLC e NQO1 indotta dal trattamento con sulforafano era più bassa mentre i livelli di Bach1 erano significativamente più alti rispetto a cellule HBE di individui giovani (21-29 anni) (Zhou et al., 2018).

Queste evidenze mettono in luce il ruolo chiave svolto da Bach1 nella regolazione della risposta antiossidante in varie condizioni fisiopatologiche.

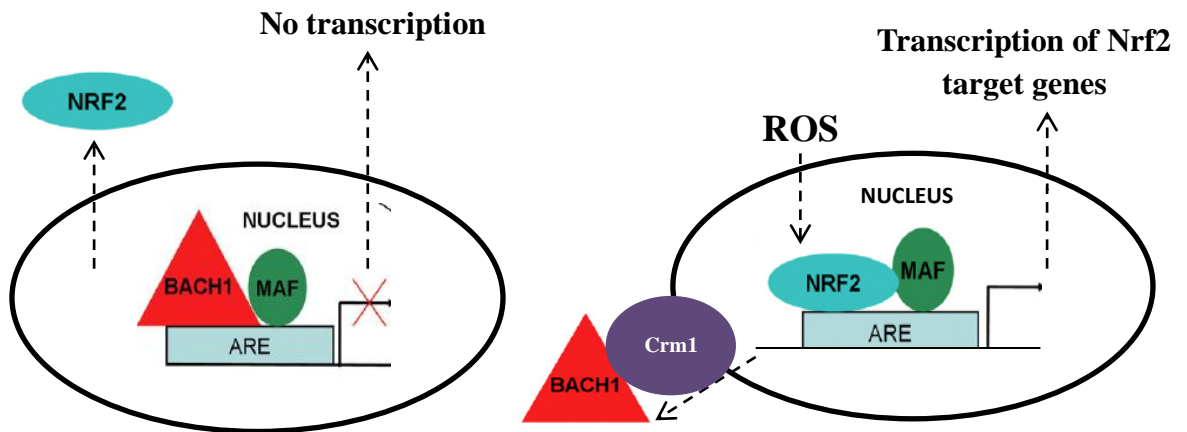


Fig.6 A livello basale Bach1 è localizzato nel nucleo dove inibisce la trascrizione dei geni target di Nrf2; in risposta all'aumento di ROS Bach1 viene esportato nel citosol mediante Crm1 e i geni target di Nrf2 vengono trascritti.

1.5 Ruolo dei micro-RNA nella regolazione del signalling Nrf2/HO-1 e nella sopravvivenza neuronale

I micro-RNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante trascritte dalla RNA polimerasi II e processate a livello nucleare. Il miRNA maturo è in grado di legarsi alla regione 3' UTR del mRNA bersaglio degradandolo o inibendo il processo di traduzione (Danka Mohammed et al., 2017). E' stato osservato come vari enzimi antiossidanti possano agire regolando la biogenesi e di alcuni miRNA. Ad esempio, il trascritto primario del miRNA (pre-miRs) nel nucleo viene clivato dalla *RNA-binding protein Di George critical region-8* (DGCR8) per essere convertito in un precursore intermedio (pre-miRs) il quale completa la sua maturazione nel citoplasma. L'attività di DGCR8 è dipendente dai livelli cellulari dei gruppi eme; di conseguenza, HO-1, il principale enzima che degrada i gruppi eme, influenzerebbe l'espressione di diversi miRNA (Lin et al., 2015).

È stato dimostrato che i miRNA giocano un ruolo cruciale nella regolazione di diversi meccanismi cellulari tra cui la generazione di ROS e il signalling di Nrf2/HO-1. Analisi molecolari, hanno confermato la presenza di ben 85 miRNA in grado di legare il mRNA di Nrf2, la maggior parte dei quali agiscono down-regolandolo (Kurinna and Werner, 2015). In cellule SH-SY5Y è stato osservato che miR-144, miR-153, miR27a e miR142-5p agiscono direttamente inibendo la traduzione di Nrf2. Un esempio di regolazione positiva di Nrf2 invece, è rappresentato da miR-200 e miR-7 che inibendo Keap1, favoriscono la traslocazione nucleare di Nrf2 e il suo legame alle sequenze ARE (Kabaria et al., 2015). Oltre alla modulazione di Nrf2, sono stati identificati diversi miRNA che agiscono direttamente sui geni Nrf2-dipendenti. Beckman e collaboratori (2011) hanno caratterizzato due miRNA, miR-217 e miR-377 in grado di legarsi a 3'UTR del gene HMOX1. La trasfezione di cellule HUVEC con miR-217 o miR-377 singolarmente e la successiva esposizione ad emina, un induttore di HO-1, non modificava significativamente i livelli di HO-1, al contrario, la combinazione dei due miRNA, riduceva i livelli di HO-1 rispetto alle cellule di controllo trattate con emina, indicando l'importanza di questi due miRNA nella regolazione di HO-1 (Beckman et al., 2011). In cellule SH-SY5Y la up-regolazione di hsa-miR-590-3p determinerebbe un aumento dei livelli di HO-1, NQO-1, GCLM e GCLC (Wang et al., 2018).

Anche Bach1 sembra essere soggetto ad una regolazione da parte di diversi miRNA. Tra questi, miR-155 avrebbe ben 4 siti di legame sulla regione 3' UTR di Bach1 e verrebbe espresso in cellule HUVEC in risposta al TNF- α , down-regolando Bach1 e promuovendo

così l'induzione di HO-1 (Pulkkinen et al., 2011). Altri miRNA coinvolti nella regolazione di Bach1 sono i miR della famiglia let-7 (Hou et al., 2012), miR-196b e miR-122 (Zhang; 2012).

Oltre ai miRNA coinvolti direttamente nella regolazione del signalling Nrf2/HO-1, diversi autori hanno approfondito il loro ruolo anche nel mantenimento dell'integrità della cellula neuronale. Minones-Moyano e collaboratori (2011), hanno evidenziato che le cellule SH-SY5Y differenziate con ATRA presentavano elevati livelli di miR-34b e miR-34c. Trasfettando le cellule con inibitori specifici di miR-34b e miR-34c, l'espressione dei due miRNA, così come la vitalità cellulare diminuivano significativamente (Miñones-Moyano et al., 2011). Anche altri autori hanno osservato che il differenziamento delle cellule SH-SY5Y indotto da ATRA determina un rilevante cambiamento nel profilo di espressione dei miRNA, constatando un aumento dei livelli di miR-193, miR-199, miR-192, miR-145, miR-28 e miR-222. Tra questi, l'induzione di miR-222, miR-192 e miR-145 sembrerebbe essere dipendente da p53, un importante regolatore della proliferazione cellulare (Jauhari et al., 2017).

Un altro miRNA in grado di modulare la stress ossidativo è miR-494, che è anche coinvolto nella regolazione della senescenza cellulare (Comegna et al., 2014) e nella espressione di DJ-1, regolatore di Nrf2 (Xiong et al., 2014). Ancora controverso sembra essere invece il suo ruolo nelle cellule tumorali; infatti, se in alcune forme tumorali miR-494 sembra funzionare come onco-soppressore, in altre sembra essere coinvolto nella progressione del cancro e nel grado di malignità (Latchana et al., 2018)

CAPITOLO II

Scopo della tesi

La capacità di adattamento allo stress ossidativo è cruciale e garantisce la sopravvivenza cellulare; in questa ottica, la up-regolazione di HO-1 sembra avere un ruolo fondamentale anche se con un meccanismo non ancora completamente chiarito. Infatti, soprattutto a livello neuronale, dove la sintesi del GSH è strettamente dipendente dalla disponibilità di precursori generati dagli astrociti, l'induzione di HO-1 può giocare un ruolo chiave per la capacità di degradare gruppi eme provenienti dal catabolismo proteico e di produrre molecole con funzione protettiva.

In precedenti lavori, utilizzando linea di neuroblastoma umano SH-SY5Y, è stato osservato come il trattamento con acido retinoico generasse una quota controllata di ROS, che risultano essere importanti per il processo di differenziamento stesso (Nitti et al., 2010). Tuttavia, altre evidenze hanno provato che le cellule differenziate risultavano essere più sensibili allo stress ossidativo indotto dall'esposizione, per esempio, a proteine glicate (Nitti et al., 2007).

Quindi, il primo obiettivo di questo lavoro è stato di analizzare la capacità di risposta antiossidante, valutando le modificazioni della via Nrf2 dipendente in cellule esposte a perossido di idrogeno, come tali o dopo il differenziamento.

Inoltre, abbiamo valutato la regolazione trascrizionale di HO-1 ad opera di Nrf2, che rappresenta il suo principale attivatore e Bach1 che sembra essere il suo principale regolatore negativo. Poiché analisi bioinformatiche hanno indicato Bach1 come un possibile target di miR-494 ne abbiamo valutato il coinvolgimento nella modulazione della capacità di adattamento delle cellule SH-SY5Y allo stress ossidativo.

CAPITOLO III

Materiali e Metodi

3.1 Colture cellulari, differenziamento e trattamenti

Le cellule di neuroblastoma umano delle linee SH-SY5Y e SK-N-BE(2C) sono mantenute in coltura in terreno RPMI 1640 (Euroclone, Milano) addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% (Euroclone), glutammina 2mM (Sigma-Aldrich, Milano), penicillina/streptomicina 1% (Sigma-Aldrich), anfotericina B 1% (Euroclone), sodio piruvato 1% (Sigma-Aldrich) e amminoacidi non essenziali 2% (Sigma-Aldrich). Le cellule sono mantenute a 37°C in atmosfera umidificata costituita dal 95% di aria e 5% di CO₂; ogni 5 giorni sono state staccate con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) e riseminate in rapporto 1:5.

Le cellule SH-SY5Y sono state differenziate nel loro terreno di crescita supplementato con acido retinoico *tutto trans* (ATRA) 10µM (Sigma-Aldrich) per 4 giorni. Per le cellule SK-N-BE(2C) il differenziamento si è protratto fino a 8 giorni.

Le cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate per 4 giorni sono state esposte a dosi crescenti di H₂O₂ (da 100 a 500µM). Alcuni campioni sono stati trattati con Bilirubina 0,5 o 1µM, tBHQ 50µM o Hemin 10µM. La durata dei trattamenti era di 3h per l'analisi dell'espressione di Nrf2 e Bach1 su estratti di proteine citosoliche e nucleari e per il saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), 6h per l'analisi del mRNA di HO-1 e a 24h per l'analisi dell'espressione di HO-1 su estratti proteici totali.

3.2 Vitalità cellulare

Il numero di cellule vitali è stato misurato mediante Trypan Blue exclusion test ed espresso in valori percentuali.

In alcuni set di esperimenti è stata anche valutata l'apoptosi analizzando l'espressione della fosfatidilserina sulla membrana tramite il test Annessina V-FICT.

Utilizzando come supporto vetrino da 8 pozzetti (Nalge Nunc International) sono state seminate 15×10^3 cellule per pozzetto; le cellule sono state poi differenziate con ATRA $10\mu\text{M}$ per 4 giorni. Dopo essere state trattate per 24h con H_2O_2 $500\mu\text{M}$ o staurosporina $100\mu\text{M}$, utilizzata come controllo positivo di apoptosi, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate al buio con Annessina V-FITC (Biovision) precedentemente diluita 1:100 nell'apposito tampone. I nuclei sono stati controcolorati con 3 ng/ml di To-Pro3 iodide (Invitrogen) per consentire la visualizzazione delle cellule. Mentre i nuclei appaiono rossi, solo le cellule in fase di apoptosi precoce mostrano degli spot verdi sulla membrana, corrispondenti alla presenza di fosfatidilserina. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio 3-channel TCS SP2 laser-scanning confocal microscope (Leica Microsystems)

3.3 Silenziamento di HO-1

Le cellule indifferenziate sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ed esposte a H₂O₂ 500µM per 2h in modo da indurre la trascrizione di HO-1. Successivamente il mRNA di HO-1 è stato silenziato mediante l'aggiunta di 120 pmoli di un pool di oligonucleotidi specifici diretti contro HO-1 (siHO-1, On-TargetPlus, SMART pool human heme oxygenase 1; Dharmacon, USA). Alcuni campioni sono stati trattati con un pool di oligonucleotidi *scramble* (siRNA NOT, On-TargetPlus siControl non targeting pool; Dharmacon) per escludere la presenza di risposte cellulari aspecifiche. Gli oligonucleotidi sono stati trasfettati utilizzando il kit Polyplus-Transfection Interferin (Euroclone) seguendo le istruzioni riportate dal produttore.

3.4 Estrazione dell' RNA totale

L'estrazione del RNA totale è stata eseguita mediante l'utilizzo di TRIZOL (Life Technologies, USA). Il TRIZOL è una soluzione di guanidina-istiocianato/fenolo in grado di inattivare completamente le nucleasi, consentendo un rapido isolamento di RNA puro e non degradato.

La procedura prevede quattro fasi principali:

- 1. omogeneizzazione**
- 2. estrazione**
- 3. precipitazione**
- 4. lavaggio del RNA**

Nella fase di omogeneizzazione le cellule vengono staccate, raccolte in eppendorf sterili e lisate mediante l'utilizzo di una siringa 25G. Il lisato ottenuto viene incubato a temperatura ambiente per 5 minuti in modo da consentire la dissociazione dei complessi nucleoproteici. Al lisato viene poi aggiunto del cloroformio in modo da generare, dopo centrifugazione, una fase organica e una fase acquosa. La fase organica inferiore contiene le proteine, la sottile interfase contiene il DNA e la fase acquosa superiore l'RNA.

La fase acquosa viene prelevata, addizionata di isopropanolo e centrifugata; in questo l'RNA precipita formando un precipitato bianco.

Il precipitato viene lavato in una soluzione di etanolo al 70%, lasciato asciugare e risospeso in acqua trattata con dietilpolicarbonato (DEPC) che degrada le RNAasi.

L'RNA così estratto è stato successivamente quantificato mediante lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260nm; una concentrazione uguale a 1 corrisponde ad una concentrazione di 40µg/mL di acido nucleico.

3.5 Trascrizione inversa e Reazione a Catena della Polimerasi semiquantitativa (RT-PCR)

L'RT-PCR è un metodo di valutazione qualitativa che prevede la retro-trascrizione del campione di RNA in cDNA e la PCR con cui è possibile amplificare il segmento genico di interesse fino a 10^9 copie. Per la RT, 500ng di RNA totale sono stati trascritti in cDNA mediante l'utilizzo dell'enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies) e in presenza di Random Hexamers Primers (Life Technologies).

Per l'amplificazione è necessaria la presenza di oligonucleotidi di sintesi (primers) complementari alle estremità 5' e 3' del segmento genico. Entrambi i primers hanno le estremità 3' orientate verso l'interno della sequenza da amplificare in modo che la sintesi avvenga lungo il frammento di DNA tra loro compreso.

La PCR utilizza la ripetizione di tre fasi che avvengono a diverse temperature.

- 1. fase di denaturazione**
- 2. fase di ibridazione**
- 3. fase di estensione**

Durante la prima fase il DNA stampo viene denaturato ad alte temperature (95-96°C).

Nella fase di ibridazione i primers riconoscono e legano i filamenti stampo a cui sono complementari ad una temperatura compresa tra i 50 e 65°C, specifica per i primers utilizzati. Durante la fase di estensione, l'enzima Taq DNA polimerasi sintetizza una catena complementare a quella di origine partendo da ciascun primer ibridato; questa fase avviene a 72°C, che risulta essere la temperatura ottimale per l'attività enzimatica della Taq polimerasi.

Il primo ciclo di reazione sintetizza frammenti di lunghezza indefinita, chiamati "prodotto lungo". Nei cicli successivi, i filamenti sintetizzati funzionano a loro volta come stampo e ibridano con i primers in modo asimmetrico rispetto al primo ciclo; di conseguenza la loro estensione terminerà all'altra estremità del filamento originando il "prodotto corto" corrispondente al segmento di DNA che si vuole amplificare.

La ripetizione dei cicli di denaturazione, ibridazione ed estensione consente di ottenere un'amplificazione esponenziale della sequenza di DNA bersaglio originariamente presente nel campione. La ripetizione di 20 cicli di PCR genera circa un milione di copie della sequenza bersaglio.

Per l'amplificazione del cDNA di cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate sono stati utilizzati la PCR-Master Mix (Taq DNA polimerasi Invitrogen, USA) e i primers specifici per MAP2, NeuroD1, GCLM e GCLC. La gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata utilizzata come gene house-keeping per normalizzare i risultati. L'analisi di MAP2 è stata effettuata con lo stesso protocollo anche sulla linea SK-N-BE(2C). I prodotti ottenuti dalla reazione di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% addizionato con bromuro di etidio. Al termine della corsa elettroforetica le bande sono state visualizzate al transilluminatore UV e quantificate mediante analisi densitometrica utilizzando un software specifico (GelDoc; Bio-Rad, Milano, Italia)

	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 3'-5'
MAP2	tca gag gca atg acc tta cc	gtg gta ggc tct tgg tct tt
NeuroD1	ccc ttc ctt tga tgg acc cc	aaa tgg tga acct gg cgt gc
GCLM	cca gat gtc ttg gaa tgc	tgc agt caa atc tgg tgg
GCLC	atg gag gtg caa tta aca gac	act gca ttg cca cct ttg ca

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati per MAP2, NeuroD1, GCLM e GCLC

3.5.1 Real Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Per l'analisi dei livelli di miR-494 e miR-128 su cellule SH-SY5Y e SK-N-BE(2C) indifferenziate e differenziate per 4 giorni, 10 ng di RNA sono stati trascritti in cDNA mediante l'utilizzo di TaqMan™ Advanced miR cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) seguendo le istruzioni riportate dal fornitore. La Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) per l'analisi dei livelli di hsa-miR-494, hsa-miR-128, hsa-miR-425-5p e hsa-let7g-5p è stata eseguita in triplicato su campioni di cDNA diluiti 1:10 utilizzando TaqMan® Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific). I livelli di espressione di hsa-miR-425-5p and hsa-let7g-5p sono stati utilizzati come controllo endogeno. La quantificazione è stata eseguita utilizzando il metodo $\Delta\Delta C_t$.

Queste analisi sono state svolte presso il Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie dell' "Università Federico II" di Napoli con cui abbiamo collaborato.

3.6 Estrazione delle proteine totali

Per ottenere un estratto proteico totale, al termine dei trattamenti, le cellule sono state staccate, raccolte e lisate in RIPA Buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Sodio Deossicolato 1%, SDS 0,1%, Igepal-CA630 1%) a pH 7.4 e con l'aggiunta di inibitori delle proteasi ed inibitori delle fosfatasi. I campioni sono stati sonicati, tenuti 20 minuti in ghiaccio e centrifugati a 14.000 x g per 15 minuti. Il sopranatante, contenente l'estratto proteico totale, è stato separato dal precipitato e le proteine sono state dosate con BCA test.

3.7 Estrazione delle proteine frazionate

Per ottenere frazioni citosoliche e nucleari, al termine del trattamento, le cellule sono state staccate, raccolte e lisate con Buffer A (Hepes 10mM, EDTA sale disodico 0,1M, MgCl₂·6H₂O 2mM, KCl 15mM, DTT 1mM) a pH 7.6 in presenza di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi. I campioni, tenuti in ghiaccio per 20 minuti, sono stati addizionati con NONIDET 10% e lasciati in agitazione a 4°C per 15 minuti. Successivamente sono stati centrifugati a 13.000 x g per 3 minuti a 4°C; il sopranatante ottenuto rappresenta la frazione citosolica che è stata separata dal precipitato. Quest'ultimo, dopo un lavaggio in Buffer A, è stato risospeso in Buffer B (Hepes 10mM, EDTA sale disodico 0,1M, KCl 50 mM, NaCl 300mM, glicerolo 10%, DTT 1mM) a pH 7.6 in presenza di inibitori delle fosfatasi e delle proteasi. I campioni sono stati sonicati e lasciati in agitazione a 4°C tutta la notte. Il giorno seguente, i campioni sono stati centrifugati a 13.000 x g a 4°C per 10 minuti. Il sovranatante ottenuto rappresenta la frazione di proteine nucleari, che sono state successivamente dosate con test BCA.

3.8 Dosaggio delle proteine

Gli estratti proteici totali o frazionati (citosol/nuclei) sono stati dosati mediante il BCA test (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) utilizzando come standard l'albumina di siero bovino (BSA). Il BCA test prevede l'utilizzo del reattivo BCA (acido bicinconinico) e del solfato di rame; in condizioni alcaline, il rame (II) legandosi all'azoto peptidico delle proteine viene ridotto a rame (I). Due molecole di BCA sono in grado di chelare un ione rameoso facendo virare il colore verso il violetto intenso, con un massimo di assorbanza a 570nm. L'intensità della colorazione viola e l'assorbanza risultano essere proporzionali alla concentrazione di proteine presenti nel campione.

3.9 Western Blotting

Il Western Blotting (WB) è una tecnica biochimica che consente l'analisi semiquantitativa dell'espressione di una specifica proteina. La tecnica si articola in 6 fasi:

- 1. Elettroforesi SDS-PAGE**
- 2. Trasferimento (blotting) dal gel ad una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) o nitrocellulosa**
- 3. Saturazione della membrana in latte**
- 4. Incubazione della membrana con anticorpo primario che si lega proteina di interesse**
- 5. Incubazione della membrana con anticorpo secondario che si lega al primario**
- 6. Immunorivelazione**

I campioni sono stati normalizzati in base al contenuto proteico, denaturati mediante l'aggiunta di Laemli Buffer (Tris-HCl pH 6.8 1M, Glicerolo 99,5%, SDS 20%, Blu di bromofenolo 1%, β -MSH 7%) e bolliti 5 minuti; successivamente sono stati caricati su gel SDS-poliacrilammide 4-20% (Biorad) e sottoposti a elettroforesi ad un voltaggio costante di 200 V per 50 minuti in un tampone di corsa (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%, pH 8,5). Al termine della corsa le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di PVDF. Il *blotting* è stato effettuato a 100 Volt per 50 minuti in un tampone di trasferimento (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, Metanolo 20%, SDS 5%). Successivamente la membrana è stata incubata in una soluzione di latte in polvere al 5% in TBS-Tween20 (Tris-Base 200mM, NaCl 1,3M, Tween20 0,0025%, pH 7,5). Le glicoproteine del latte saturano i siti di legame ancora liberi sulla membrana favorendo successivo riconoscimento della proteina di interesse. Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in TBS-Tween20 la membrana è stata incubata over night a 4°C con l'anticorpo primario.

Sono stati utilizzati:

anti-HO-1 (rabbit 1:2000, Origene, Germania), anti-Nrf2 (rabbit 1:2000, Cell Signaling Technology, USA), anti-Bach1 (rabbit 1:1000, Bethyl Lab, USA), anti-hnRNPQ (rabbit 1:1000, Santa Cruz, USA), anti-PTEN (rabbit 1:1000, Cell Signaling Technology), anti BAX (rabbit 1:500, AbCam, UK) anti PARP (rabbit 1:1000, Cell signaling Technology).

Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in TBS-Tween20 per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, la membrana è stata incubata per 1h a temperatura ambiente con anticorpo secondario (GE Healthcare) anti-mouse 1:10000 o anti-rabbit 1:10000, coniugato con l'enzima perossidasi.

La rivelazione del complesso proteina-anticorpo primario-anticorpo secondario è stata ottenuta per chemiluminescenza utilizzando il sistema ECL (GE Healthcare). La perossidasi agisce ossidando il luminolo presente nella miscela ECL; quest'ultimo, ossidandosi, passa ad uno stato di eccitazione maggiore ed emette luminescenza (sistema ECL, GE Healthcare).

Successivamente, per consentire la normalizzazione dei risultati ottenuti, le membrane sono state incubate con la soluzione Re-blot (Chemicon International, USA) per consentire il distacco degli anticorpi legati e incubate con i seguenti anticorpi:

anti-Tubulina (mouse 1:1000, AbCam), utilizzato come marcatore del contenuto di proteine totali, anti-GAPDH (rabbit 1:10000, Santa Cruz) utilizzato come marcatore del contenuto di proteine totali o della frazione citosolica, anti-Laminina B (mouse 1:10000, AbCam) e anti-H2AX (rabbit 1:10000, Santa Cruz) utilizzati come marcatori della frazione di proteine nucleari.

L'analisi densitometrica delle lastre impressionate dalla luminescenza consente di eseguire una valutazione semiquantitativa delle proteine in esame.

3.10 Immunoprecitazione

L'immunoprecitazione (IP), è una tecnica di biochimica che consente di valutare le modifiche post-trascrizionali di una proteina o il legame tra due proteine ed è costituita da 4 fasi principali.

- 1. Incubazione del lisato proteico con anticorpo diretto contro la proteina di interesse**
- 2. Incubazione del campione con beads magnetiche che legano l'anticorpo e separazione del complesso beads-anticorpo-proteina**
- 3. Eluizione e denaturazione del complesso**
- 4. Rivelazione mediante WB delle modificazioni post-trascrizionali o di eventuali proteine legate**

Le cellule SH-SY5Y trasfettate con l'inibitore di miR-494 ed esposte a H₂O₂ 500 µM, sono state lisate in Ripa Buffer ed i campioni sono stati normalizzati in base al contenuto proteico. Circa 300µg di proteina di ogni campione sono stati incubati con anticorpo primario anti-Bach1 1mg/ml (Bethyl Lab) e lasciati in agitazione over night a 4°C.

Il giorno seguente vengono aggiunti 30µl di beads magnetiche (Invitrogen) ed i campioni vengono lasciati in agitazione a 4°C per 1h.

Il complesso beads-anticorpo-Bach1 è separato e lavato 4 volte in Ripa Buffer mediante l'utilizzo di un magnete. Il precipitato è successivamente eluito con 20µL di Ripa Buffer e 8µl di Laemli Buffer; quest'ultimo è in grado di rompere il legame Beads-anticorpo, consentendo, mediante l'utilizzo di un magnete, di separare il complesso Bach1-anticorpo dalle beads. Successivamente gli immunoprecipitati e i rispettivi sopranatanti sono stati analizzati mediante WB. Sono stati utilizzati anticorpi primari anti-Ubiquitina (mouse 1:1000, Santa Cruz), anti-SUMO 2/3 (mouse 1:5000, AbCam) e anti-acetyl lysine (rabbit 1:2000, Cell Signaling) e gli opportuni anticorpi secondari.

3.11 Saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

La ChIP consente di valutare la capacità di legame di un fattore di trascrizione al DNA ed è costituita da 5 fasi principali.

- 1. Cross-link delle proteine al DNA**
- 2. Rottura del DNA**
- 3. Immunoprecipitazione**
- 4. Rottura del legame proteina-DNA**
- 5. Estrazione del DNA e PCR**

Al termine dei trattamenti, le cellule sono trattate con una soluzione di formaldeide 1% in PBS in modo da fissare le proteine al DNA. Successivamente si effettua un lavaggio in PBS addizionato con inibitori delle proteasi e dopo centrifugazione si risospende in tampone di lisi (SDS 10%, EDTA 0,25M, Tris-HCl 1M pH 8). I campioni sono stati quindi sonicati per rompere il DNA in frammenti della lunghezza di 200-1000 bp. Dopo una ulteriore centrifugazione, ai sopranatanti viene aggiunto circa 1ml di tampone IP (SDS 10%, Triton X 100%, EDTA 0,25M, Tris-HCl 1M pH 8, NaCl 2,5M) e da ciascun campione viene prelevata una aliquota da utilizzare come input. Alcuni campioni sono stati quindi incubati over night a 4°C con anticorpi anti-Nrf2 C-20 (rabbit 1:50, Santa Cruz) o anti-Bach1 C-20 (goat 1:50, Santa Cruz); altri, invece, sono stati incubati con IgG rabbit o goat (Merk, Millipore) utilizzati come controllo IgG aspecifico. Il giorno seguente i campioni sono stati incubati con beads magnetiche per 5h; successivamente, le beads sono state eluite mediante l'aggiunta di Elution Buffer (SDS 10%, NaHCO₃ 1M) e i campioni sono stati addizionati di NaCl 5M per poi essere incubati a 65°C over night in modo da consentire l'inizio della rottura del legame proteina-DNA. Per avere la rottura completa del legame, il giorno seguente sono stati aggiunti 10 mg/ml di proteinasi K. Per estrarre i frammenti di DNA legati a Nrf2 o a Bach1, è stata utilizzata una soluzione di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico. Il DNA estratto è stato quindi amplificato mediante PCR e i prodotti ottenuti dalla reazione di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel al 2% di agarosio.

	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 3'-5'
Nrf2	cct gag tta cag tgt ctaa	act gag tgt tct ggt gat g
Bach1	tgc gat gtc acc atc ttt gt	ggt ctg cag tgg agt ccaa

Tabella 2. Sequenze dei primers utilizzati per Nrf2 e Bach1

3.12 Immunofluorescenza

Per valutare l'espressione di HO-1, le cellule SH-SY5Y sono state seminate in un vetrino da 8 pozzetti (Nalge Nunc International) alla densità di 4×10^3 cellule per pozzetto. In alcuni pozzetti le cellule sono state trattate con ATRA $10\mu\text{M}$ per 4 giorni. Al termine del differenziamento sia le cellule indifferenziate che le differenziate sono state esposte per 24h a H_2O_2 $500\mu\text{M}$ o tBHQ $50\mu\text{M}$, usato come controllo positivo dell'induzione di HO-1. Dopo i trattamenti le cellule sono state fissate in metanolo a -20°C , lavate in PBS e marcate con anticorpo anti-HO-1 (rabbit $10\mu\text{g/ml}$, Origene) per 1h. Dopo un lavaggio in PBS le cellule sono state incubate per 1h con anticorpo secondario anti-rabbit ALEXA 633 (1:400, Life Technologies). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio 3-channel TCS SP2 laser-scanning confocal microscope (Leica Microsystems)

3.13 Trasfezione con l'inibitore specifico del microRNA-494, trattamenti e analisi dei ROS

Le cellule SH-SY5Y sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 70×10^3 per pozzetto in terreno standard senza antibiotici. Dopo 24h le cellule sono state trasfettate in modo transiente con 100pmol di un inibitore specifico di miR-494 (miRCURY LNA miR inhibitor hsa-miR-494-3p, QIAGEN, Hilden, Germania) o con un inibitore di controllo (Neg C) (miRCURY LNA miR inhibitor Control-negative Control A, QIAGEN) utilizzando come agente trasfettante la Lipofectamina 2000 (Life Technologies) secondo le istruzioni indicate dal produttore. Dopo 96h, le cellule sono state trattate con H_2O_2 500 μ M. La durata del trattamento era di 6h per l'analisi dei livelli di PTEN, hnRNPQ e Bach1 e di 24h per l'analisi dei livelli di HO-1, Bax e PARP, la produzione di ROS e la vitalità cellulare.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante Trypan Blue exclusion test ed espressa in valori percentuali.

Per valutare se l'inibitore di miR-494 influenzasse la capacità di adattamento delle cellule al trattamento con H_2O_2 , sono stati analizzati i livelli di ROS mediante il saggio 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA; Sigma-Aldrich). Al termine dei trattamenti le cellule sono state trattate con 5 μ M di DCFH-DA per 30 minuti a 37°C. La DCFH-DA è in grado di legarsi ai ROS emettendo fluorescenza, la quale è stata analizzata mediante FACS (Attune™ Acoustic Focusing Flow Cytometer, Thermo Fisher Scientific) ed espressa come unità arbitrarie di fluorescenza.

CAPITOLO IV

Risultati

4.1 Il differenziamento riduce la capacità di indurre HO-1 e incrementa la sensibilità allo stress ossidativo in cellule di neuroblastoma della linea SH-SY5Y

4.1.1 Effetti del differenziamento indotto da acido retinoico.

Le cellule di neuroblastoma della linea SH-SY5Y sono state trattate per 4 giorni con ATRA 10 μ M per indurne il differenziamento. Al termine del trattamento le cellule mostravano evidenti cambiamenti morfologici come l'aumento del numero e della lunghezza dei neuriti (Fig.7) ed aumentava l'espressione di alcuni marcatori del differenziamento neurogenico come MAP2 e NeuroD1 (Fig.8).

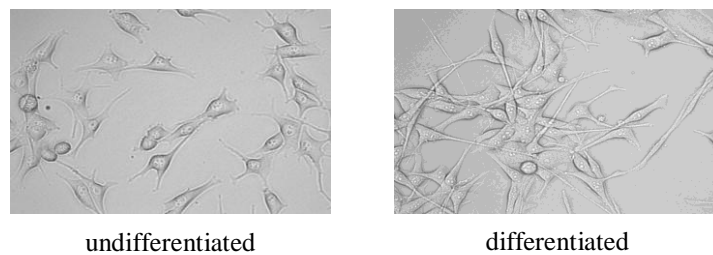


Fig.7 Cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA 10 μ M. Microscopia ottica (20x)

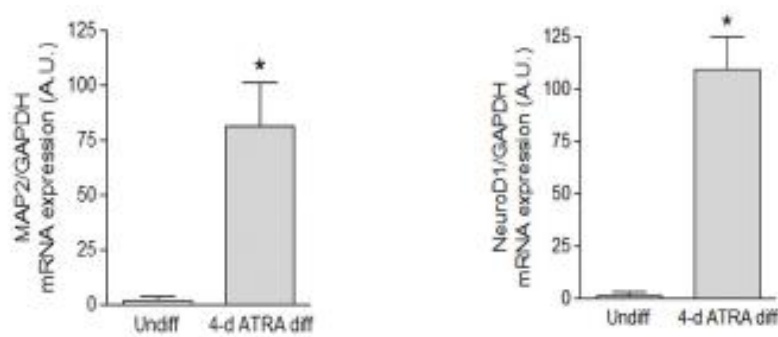


Fig.8 Il differenziamento delle cellule SH-SY5Y è stato valutato analizzando l'espressione di MAP2 e NeuroD1 mediante RT-PCR. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs Undiff.

4.1.2 Il differenziamento aumenta la sensibilità delle cellule allo stress ossidativo

Le cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA sono state esposte a dosi crescenti (da 100 μ M a 500 μ M) di perossido di idrogeno (H_2O_2) ed è stata valutata la vitalità cellulare mediante *Trypan Blue exclusion test*. Mentre le cellule indifferenziate non mostravano variazioni significative della vitalità cellulare rispetto ai controlli non trattati, le cellule differenziate andavano incontro ad una progressiva riduzione della vitalità. Nello specifico, nei trattamenti con 100 μ M e 250 μ M di H_2O_2 è stata osservata una riduzione della vitalità del 20% rispetto ai controlli ed alla concentrazione 500 μ M una riduzione del 55%. Per i successivi esperimenti sono stati valutati gli effetti del trattamento con la dose 500 μ M di H_2O_2 (Fig.9).

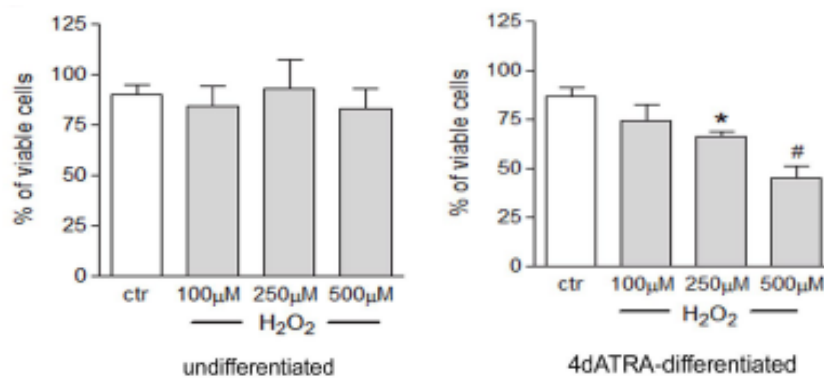


Fig.9 Percentuale di cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA risultate vitali al test dal Trypan Blue dopo trattamento con H_2O_2 100 μ M, 250 μ M e 500 μ M per 24h.

Inoltre, abbiamo voluto verificare se la diminuzione del numero di cellule vitali osservata dopo il differenziamento fosse correlata ad un aumento del tasso di apoptosi. Mediante il test Annessina V-FITC, abbiamo dimostrato che l'espressione della fosfatidilserina sulla membrana delle cellule differenziate esposte a H_2O_2 $500\mu M$ per 24h aumentava in modo analogo a quanto osservato in cellule trattate con staurosporina $100nM$, utilizzata come controllo positivo di apoptosi. Al contrario, le cellule non trattate non mostravano alcuna positività (Fig.10).

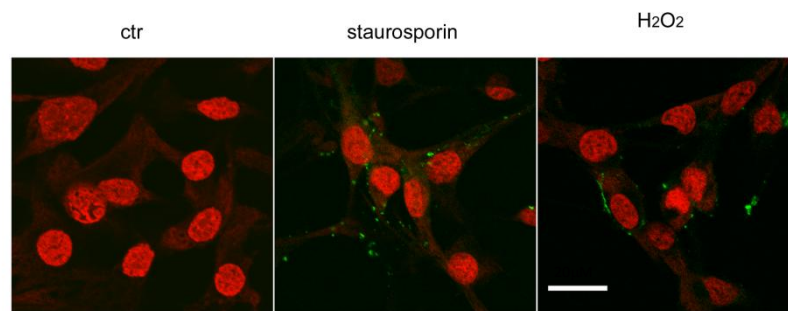


Fig.10 La positività delle cellule differenziate al saggio Annessina V-FITC (spot verdi) è stata valutata come indice di apoptosi precoce. Il trattamento con staurosporina $100nM$ è stato usato come controllo positivo. I nuclei sono stati controcolorati con To-pro3 iodide. Scale bar = $20\mu M$

4.1.3 Il differenziamento non cambia i livelli di espressione di GCLM e GCLC

Poiché il GSH rappresenta uno dei più importanti sistemi di adattamento delle cellule alle stress ossidativo, abbiamo valutato mediante RT-PCR l'espressione del mRNA di due geni Nrf2-dipendenti, GCLM e GCLC che rappresentano le due sub-unità della γ -glutamyl cisteina sintetasi, coinvolta direttamente nella sintesi del GSH. Come si può osservare, il differenziamento delle cellule SH-SY5Y con ATRA non modifica i livelli di GCLM e GCLC in risposta al trattamento con H_2O_2 . Il trattamento con tBHQ 50 μ M è stato utilizzato come controllo positivo dell'induzione di Nrf2 e dei suoi geni target (Fig.11).

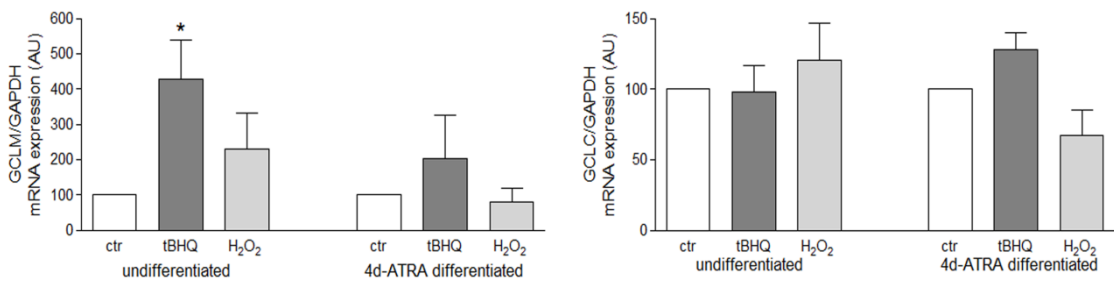


Fig.11 Livelli di espressione di GCLM e GCLC in cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate, trattate per 6h con H_2O_2 500 μ M o tBHQ 50 μ M. Analisi statistica: n=3 *p<0,05 vs CTR

4.1.4 Il differenziamento diminuisce la up-regolazione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo.

Considerando che gli enzimi della sintesi del GSH non risultavano modificati, abbiamo analizzato i livelli di HO-1.

L'induzione di HO-1 è stata valutata inizialmente mediante microscopia confocale. Le cellule indifferenziate esposte a H₂O₂ 500μM per 24h mostravano un aumento dell'espressione di HO-1; al contrario, nessuna induzione è stata osservata nelle cellule differenziate in seguito al trattamento con H₂O₂. Il tBHQ aumenta l'espressione di HO-1 in entrambi i tipi cellulari (Fig. 12).

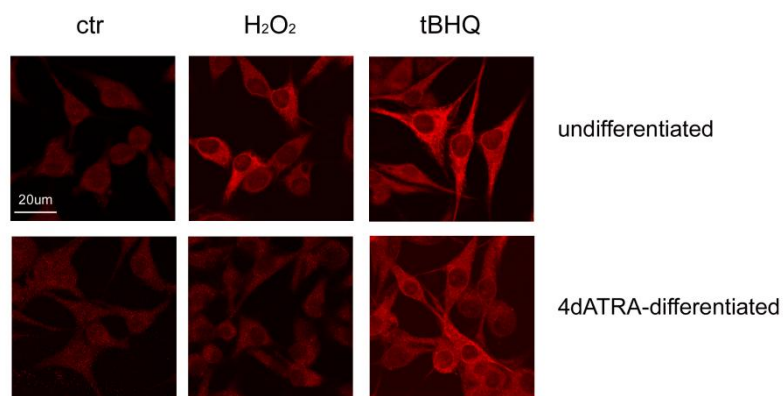


Fig.12 L'analisi in microscopia confocale mostra l'immunofluorescenza specifica di HO-1 in cellule indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA ed esposte per 24h a H₂O₂ 500μM o tBHQ 50μM. Scale bar 20μM.

I dati ottenuti dalla microscopia confocale sono stati confermati dall'analisi Western Blotting (WB). I livelli di HO-1 risultavano significativamente più bassi nelle cellule differenziate esposte a H₂O₂ 500μM per 24h rispetto alle cellule indifferenziate. Anche in questo caso il trattamento con tBHQ 50μM aumentava l'espressione di HO-1 in entrambi i tipi cellulari (Fig.13).

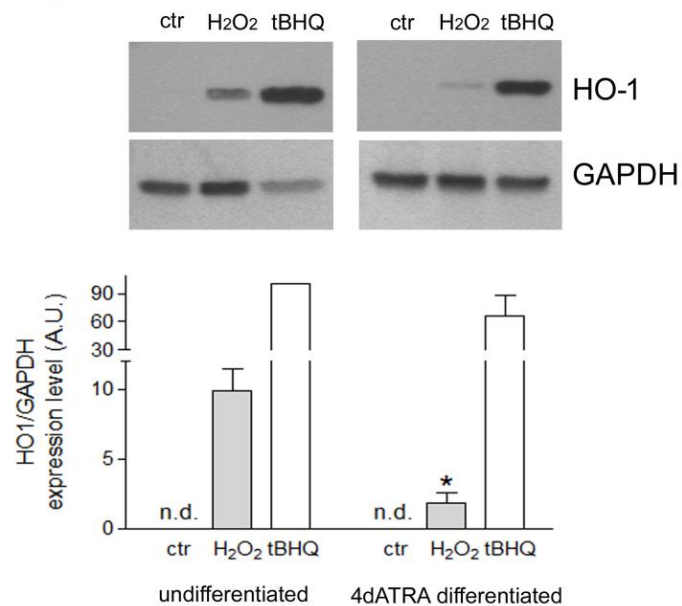


Fig.13 Analisi WB dell'espressione di HO-1 in cellule indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA in seguito al trattamento con H₂O₂ 500μM o tBHQ 50μM per 24h. L'espressione di GAPDH è stata valutata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs H₂O₂ indifferenziate

4.1.5 L'induzione di HO-1 garantisce la sopravvivenza delle cellule indifferenziate allo stress ossidativo

Per determinare il ruolo di HO-1 nella resistenza delle cellule indifferenziate allo stress ossidativo, è stato eseguito un trattamento di 2h con H₂O₂ 500μM in modo da indurre l'espressione del mRNA di HO-1. Successivamente le cellule sono state trasfettate con oligonucleotidi specifici per il silenziamento di HO-1. L'espressione di HO-1 è stata valutata dopo 24h mediante analisi WB confermando che il silenziamento riesce a prevenire l'induzione di HO-1 in risposta al trattamento con H₂O₂ (Fig. 14a). A seguito del silenziamento di HO-1 la vitalità cellulare diminuiva del 50% rispetto alle cellule trattate solo con H₂O₂ (Fig.14b). Questi dati forniscono una prova diretta di come la up-regolazione di HO-1 abbia un ruolo cruciale nella protezione delle cellule indifferenziate verso il danno ossidativo.

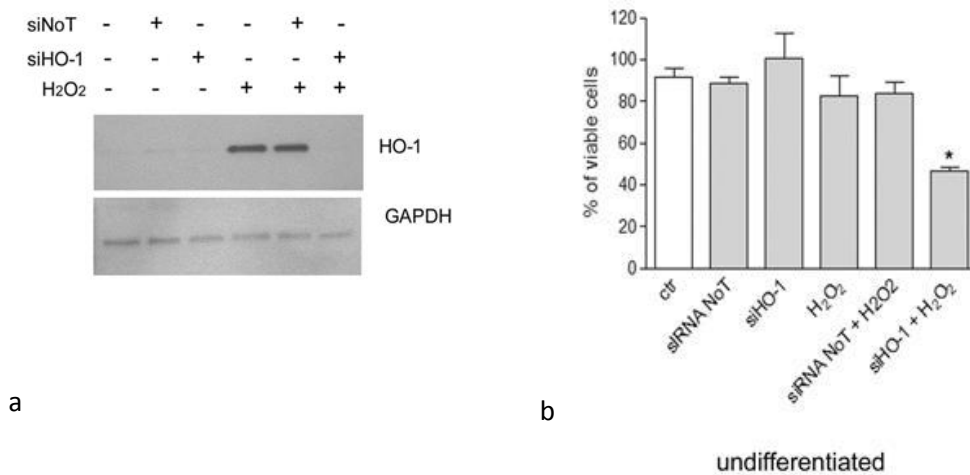


Fig.14 (a) Analisi WB dell'espressione di HO-1 in cellule indifferenziate esposte a H₂O₂ 500μM per 2h e silenziate per HO-1. L'espressione di GAPDH è stata valutata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate (b) La percentuale di cellule vitali è stata valutata mediante Trypan Blue exclusion test. Alcuni campioni sono stati trattati con un siRNA scramble (siNoT) per escludere la presenza di risposte cellulari aspecifiche. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs H₂O₂.

4.1.6 La supplementazione con bilirubina protegge la cellula differenziata dalla tossicità di H₂O₂

Come detto in precedenza, la bilirubina derivante dall'attività di HO-1 mostra spiccate proprietà antiossidanti. Trattando le cellule differenziate con basse dosi di bilirubina (0,5µM o 1µM) abbiamo osservato una protezione dall'effetto tossico di H₂O₂. Questo risultato, seppur in maniera indiretta, fa ipotizzare che, nelle cellule differenziate, il deficit di bilirubina endogena dovuto alla minore induzione di HO-1 sia correlato ad una minore protezione dal danno ossidativo (Fig.15).

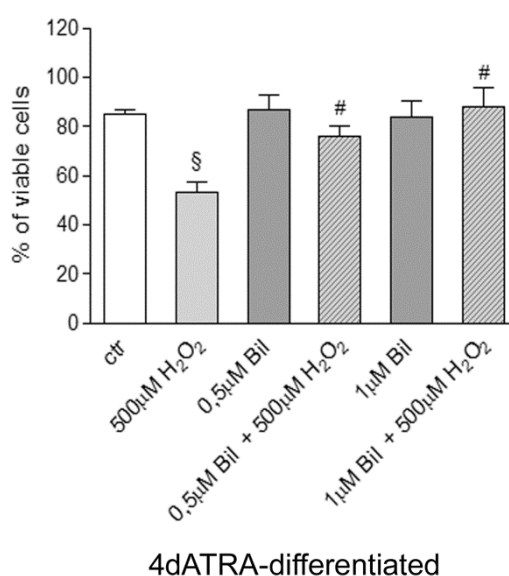


Fig.15 Le cellule differenziate per 4 giorni con ATRA sono state trattate con H₂O₂ 500µM o H₂O₂ 500µM + bilirubina (0,5µM o 1µM). La percentuale di cellule vitali è stata valutata mediante Trypan Blue exclusion test. Analisi statistica: n=3, §p<0,01 vs ctr, #p<0,05 vs H₂O₂

4.1.7 L'esposizione a H_2O_2 riduce i livelli di espressione di Keap1

L'espressione di HO-1 è strettamente correlata all'attivazione di Nrf2, che rappresenta il suo principale regolatore positivo. Prima di analizzare Nrf2 abbiamo valutato i livelli di Keap1 nelle cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate in risposta allo stress ossidativo. L'analisi WB mostra che sia prima che dopo il differenziamento, il trattamento con H_2O_2 500 μ M per 24h diminuisce i livelli di espressione di Keap1. Come atteso, il trattamento con tBHQ causa una riduzione dei livelli di Keap1 in entrambi i tipi cellulari (Fig.16).

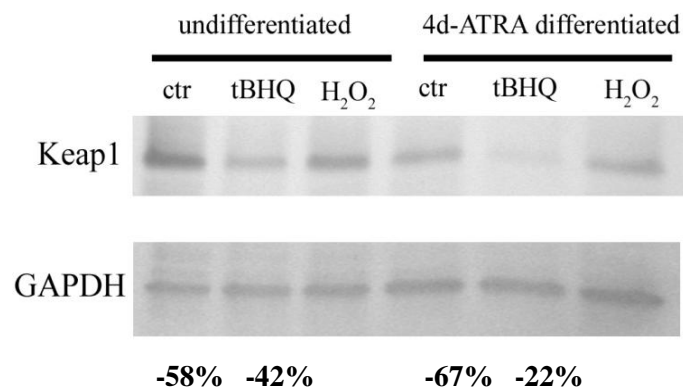


Fig.16 Analisi dei livelli di espressione di Keap1 in cellule SH-SY5Y indifferenziate e differenziate trattate con H_2O_2 500 μ M o tBHQ 50 μ M per 24h. L'espressione di GAPDH è stata valutata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate

4.1.8 Il differenziamento non altera la traslocazione nucleare di Nrf2 ma ne modifica significativamente la capacità di legame al DNA in risposta allo stress ossidativo.

L'analisi dei livelli di espressione di Nrf2 è stata effettuata mediante WB su estratti citosolici e nucleari ed è stato osservato che il trattamento con H₂O₂ 500µM per 3h favoriva la traslocazione di Nrf2 dal citosol al nucleo sia nelle cellule indifferenziate che nelle cellule differenziate (Fig 17).

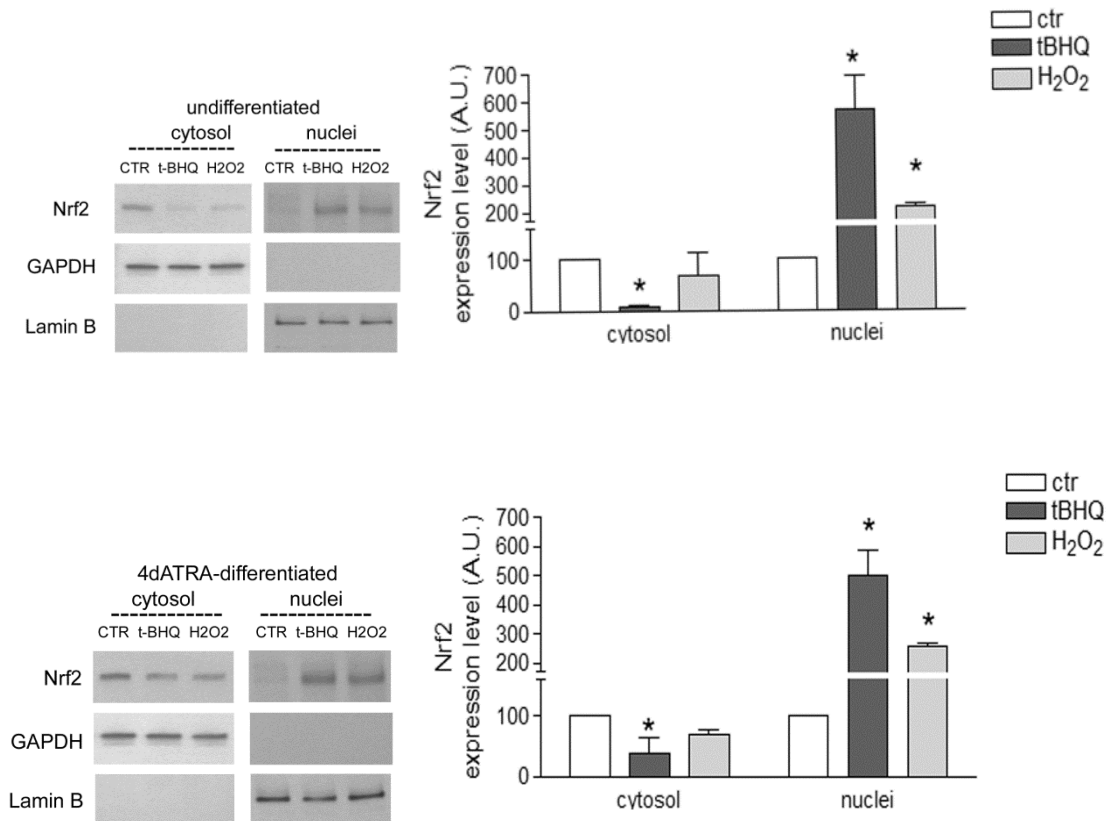


Fig.17 Analisi WB dei livelli citosolici e nucleari di Nrf2 in cellule indifferenziate e differenziate in seguito al trattamento con H₂O₂ 500µM o tBHQ 50µM per 3h. L'espressione di GAPDH e Laminina B è stata valutata per verificare la purezza del frazionamento cellulare e come controllo interno della quantità di proteine caricate. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs ctr

Inoltre, abbiamo voluto verificare mediante il saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) se alla traslocazione nucleare di Nrf2 corrispondesse un aumento del legame alla sequenza ARE, nella regione del promotore E1 di HO-1. Nella cellule indifferenziate esposte a H₂O₂ è stato osservato un aumento del legame di Nrf2 al DNA del 100% rispetto al controllo; nelle cellule differenziate, invece, non state osservate differenze significative (Fig. 18). Quindi, se da un lato non sembrano esserci differenze circa la traslocazione al nucleo di Nrf2 nei due tipi di cellule, dall'altro, si riscontra nelle cellule differenziate un'incapacità di Nrf2 di legarsi al promotore di HO-1.

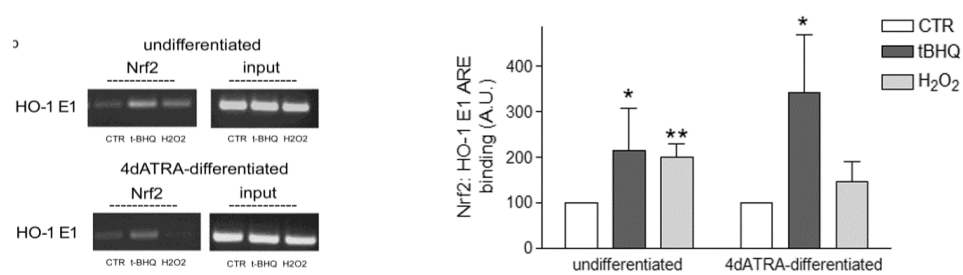


Fig.18 Analisi ChIP del legame di Nrf2 alle sequenze ARE nella regione del promotore E1 di HO-1. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 e **p<0,01 vs ctr

4.1.9 Il differenziamento modifica la risposta di Bach1 allo stress ossidativo

Bach1 è un competitore di Nrf2 per le sequenze ARE e svolge un'azione repressiva sulla trascrizione dei geni Nrf2-dipendenti e su HO-1 in particolare.

L'analisi WB su estratti citosolici e nucleari di cellule indifferenziate esposte a H₂O₂ 500µM ha rivelato una diminuzione dell'espressione di Bach1 del 41,2% rispetto ai controlli. Al contrario, nessuna diminuzione è stata osservata nelle cellule differenziate nelle stesse condizioni sperimentali (Fig.19).

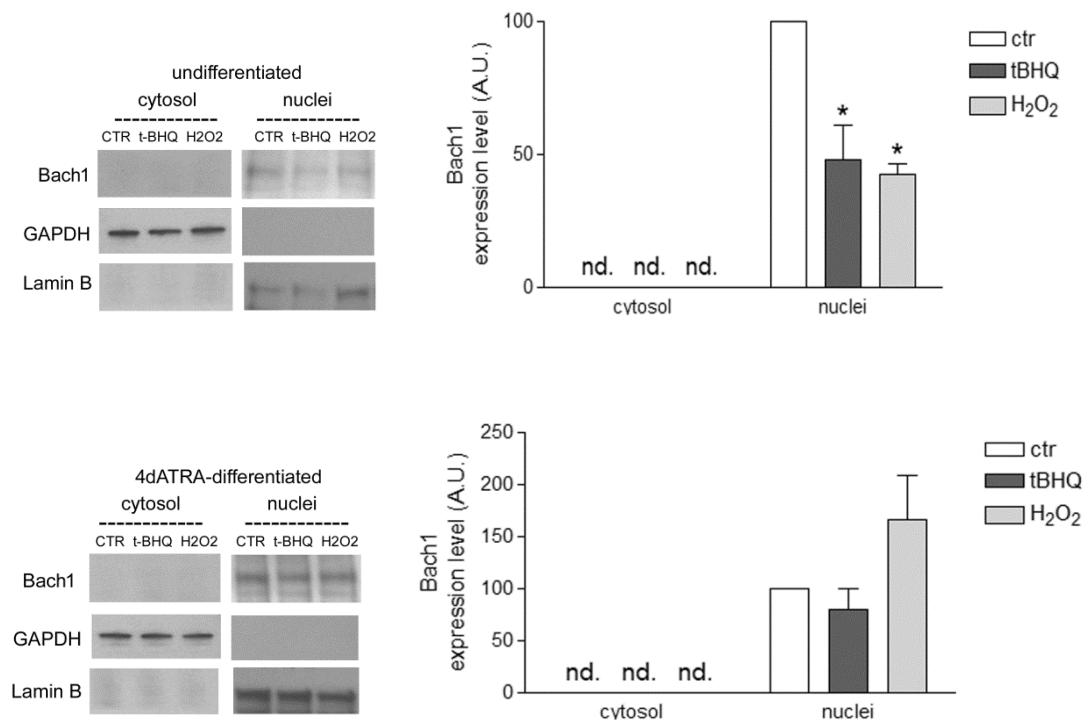


Fig.19 Analisi WB dei livelli citosolici e nucleari di Bach1 in cellule indifferenziate e differenziate in seguito al trattamento con H₂O₂ 500µM o tBHQ 50µM per 3h. L'espressione di GAPDH e Laminina B è stata valutata per verificare la purezza del frazionamento cellulare e come controllo interno della quantità di proteine caricate. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs ctr

Questi dati sono in linea con quanto osservato dall'analisi del legame di Bach1 al promotore E1 di HO-1 mediante ChIP. Infatti, mentre le cellule indifferenziate esposte a H₂O₂ hanno mostrato una diminuzione del legame di Bach1 al promotore E1 rispetto al controllo, nessuna diminuzione del legame Bach1/E1 è stata osservata nelle cellule differenziate (Fig.20). In entrambi i tipi cellulari, il trattamento con tBHQ è in grado di spostare Bach1 consentendo il legame di Nrf2 al promotore E1.

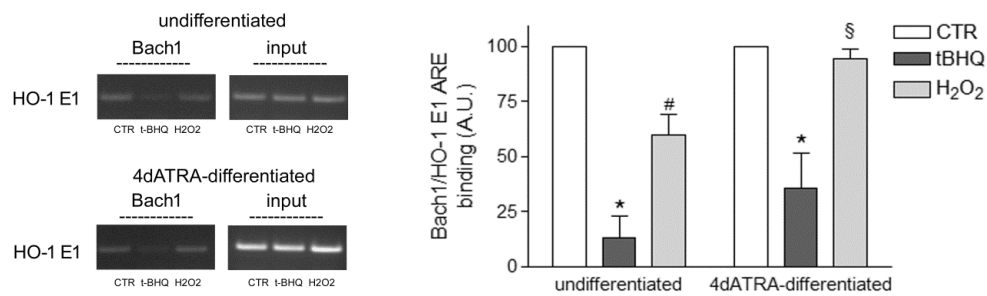


Fig.20 Analisi ChIP del legame di Nrf2 alle sequenze ARE nella regione del promotore E1 di HO-1. Analisi statistica: n=3, *p<0,01 vs ctr, #p<0,01 vs ctr e §p<0,05 vs H₂O₂ indiff.

Il rapporto tra i livelli nucleari di Nrf2 e Bach1 mostra chiaramente il duplice comportamento delle cellule indifferenziate e differenziate in risposta al trattamento con H₂O₂ (Fig.21).

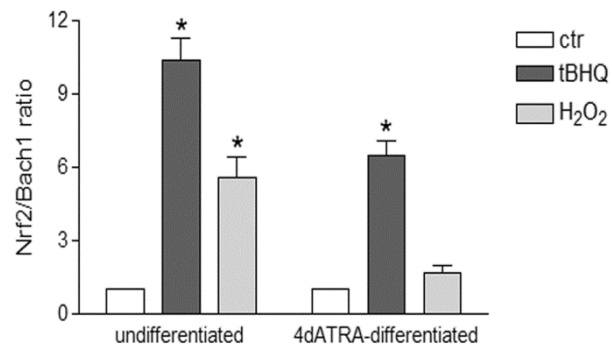


Fig.21 Rapporto tra i livelli nucleari di Nrf2 e Bach1 in cellule indifferenziate e differenziate per 4 giorni con ATRA in seguito al trattamento con H₂O₂ 500μM o tBHQ 50μM. Analisi statistica: n=3, *p<0,05 vs ctr.

4.2 Il micro RNA 494 favorisce l'induzione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo

4.2.1 Il differenziamento riduce i livelli di miR-494 in cellule SH-SY5Y

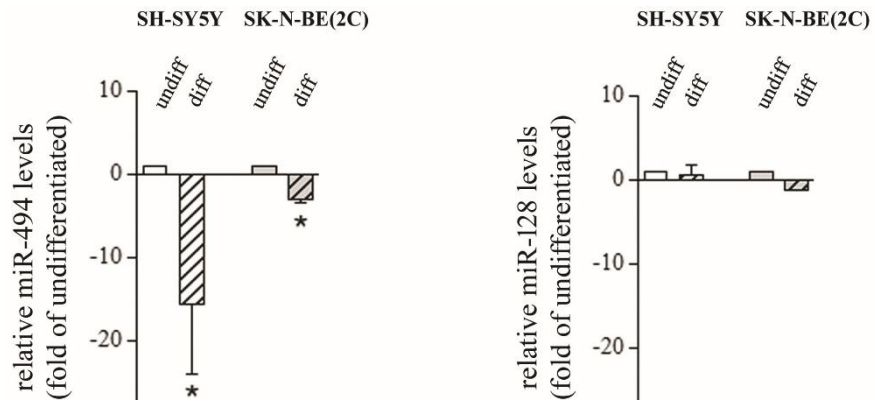
Il differenziamento delle cellule SH-SY5Y per 4 giorni con ATRA 10 μ M mostra una significativa riduzione dell'espressione di miR-494. Abbiamo anche analizzato l'espressione di miR-128 che, invece, non mostrava cambiamenti significativi in nessuna delle condizioni sperimentali analizzate (Fig.22 a,b). Pertanto, abbiamo continuato i nostri esperimenti focalizzandoci sul miR-494.

4.2.2 Il differenziamento riduce i livelli di miR-494 anche nella linea SK-N-BE(2C)

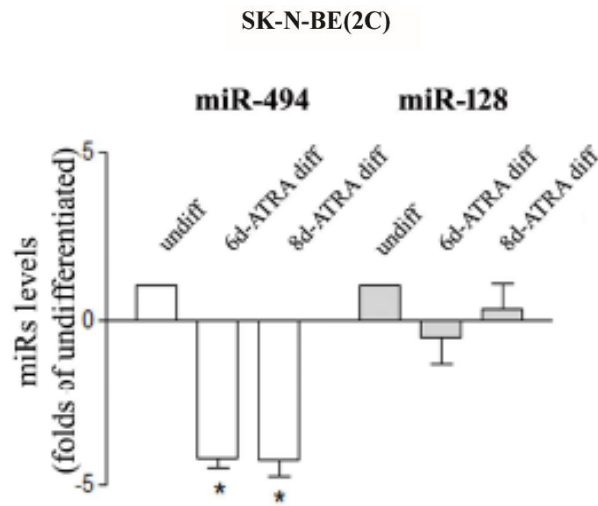
Abbiamo analizzato anche cellule di un'altra linea di neuroblastoma, SK-N-BE(2C) che, tuttavia, dopo un periodo di differenziamento di 4 giorni mostravano una riduzione di circa 4 volte dell'espressione del miR-494, decisamente minore rispetto a quanto osservato per la linea SH-SY5Y (Fig.22 a,b). In accordo con quanto riportato in letteratura (Chambaut-Guérin et al., 2000) (Yao et al., 2017), abbiamo verificato che la linea SK-N-BE(2C) necessita di tempi di trattamento con ATRA più lunghi per indurre il fenotipo neuronale. Infatti, i cambiamenti morfologici sono evidenti solo dopo 8 giorni così come l'aumento di espressione di MAP2 (Fig.23 a,b). Tuttavia, non abbiamo osservato significative ulteriori down-regolazioni di miR-494 (Fig.22b).

Anche nella linea SK-N-BE(2C) non abbiamo osservato cambiamenti significativi dei livelli di miR-128 in nessuna delle condizioni sperimentali analizzate (Fig.22 a,b).

Le successive analisi sono state effettuate sulle cellule della linea SH-SY5Y che mostravano la down-regolazione di miR-494 più forte nel tempo più breve.

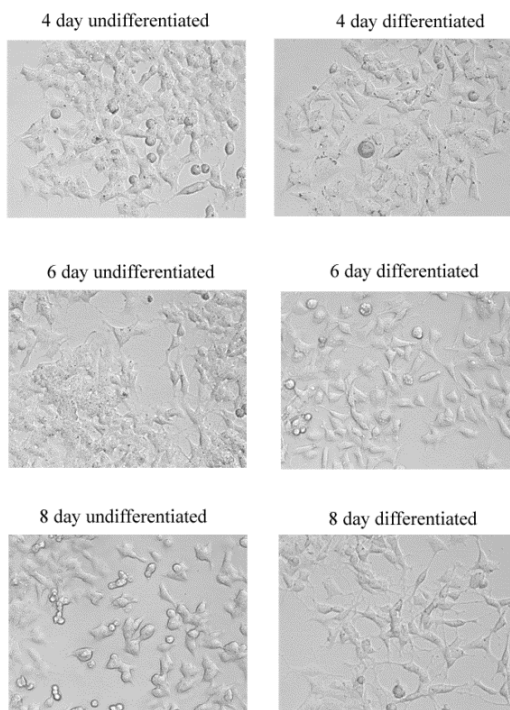


a

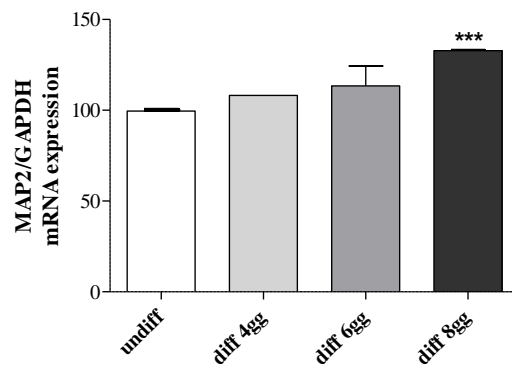


b

Fig.22 (a) Livelli di miR-494 e miR-128 in cellule SH-SY5Y e SK-N-BE(2C) differenziate per 4 giorni con ATRA 10 μ M. (b) Livelli di miR-494 e miR-128 in cellule SK-N-BE(2C) differenziate per 6 e 8 giorni con ATRA 10 μ M. Analisi statistica: n=3; *p<0,05 vs undiff.



a



b

Fig.23 (a) Cellule SK-N-BE(2C) indifferenziate e differenziate per 4, 6 e 8 giorni con RA 10 μ M. Microscopia ottica (20 x). (b) Il differenziamento è stato valutato mediante l'analisi RT-PCR dei livelli di espressione di MAP2. Analisi statistica: n=2, *p<0,005 vs Undiff.

4.2.3 L'inibizione di miR-494 aumenta la sensibilità delle cellule allo stress ossidativo

Per valutare se la diminuzione dei livelli di miR-494 potesse modificare la sensibilità cellulare allo stress ossidativo, le cellule SH-SY5Y sono state trasfettate con un inibitore specifico di miR-494 o con un controllo negativo (NegC) per 4 giorni ed esposte a H₂O₂ 500μM.

Per verificare l'effettiva inibizione del micro-RNA sono stati valutati i livelli di due target nucleari specifici di miR-494, *Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten* (PTEN) e *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q* (hnRNPQ). L'analisi WB mostrava un aumento dell'espressione di PTEN e di hnRNPQ del 50% rispetto al controllo, a conferma della avvenuta inibizione di miR-494 (Fig.23).

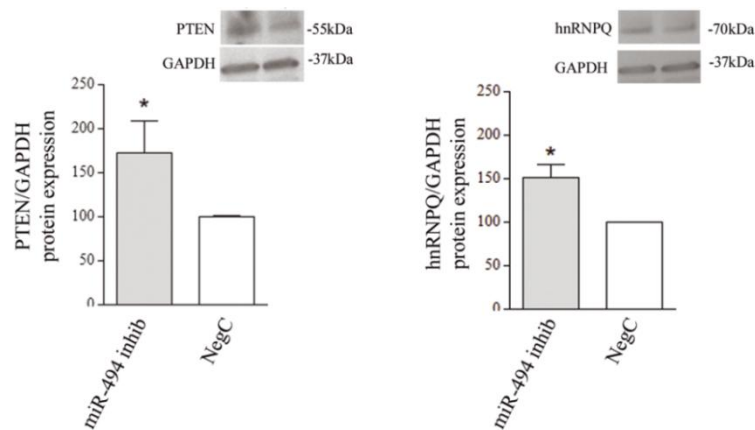


Fig.23 Analisi WB dell'espressione di PTEN e hnRNPQ in seguito alla trasfezione con l'inibitore di miR-494 o NegC per 96h. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate. Analisi statistica: n=3; *p<0,05 vs NegC.

L'analisi della vitalità cellulare mostra che la trasfezione delle cellule SH-SY5Y con l'inibitore di miR-494 *per se* non modifica la vitalità rispetto alle cellule trasfettate con NegC. Al contrario, dopo il trattamento di 24h con H₂O₂, l'inibitore di miR-494 diminuisce significativamente il numero di cellule vitali (Fig.24).

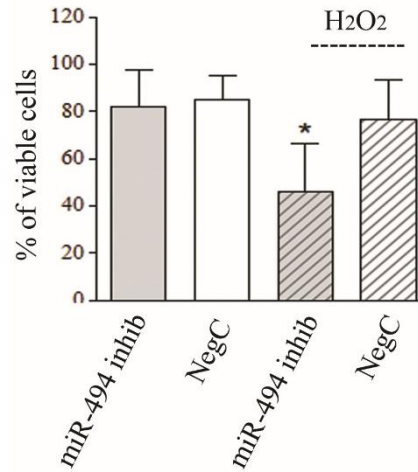


Fig.24 Percentuale di cellule vitali dopo il trattamento con l'inibitore di miR-494 o NegC per 96h e l'esposizione a H₂O₂ 500µM per 24h. Analisi statistica: n=4 *p<0.05 vs NegC e miR-494 inhibitor.

Per valutare se la diminuzione della vitalità cellulare fosse correlata ad un aumento del tasso di apoptosi abbiamo analizzato mediante WB l'espressione di BAX e PARP, due marcatori di apoptosi; nessuna delle condizioni sperimentali prese in esame mostrava cambiamenti significativi dei livelli di BAX e PARP (Fig.25).

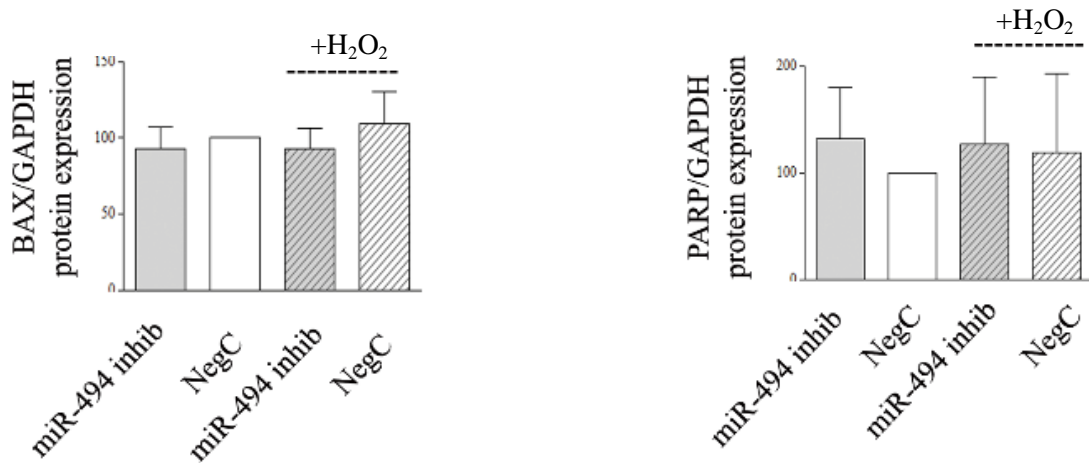


Fig.25 Analisi WB dell'espressione di BAX e PARP in seguito al trattamento con l'inibitore di miR-494 o NegC per 96h e all'esposizione a H₂O₂ 500µM per 24h. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate.

4.2.4 L'inibizione di miR-494 incrementa i livelli di ROS e limita l'induzione di HO-1 in risposta allo stress ossidativo

Per stabilire se l'inibizione di miR-494 potesse perturbare la risposta antiossidante HO-1-dipendente, abbiamo analizzato i livelli di ROS mediante il saggio DCFH-DA e i livelli di HO-1 tramite WB. Nelle cellule SH-SY5Y l'inibizione di miR-494 incrementava i livelli di ROS solo in seguito al trattamento con H₂O₂, mentre nessun cambiamento è stato osservato nelle cellule trasfettate con NegC ed esposte H₂O₂ (Fig.26).

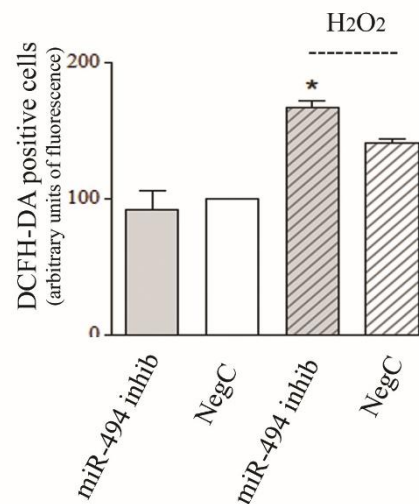


Fig.26 La positività a DCFH-DA è stata misurata mediante analisi citofluorimetrica in seguito al trattamento con l'inibitore di miR-494 o NegC per 96h e all'esposizione a H₂O₂ 500μM per 6h. Analisi statistica: n=2; *p<0,05 vs NegC.

Inoltre, abbiamo osservato una correlazione tra i livelli di ROS e l'induzione di HO-1. L'analisi WB su estratti di proteine totali, non mostrava alcuna variazione significativa dell'espressione di HO-1 in seguito all'inibizione di miR-494 e all'esposizione a H₂O₂. Nelle cellule trasfettate con NegC ed esposte a H₂O₂, ovvero la stessa condizione in cui i livelli di ROS non cambiavano, l'espressione di HO-1 aumentava significativamente rispetto a NegC (Fig.27). Questi dati sono un'ulteriore conferma di come la up-regolazione di HO-1 sia cruciale per abbassare i livelli di ROS e del coinvolgimento di miR-494 nel garantire questa risposta.

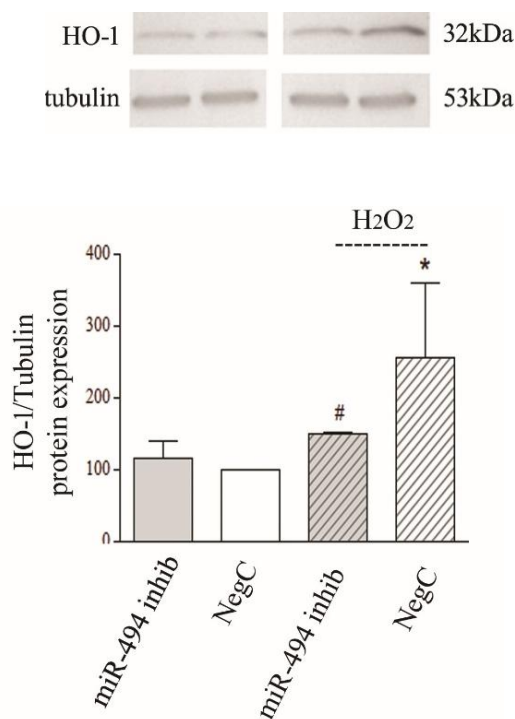


Fig.27 Analisi WB dell'espressione di HO-1 in cellule trasfettate con l'inibitore di miR-494 o NegC per 96h ed esposte a H₂O₂ 500μM per 24h. L'espressione della Tubulina è stata utilizzata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate. Analisi statistica: n=3; *p<0,05 vs NegC. #p<0,05 vs NegC+H₂O₂.

4.2.5 *Bach1* non è coinvolto nella regolazione di *HO-1* dipendente da *miR-494*

Analisi bioinformatiche del mRNA di *Bach1* hanno rivelato che nella regione 3'UTR sono presenti due siti di legame per *miR-494* (Fig.28); pertanto, abbiamo voluto analizzare se nel nostro modello sperimentale *Bach1* potesse essere un target molecolare di *miR-494*.

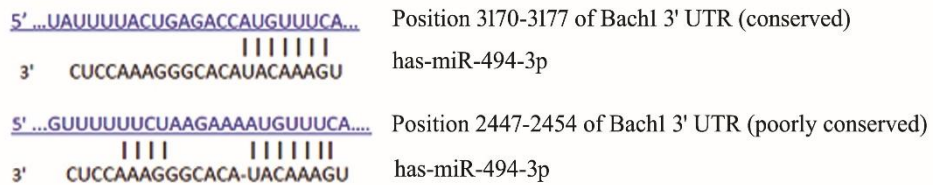


Fig.28 Il mRNA di *Bach1* contiene nella regione 3'UTR due siti di legame per *miR-494*. Le sequenze complementari sono state individuate mediante l'utilizzo di TargetScan.

L'analisi WB mostrava che l'inibizione di *miR-494* non modificava l'espressione di *Bach1* neppure in seguito al trattamento con H_2O_2 (Fig.29).

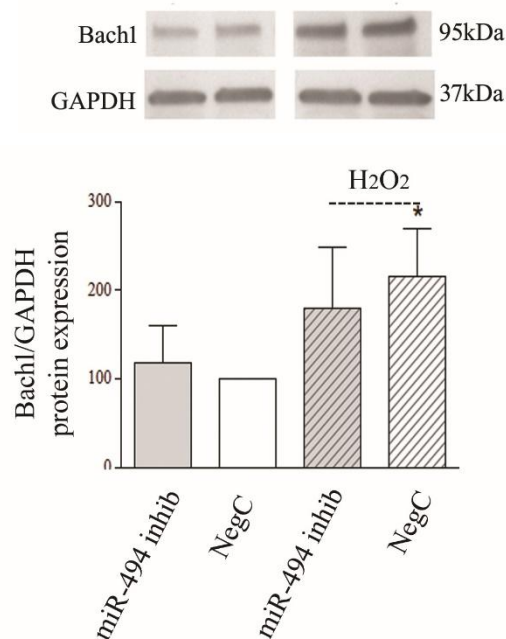


Fig.29 Analisi WB dell'espressione di *Bach1* in cellule trasfettate con l'inibitore di *miR-494* o *NegC* per 96h ed esposte a H_2O_2 500 μ M per 6h. L'espressione di *GAPDH* è stata usata come controllo interno della quantità totale di proteine caricate. Analisi statistica: n=4; *p<0,05 vs *NegC*.

Per valutare se l'attività di miR-494 potesse coinvolgere non i livelli di Bach1 ma la sua attività, abbiamo valutato mediante immunoprecipitazione (IP) alcune modifiche post-trascrizionali di Bach1 ritenute necessarie alla sua attivazione. Mentre l'ubiquitinazione e la sumoilazione di Bach1 non sono state rilevate, l'acetilazione è stata rilevata ma non mostrava cambiamenti significativi in nessuna delle condizioni sperimentali analizzate (Fig.30). Nel loro insieme, questi risultati confermano che Bach1 non è coinvolto nella regolazione di HO-1 da parte di miR-494.

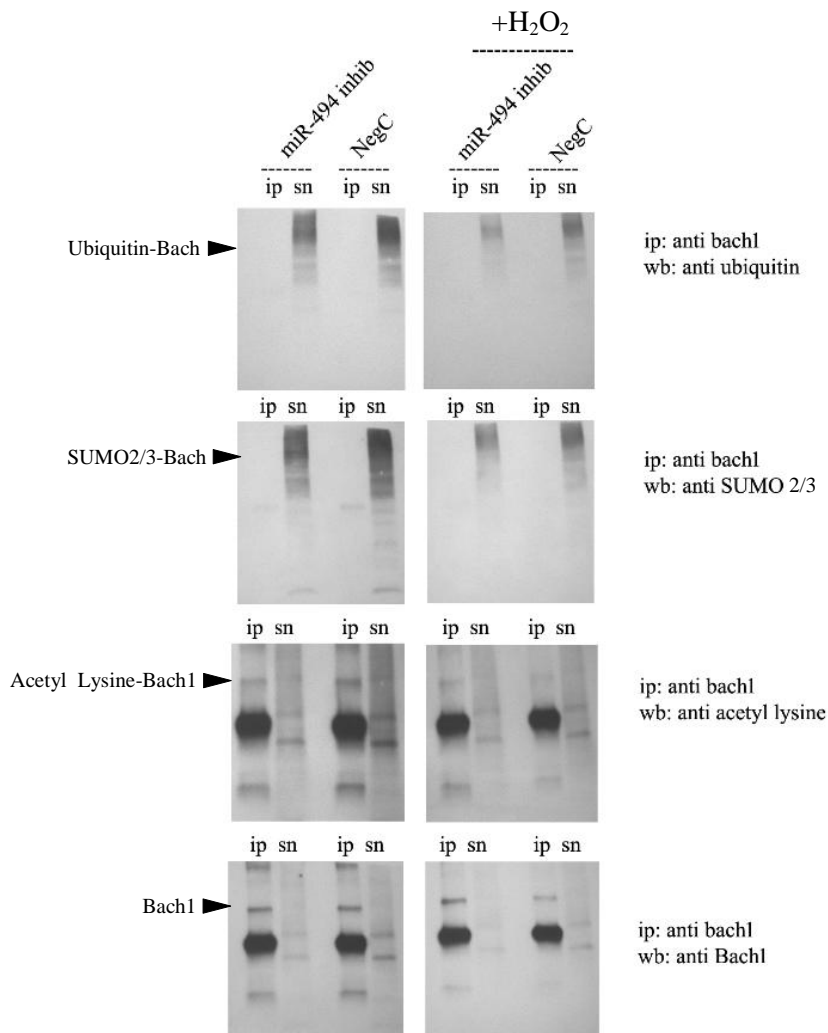


Fig.30 Analisi IP e successivo WB di ubiquitinazione, sumoilazione e acetilazione di Bach1 in cellule trasfettate con l'inibitore miR-494 o NegC per 96h ed esposte a H_2O_2 500 μ M per 6h.

CAPITOLO V

Discussione

Le ricerche che ho condotto durante il mio percorso di dottorato sono state focalizzate sullo studio della via molecolare che porta all'attivazione di Nrf2 ed HO-1 e che garantisce adattamento a vari tipi di stress e sopravvivenza cellulare.

E' noto che l'alterata capacità di rispondere allo stress ossidativo è associata all'insorgenza di patologie correlate all'invecchiamento. Inoltre, un deficit nella capacità di risposta adattativa concorre per esempio alla neurodegenerazione ma, al contrario, l'eccessiva capacità di adattamento contribuisce in modo importante alla progressione neoplastica. Ho utilizzato un approccio *in vitro* usando una linea di neuroblastoma umano che ha la capacità di differenziare aumentando l'espressione di marcatori neuronali e modificando la propria morfologia con l'allungamento dei neuriti. Lo stesso modello è stato usato in precedenza dal gruppo di lavoro con cui ho collaborato. In questo studio ne abbiamo voluto analizzare la risposta antiossidante esponendo le cellule ad H₂O₂ ed analizzando i meccanismi di attivazione di Nrf2 e HO-1.

Abbiamo standardizzato le condizioni di differenziamento a 4 giorni di trattamento con acido retinoico. Infatti, dopo questo tempo, le cellule hanno già espresso i neuriti come dimostrato in precedenti lavori (Piras et al., 2014). Il trattamento delle cellule indifferenziate con dosi crescenti di H₂O₂ per 24h non determinava nessun cambiamento del numero di cellule vitali. Al contrario, il trattamento delle cellule differenziate con la dose 500µM di H₂O₂ induceva una significativa diminuzione del numero di cellule vitali che risultava essere associata ad un aumento del tasso di apoptosi. Il differenziamento riduce quindi la capacità delle cellule di contrastare uno stimolo ossidativo esogeno. Abbiamo indagato se le cellule indifferenziate e differenziate trattate con H₂O₂ presentassero differenze nella capacità di induzione dei geni controllati da Nrf2. I nostri dati dimostrano che GCLM e GCLC, gli enzimi coinvolti nella sintesi del GSH, non sono indotti dal trattamento con H₂O₂ né prima né dopo il differenziamento. Questi risultati sono in linea con quanto osservato da altri autori circa l'incapacità delle cellule neuronali di up-regolare la sintesi del GSH in risposta allo stress ossidativo (Gegg et al., 2003). Pertanto, abbiamo deciso di investigare il ruolo di HO-1. HO-1 rappresenta l'isoforma inducibile dell'enzima HO, mentre HO-2 è l'isoforma costitutiva e nelle cellule nervose è maggiormente espressa rispetto a HO-1. Tuttavia, l'espressione di HO-2 è regolata prevalentemente dai glucocorticoidi (Raju et al., 1997) o da farmaci quali la atorvastatina (Butterfield et al., 2012b). HO-1, invece, viene regolato principalmente in risposta allo stress ossidativo, allo shock termico, all'ischemia e alla concentrazione dei gruppi eme, giocando quindi un ruolo chiave nella risposta al danno neuronale acuto (Chen, 2014). Per

questa ragione nel nostro modello sperimentale abbiamo deciso di analizzare solo HO-1. Abbiamo osservato che i livelli di HO-1 aumentavano significativamente nelle cellule indifferenziate esposte a H₂O₂, mentre nessun aumento è stato osservato in seguito allo stesso trattamento nelle cellule differenziate. Quindi, abbiamo ipotizzato che l'induzione di HO-1 potesse essere responsabile della resistenza delle cellule indifferenziate verso stress ossidativo ed abbiamo confermato questa ipotesi dimostrando che il silenziamento di HO-1 diminuisce la vitalità delle cellule trattate con H₂O₂, fornendo una prova diretta dell'importanza di HO-1 nella sopravvivenza cellulare. Al contrario, la mancata induzione di HO-1 dopo il differenziamento potrebbe essere responsabile della maggiore sensibilità allo stress ossidativo. Il ruolo di HO-1 nell'adattamento allo stress ossidativo è ascrivibile a tre dei suoi prodotti metabolici: ferritina, CO e bilirubina (Wegiel et al., 2014). Tra questi, la bilirubina è oggetto diversi studi *in vitro* e *in vivo*, nei quali è stato osservato un suo ruolo protettivo verso il danno ossidativo soprattutto a livello del sistema cardiovascolare. Infatti, un lieve aumento della concentrazione plasmatica di bilirubina sembra essere associato alla riduzione della gravità di patologie cardiovascolari (Stocker et al., 1987) (Gazzin et al., 2016) e metaboliche (Maruhashi et al., 2012) così come ad una riduzione del danno neuronale indotto da ischemia/riperfusion (Kitamura et al., 2003). Inoltre, il continuo riciclo di bilirubina ad opera dell'enzima biliverdina reduttasi fa sì che la bilirubina eserciti la sua attività antiossidante anche a concentrazioni molto basse. Infatti, è stato dimostrato che la dose 10nM di bilirubina conferisce protezione verso una concentrazione 10000 volte superiore di H₂O₂ ed agisce in modo complementare al GSH (Sedlak et al., 2009).

Rimane comunque vero che la bilirubina può esercitare una forte tossicità verso il sistema nervoso, determinando condizioni patologiche molto gravi come l'encefalopatia bilirubinica (Ostrow et al., 2003). Tra le cellule del sistema nervoso, i neuroni mostrano una maggiore sensibilità a questo effetto tossico rispetto, ad esempio, alle cellule gliali (Silva et al., 2002). Tra i meccanismi molecolari coinvolti nel danno neuronale da bilirubina, oltre all'induzione di stress ossidativo è stata dimostrata anche l'apoptosi dipendente da stress del reticolo endoplasmatico (Qaisiya et al., 2014) (Qaisiya et al., 2017). È interessante notare, inoltre, che anche il microcircolo del sistema nervoso risulta essere particolarmente suscettibile al danno da bilirubina rispetto alla sensibilità mostrata da cellule endoteliali presenti in altri distretti dell'organismo (Kapitulnik et al., 2012), sottolineando che il tessuto nervoso nelle sue diverse componenti cellulari è maggiormente sensibile alla tossicità della bilirubina, rispetto ad altri distretti dell'organismo.

Tuttavia, è stato dimostrato che la tossicità della bilirubina sui neuroni si manifesta solo per concentrazioni superiori a $1\mu\text{M}$ e che, invece, basse dosi di bilirubina esercitano sempre effetti protettivi anche sulle cellule nervose (Rodrigues et al., 2002) (Mancuso, 2017). Inoltre, a livello neuronale, l'efficacia protettiva della bilirubina non è esercitata solo dalla bilirubina esogena applicata in basse concentrazioni, ma anche alla bilirubina prodotta endogenamente dall'attivazione controllata di HO-1 (Catino et al., 2015).

In accordo con queste evidenze in letteratura, nel presente lavoro abbiamo osservato che nelle cellule SH-SY5Y differenziate, l'esposizione a basse dosi di bilirubina previene la riduzione della vitalità cellulare dovuta all'esposizione ad H_2O_2 , confermando, seppur indirettamente, il ruolo di HO-1 nella sopravvivenza delle cellule neuronali. È importante notare che altri autori hanno mostrato gli effetti tossici della bilirubina sulle cellule SH-SY5Y utilizzando dosi estremamente più elevate ($30\mu\text{M}$) (Qaisiya et al., 2014).

Successivamente, abbiamo analizzato i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione della trascrizione di HO-1, partendo dai livelli di espressione di Keap1, che essendo responsabile della degradazione di Nrf2 rappresenta un regolatore negativo indiretto di HO-1. Sia nelle cellule indifferenziate che in quelle differenziate, l'espressione di Keap1 sembra diminuire in risposta al trattamento con H_2O_2 . Nella stessa condizione sperimentale, Nrf2, il principale regolatore positivo di HO-1, trasloca nel nucleo. Tuttavia, l'analisi ChIP mostra chiaramente un aumento del legame di Nrf2 al promotore di HO-1 solo nelle cellule indifferenziate esposte a H_2O_2 , mentre il legame Nrf2-ARE non aumenta nelle cellule differenziate esposte a H_2O_2 . Questo dato sembra essere congruente con quanto osservato dall'analisi dei livelli nucleari di Bach1, che rappresenta il principale regolatore negativo di HO-1. Infatti, solo nelle cellule indifferenziate l'espressione di Bach1 diminuisce in risposta allo stress ossidativo; in questa condizione Bach1 non resta legato alle sequenze ARE e viene degradato al proteasoma. I nostri dati, dimostrano che dopo il differenziamento Bach1 resta legato alla regione del promotore di HO-1, riuscendo così a prevenire il legame di Nrf2 e a reprimere la trascrizione di HO-1. La ratio tra i livelli nucleari di Nrf2 e Bach1 mostra chiaramente il differente comportamento in risposta allo stress ossidativo nelle due condizioni sperimentali. In letteratura, è riportato il ruolo chiave di Bach1 nella regolazione della risposta antiossidante (Zhou et al., 2016); nel cervello di soggetti affetti da sindrome di Down, Bach1 sembra essere up-regolato, con un conseguente aumento del danno ossidativo e un maggiore rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer (Di Domenico et al., 2015) (Su et al., 2016). In questo lavoro è stato riportato

per la prima volta il coinvolgimento dell'acido retinoico come regolatore dell'induzione di HO-1 dipendente da Bach1.

In altri lavori, è stato riportato che l'isoforma Bach2 contribuisce al differenziamento di linee di neuroblastoma murino che tuttavia non esprimono Bach1 (Zhou et al., 2016). Inoltre, era già stato evidenziato che il trattamento con acido retinoico riduce il legame di Nrf2 alle sequenze ARE (Wang et al., 2007) ma non c'erano fino ad oggi evidenze circa il ruolo di Bach1 in questo contesto.

Tuttavia, Nrf2, Bach1 e Keap1 non sono gli unici regolatori della trascrizione di HO-1, anche diversi microRNA sembrano essere coinvolti in questo processo. E' stato osservato che il miR-218 (Yang et al., 2016) e il miR-183 (Ke et al., 2015) down-regolano HO-1, mentre il miR-155 (Pulkkinen et al., 2011) e il miR-196 (Go et al., 2016) sono coinvolti nella regolazione del processing del mRNA di Bach1; inoltre, i livelli di miR-155 vengono drasticamente ridotti dal differenziamento con ATRA (Culpan et al., 2011).

In questo lavoro, abbiamo voluto analizzare il ruolo altri due miRNA, miR-494 e miR-128 i quali, come riportato da altri autori, hanno un ruolo nella modulazione dello stress ossidativo (Faraonio et al., 2012) (Xiong et al., 2014). miR-128 sembra essere coinvolto nel differenziamento delle cellule di NB (Evangelisti et al., 2009) e nella risposta antiossidante (Caggiano et al., 2017); tuttavia, nel nostro lavoro condotto sulle linee di NB SH-SY5Y e SK-N-BE(2C) non abbiamo osservato alcuna modulazione di miR-128 dopo il differenziamento. Pertanto, abbiamo focalizzato l'attenzione sui livelli di miR-494, il quale, secondo analisi di bioinformatica sembra avere due specifici siti di legame sul mRNA di Bach1, che rappresenterebbe quindi un suo target molecolare. Numerose evidenze riportano inoltre il coinvolgimento di miR-494 nella normale senescenza cellulare (Comegna et al., 2014) (Napolitano et al., 2014). Ancora non del tutto chiaro, invece, sembra essere il suo ruolo nella progressione tumorale e se la regolazione di miR-494 sia cellulo-specifica (Latchana et al., 2018). Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato che miR-494 viene espresso anche in cellule di NB indifferenziate, mentre il differenziamento con ATRA ne determina una down-regolazione che diventa particolarmente drastica nella linea SH-SY5Y. In queste cellule indifferenziate, l'inibizione del miR-494 riduce significativamente la vitalità cellulare in seguito al trattamento con H₂O₂, sottolineandone il coinvolgimento nell'adattamento cellulare allo stress ossidativo. Tuttavia, la diminuzione della vitalità cellulare non sembra essere associata ad un aumento dei livelli di apoptosi in quanto l'analisi dell'espressione di BAX e PARP non sembra cambiare in nessuna delle condizioni sperimentali prese in esame. E' possibile ipotizzare quindi che la riduzione

della vitalità possa essere associata ad un rallentamento del ciclo cellulare e quindi ad una ridotta proliferazione. Inoltre, l'inibizione del miR-494 riduce la capacità delle cellule indifferenziate di up-regolare HO-1 in risposta allo stress ossidativo, in modo simile a quanto osservato nelle cellule differenziate per 4 giorni ed esposte a H₂O₂. Infatti, l'inibizione di miR-494 aumenta i livelli di ROS in risposta al trattamento con H₂O₂; al contrario, nelle cellule trasfettate con NegC ed esposte a H₂O₂, l'espressione di HO-1 aumenta, come atteso, e i livelli di ROS non cambiano, a conferma del ruolo svolto da HO-1 nella resistenza delle cellule allo stress ossidativo.

Nonostante analisi bioinformatiche abbiano indicato Bach1 come possibile target di miR-494, nel nostro modello sperimentale, l'inibizione di miR-494 non altera l'espressione di Bach1 in risposta al trattamento con H₂O₂.

Abbiamo anche ipotizzato che l'inibizione di miR-494 potesse modificare Bach1 a livello post-trascrizionale in risposta allo stress ossidativo e quindi abbiamo analizzato tre modifiche post-trascrizionali di Bach1. Mentre l'ubiquitinazione e la sumoilazione di Bach1 non sono state rilevate, l'acetilazione è stata rilevata ma non sembra essere modificata in nessuna delle condizioni sperimentali, dando un'ulteriore conferma di come, nel nostro modello, Bach1 non rappresenti un target di miR-494. Quindi, possiamo affermare che miR-494 modula l'espressione di HO-1 nelle cellule esposte a H₂O₂, in modo indipendente da Bach1, migliorando la capacità di adattamento cellulare all'aumento di ROS. Effettivamente, è riportato in letteratura come la trascrizione di HO-1 possa anche non dipendere direttamente dall'attività nucleare di Bach1 (Tan et al., 2013). Diversi autori hanno valutato il coinvolgimento di vie di segnale alternative tra cui quella di AKT; l'inibizione di miR-494 determinerebbe la up-regolazione di PTEN, il quale sembra essere un regolatore negativo della fosforilazione di AKT, riuscendo quindi ad antagonizzare la trascrizione di HO-1 (Li et al., 2015) (Wang et al., 2016). Tuttavia, occorre specificare che il ruolo di miR-494 nella sopravvivenza cellulare sembra essere ancora controverso, fortemente dipendente dal contesto cellulare in cui i miRNA operano e dalla accessibilità ai geni target. Pertanto, risultano necessarie analisi più approfondite.

CAPITOLO VI

Conclusione

Questo lavoro mette in luce il ruolo centrale di HO-1 nella capacità di adattamento delle cellule di neuroblastoma allo stress ossidativo.

Abbiamo osservato che il differenziamento con ATRA rende le cellule più sensibili allo stress ossidativo mediante una minore up-regolazione di HO-1. Il silenziamento di HO-1 riduce la vitalità delle cellule indifferenziate in risposta allo stress ossidativo, fornendo una prova diretta del ruolo di HO-1 nella sopravvivenza cellulare. La ridotta induzione di HO-1 nelle cellule differenziate esposte a H₂O₂ ha come conseguenza un deficit nella produzione di bilirubina che rende la cellula più sensibile al danno ossidativo. Infatti, la supplementazione con basse dosi di bilirubina sembra prevenire la riduzione della vitalità indotta dal trattamento con H₂O₂.

Abbiamo valutato la regolazione della trascrizione di HO-1 a vari livelli. L'espressione di Keap1, regolatore di Nrf2, diminuisce sia nelle cellule indifferenziate che nelle cellule differenziate trattate con H₂O₂. Nrf2 risponde allo stress ossidativo traslocando nel nucleo sia prima che dopo il differenziamento ma solo nelle cellule indifferenziate riesce a legarsi al promotore della trascrizione di HO-1. I livelli nucleari di Bach1, diminuiscono solo nelle cellule indifferenziate; in questa condizione Bach1 non resta legato alle sequenze ARE e viene degradato. Dopo il differenziamento, Bach1 resta legato al promotore di HO-1, prevenendo il legame di Nrf2 e inibendo la trascrizione di HO-1.

Abbiamo valutato il ruolo di miR-494 nella regolazione di HO-1. Le cellule SH-SY5Y indifferenziate esprimono miR-494 e il differenziamento ne riduce drasticamente i livelli di espressione. L'inibizione di miR-494 riduce la vitalità cellulare in risposta allo stress ossidativo; in questa condizione HO-1 viene down-regolato e i livelli di ROS aumentano. L'inibizione di miR-494 non modifica i livelli di Bach1 in risposta allo stress ossidativo; quindi, miR-494 ha un ruolo nella regolazione di HO-1, in modo indipendente da Bach1.

In conclusione, possiamo affermare che diverse vie di segnale convergono nella regolazione dell'espressione di HO-1, evidenziando l'importanza di questo sistema per contrastare lo stress ossidativo nella cellula neuronale. Tuttavia, l'eccessiva/disregolata espressione di HO-1 può favorire il mantenimento di un fenotipo neoplastico. In questi termini, la caratterizzazione delle vie di segnale che regolano HO-1 è di notevole importanza per l'individuazione di nuovi target farmacologici.

BIBLIOGRAFIA

- Baba, K., Morimoto, H., and Imaoka, S. (2013). Seven in absentia homolog 2 (Siah2) protein is a regulator of NF-E2-related factor 2 (Nrf2). *J. Biol. Chem.* *288*, 18393–18405.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., and Vercellotti, G.M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* *267*, 18148–18153.
- Barañano, D.E., and Snyder, S.H. (2001). Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10996–11002.
- Baxter, P.S., Bell, K.F.S., Hasel, P., Kaindl, A.M., Fricker, M., Thomson, D., Cregan, S.P., Gillingwater, T.H., and Hardingham, G.E. (2015). Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nat. Commun.* *6*, 6761.
- Beckman, J.D., Chen, C., Nguyen, J., Thayanithy, V., Subramanian, S., Steer, C.J., and Vercellotti, G.M. (2011). Regulation of heme oxygenase-1 protein expression by miR-377 in combination with miR-217. *J. Biol. Chem.* *286*, 3194–3202.
- Bell, K.F.S., Al-Mubarak, B., Martel, M.-A., McKay, S., Wheelan, N., Hasel, P., Márkus, N.M., Baxter, P., Deighton, R.F., Serio, A., et al. (2015). Neuronal development is promoted by weakened intrinsic antioxidant defences due to epigenetic repression of Nrf2. *Nat. Commun.* *6*, 7066.
- Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* *278*, 44675–44682.
- Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., and Park, B.K. (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 705–717.
- Butterfield, D.A., Perluigi, M., Reed, T., Muharib, T., Hughes, C.P., Robinson, R.A.S., and Sultana, R. (2012a). Redox Proteomics in Selected Neurodegenerative Disorders: From Its Infancy to Future Applications. *Antioxid. Redox Signal.* *17*, 1610–1655.
- Butterfield, D.A., Barone, E., Di Domenico, F., Cenini, G., Sultana, R., Murphy, M.P., Mancuso, C., and Head, E. (2012b). Atorvastatin treatment in a dog preclinical model of Alzheimer's disease leads to up-regulation of haem oxygenase-1 and is associated with reduced oxidative stress in brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *15*, 981–987.
- Caggiano, R., Cattaneo, F., Moltedo, O., Esposito, G., Perrino, C., Trimarco, B., Ammendola, R., and Faraonio, R. (2017). miR-128 Is Implicated in Stress Responses by Targeting MAFK in Skeletal Muscle Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*, 9308310.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Fariello, R.G., Giuffrida Stella, A.M., and Abraham, N.G. (2002). Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance. *J. Neurosci. Res.* *68*, 65–75.
- Catino, S., Paciello, F., Miceli, F., Rolesi, R., Troiani, D., Calabrese, V., Santangelo, R., and Mancuso, C. (2015). Ferulic Acid Regulates the Nrf2/Heme Oxygenase-1 System and Counteracts

- Trimethyltin-Induced Neuronal Damage in the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Front. Pharmacol.* *6*, 305.
- Chambaut-Guérin, A.M., Hérigault, S., Rouet-Benzineb, P., Rouher, C., and Lafuma, C. (2000). Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J. Neurochem.* *74*, 508–517.
- Chen, J. (2014). Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. *Rev. Neurosci.* *25*, 269–280.
- Chen, J., Tu, Y., Moon, C., Nagata, E., and Ronnett, G.V. (2003). Heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 have distinct roles in the proliferation and survival of olfactory receptor neurons mediated by cGMP and bilirubin, respectively. *J. Neurochem.* *85*, 1247–1261.
- Comegna, M., Succio, M., Napolitano, M., Vitale, M., D’Ambrosio, C., Scaloni, A., Passaro, F., Zambrano, N., Cimino, F., and Faraonio, R. (2014). Identification of miR-494 direct targets involved in senescence of human diploid fibroblasts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *28*, 3720–3733.
- Culpan, D., Kehoe, P.G., and Love, S. (2011). Tumour necrosis factor- α (TNF- α) and miRNA expression in frontal and temporal neocortex in Alzheimer’s disease and the effect of TNF- α on miRNA expression in vitro. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* *2*, 156–162.
- Danka Mohammed, C.P., Park, J.S., Nam, H.G., and Kim, K. (2017). MicroRNAs in brain aging. *Mech. Ageing Dev.* *168*, 3–9.
- Di Domenico, F., Pupo, G., Mancuso, C., Barone, E., Paolini, F., Arena, A., Blarmino, C., Schmitt, F.A., Head, E., Butterfield, D.A., et al. (2015). Bach1 overexpression in Down syndrome correlates with the alteration of the HO-1/BVR-a system: insights for transition to Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *44*, 1107–1120.
- Dringen, R., Pfeiffer, B., and Hamprecht, B. (1999). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 562–569.
- Dringen, R., Pawlowski, P.G., and Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* *79*, 157–165.
- Evangelisti, C., Florian, M.C., Massimi, I., Dominici, C., Giannini, G., Galardi, S., Buè, M.C., Massalini, S., McDowell, H.P., Messi, E., et al. (2009). MiR-128 up-regulation inhibits Reelin and DCX expression and reduces neuroblastoma cell motility and invasiveness. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 4276–4287.
- Faraonio, R., Salerno, P., Passaro, F., Sedia, C., Iaccio, A., Bellelli, R., Nappi, T.C., Comegna, M., Romano, S., Salvatore, G., et al. (2012). A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ.* *19*, 713–721.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* *443*, 3–11.
- Fest, S., Soldati, R., Christiansen, N.M., Zenclussen, M.L., Kilz, J., Berger, E., Starke, S., Lode, H.N., Engel, C., Zenclussen, A.C., et al. (2016). Targeting of heme oxygenase-1 as a novel immune regulator of neuroblastoma. *Int. J. Cancer* *138*, 2030–2042.

- Furfaro, A.L., Macay, J.R.Z., Marengo, B., Nitti, M., Parodi, A., Fenoglio, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Domenicotti, C., and Traverso, N. (2012). Resistance of neuroblastoma GI-ME-N cell line to glutathione depletion involves Nrf2 and heme oxygenase-1. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 488–496.
- Furfaro, A.L., Piras, S., Passalacqua, M., Domenicotti, C., Parodi, A., Fenoglio, D., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Moretta, L., Traverso, N., et al. (2014). HO-1 up-regulation: a key point in high-risk neuroblastoma resistance to bortezomib. *Biochim. Biophys. Acta* *1842*, 613–622.
- Furfaro, A.L., Piras, S., Domenicotti, C., Fenoglio, D., De Luigi, A., Salmona, M., Moretta, L., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N., et al. (2016). Role of Nrf2, HO-1 and GSH in Neuroblastoma Cell Resistance to Bortezomib. *PLoS One* *11*, e0152465.
- Gazzin, S., Vitek, L., Watchko, J., Shapiro, S.M., and Tiribelli, C. (2016). A Novel Perspective on the Biology of Bilirubin in Health and Disease. *Trends Mol. Med.* *22*, 758–768.
- Gegg, M.E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J.P., Clark, J.B., Moncada, S., and Heales, S.J.R. (2003). Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J. Neurochem.* *86*, 228–237.
- Go, H., La, P., Namba, F., Ito, M., Yang, G., Brydun, A., Igarashi, K., and Dennery, P.A. (2016). MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *311*, L400–411.
- Gorrini, C., Baniasadi, P.S., Harris, I.S., Silvester, J., Inoue, S., Snow, B., Joshi, P.A., Wakeham, A., Molyneux, S.D., Martin, B., et al. (2013). BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J. Exp. Med.* *210*, 1529–1544.
- Gupta, A., Lacoste, B., Pistell, P.J., Pistel, P.J., Ingram, D.K., Hamel, E., Alaoui-Jamali, M.A., Szarek, W.A., Vlahakis, J.Z., Jie, S., et al. (2014). Neurotherapeutic effects of novel HO-1 inhibitors in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *131*, 778–790.
- Hall, C.N., Klein-Flügge, M.C., Howarth, C., and Attwell, D. (2012). Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8940–8951.
- Hascalovici, J.R., Song, W., Vaya, J., Khatib, S., Fuhrman, B., Aviram, M., and Schipper, H.M. (2009). Impact of heme oxygenase-1 on cholesterol synthesis, cholesterol efflux and oxysterol formation in cultured astroglia. *J. Neurochem.* *108*, 72–81.
- Hasel, P., McKay, S., Qiu, J., and Hardingham, G.E. (2015). Selective dendritic susceptibility to bioenergetic, excitotoxic and redox perturbations in cortical neurons. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 2066–2076.
- Hayes, J.D., and Dinkova-Kostova, A.T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 199–218.
- Hayes, J.D., and McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 176–188.

- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* *11*, 747–752.
- Hettiarachchi, N., Dallas, M., Al-Owais, M., Griffiths, H., Hooper, N., Scragg, J., Boyle, J., and Peers, C. (2014). Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid- β (1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production. *Cell Death Dis.* *5*, e1569.
- Higgins, L.G., and Hayes, J.D. (2011). Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* *43*, 92–137.
- Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2012). Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10228–10239.
- Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 411–421.
- Hongpaisan, J., Winters, C.A., and Andrews, S.B. (2003). Calcium-dependent mitochondrial superoxide modulates nuclear CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 1103–1115.
- Hoshino, H., and Igarashi, K. (2002). Expression of the oxidative stress-regulated transcription factor bach2 in differentiating neuronal cells. *J. Biochem. (Tokyo)* *132*, 427–431.
- Hou, W., Tian, Q., Steuerwald, N.M., Schrum, L.W., and Bonkovsky, H.L. (2012). The let-7 microRNA enhances heme oxygenase-1 by suppressing Bach1 and attenuates oxidant injury in human hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 1113–1122.
- Hung, S.-Y., Liou, H.-C., and Fu, W.-M. (2010). The mechanism of heme oxygenase-1 action involved in the enhancement of neurotrophic factor expression. *Neuropharmacology* *58*, 321–329.
- Jacob, K.D., Hooten, N.N., Trzeciak, A.R., and Evans, M.K. (2013). Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. *Mech. Ageing Dev.* *134*, 139–157.
- Jaiswal, A.K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* *36*, 1199–1207.
- Jaramillo, M.C., and Zhang, D.D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* *27*, 2179–2191.
- Jauhari, A., Singh, T., Pandey, A., Singh, P., Singh, N., Srivastava, A.K., Pant, A.B., Parmar, D., and Yadav, S. (2017). Differentiation Induces Dramatic Changes in miRNA Profile, Where Loss of Dicer Diverts Differentiating SH-SY5Y Cells Toward Senescence. *Mol. Neurobiol.* *54*, 4986–4995.
- Kabaria, S., Choi, D.C., Chaudhuri, A.D., Jain, M.R., Li, H., and Junn, E. (2015). MicroRNA-7 activates Nrf2 pathway by targeting Keap1 expression. *Free Radic. Biol. Med.* *89*, 548–556.
- Kang, H.J., Hong, Y.B., Kim, H.J., and Bae, I. (2010). CR6-interacting factor 1 (CRIF1) regulates NF-E2-related factor 2 (NRF2) protein stability by proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* *285*, 21258–21268.

- Kapitulnik, J., Benaim, C., and Sasson, S. (2012). Endothelial Cells Derived from the Blood-Brain Barrier and Islets of Langerhans Differ in their Response to the Effects of Bilirubin on Oxidative Stress Under Hyperglycemic Conditions. *Front. Pharmacol.* *3*, 131.
- Kaspar, J.W., and Jaiswal, A.K. (2010). Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J. Biol. Chem.* *285*, 153–162.
- Kato, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., and Yamamoto, M. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *6*, 857–868.
- Ke, K., Sul, O.-J., Rajasekaran, M., and Choi, H.-S. (2015). MicroRNA-183 increases osteoclastogenesis by repressing heme oxygenase-1. *Bone* *81*, 237–246.
- Kim, J., Lim, J., Kang, B.Y., Jung, K., and Choi, H.J. (2017). Capillarasin augments anti-oxidative and anti-inflammatory responses by activating Nrf2/HO-1 signaling. *Neurochem. Int.* *105*, 11–20.
- Kim, J.-H., Yu, S., Chen, J.D., and Kong, A.N. (2013). The nuclear cofactor RAC3/AIB1/SRC-3 enhances Nrf2 signaling by interacting with transactivation domains. *Oncogene* *32*, 514–527.
- Kitamura, Y., Ishida, Y., Takata, K., Mizutani, H., Kakimura, J., Inden, M., Nakata, J., Taniguchi, T., Tsukahara, T., Akaike, A., et al. (2003). Hyperbilirubinemia protects against focal ischemia in rats. *J. Neurosci. Res.* *71*, 544–550.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., et al. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 213–223.
- Kurinna, S., and Werner, S. (2015). NRF2 and microRNAs: new but awaited relations. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 595–601.
- Latchana, N., DiVincenzo, M.J., Regan, K., Abrams, Z., Zhang, X., Jacob, N.K., Gru, A.A., Fadda, P., Markowitz, J., Howard, J.H., et al. (2018). Alterations in patient plasma microRNA expression profiles following resection of metastatic melanoma. *J. Surg. Oncol.* *118*, 501–509.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A., and Zhang, D.D. (2013). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 91–93.
- Li, Q., Xiao, H., and Isobe, K. (2002). Histone acetyltransferase activities of cAMP-regulated enhancer-binding protein and p300 in tissues of fetal, young, and old mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *57*, B93-98.
- Li, X.-T., Wang, H.-Z., Wu, Z.-W., Yang, T.-Q., Zhao, Z.-H., Chen, G.-L., Xie, X.-S., Li, B., Wei, Y.-X., Huang, Y.-L., et al. (2015). miR-494-3p Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by PTEN/AKT Signaling in Human Glioblastoma Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *35*, 679–687.
- Lin, S.-H., Song, W., Cressatti, M., Zukor, H., Wang, E., and Schipper, H.M. (2015). Heme oxygenase-1 modulates microRNA expression in cultured astroglia: implications for chronic brain disorders. *Glia* *63*, 1270–1284.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2015). HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascul. Pharmacol.* *74*, 11–22.

- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 3221–3247.
- Maines, M.D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2, 2557–2568.
- Malloy, M.T., McIntosh, D.J., Walters, T.S., Flores, A., Goodwin, J.S., and Arinze, I.J. (2013). Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 288, 14569–14583.
- Mancuso, C. (2017). Bilirubin and brain: A pharmacological approach. *Neuropharmacology* 118, 113–123.
- Maruhashi, T., Soga, J., Fujimura, N., Idei, N., Mikami, S., Iwamoto, Y., Kajikawa, M., Matsumoto, T., Kihara, Y., Chayama, K., et al. (2012). Hyperbilirubinemia, augmentation of endothelial function, and decrease in oxidative stress in Gilbert syndrome. *Circulation* 126, 598–603.
- McBean, G.J., Aslan, M., Griffiths, H.R., and Torrão, R.C. (2015). Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. *Redox Biol.* 5, 186–194.
- Menegon, S., Columbano, A., and Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* 22, 578–593.
- Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G., and Tredici, G. (2004). Retinoic acid-induced neurogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J. Neurosci. Res.* 75, 241–252.
- Miñones-Moyano, E., Porta, S., Escaramís, G., Rabionet, R., Iraola, S., Kagerbauer, B., Espinosa-Parrilla, Y., Ferrer, I., Estivill, X., and Martí, E. (2011). MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3067–3078.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9926–9930.
- Morita, K., Lee, M.-S., and Her, S. (2009). Possible relation of hemin-induced HO-1 expression to the upregulation of VEGF and BDNF mRNA levels in rat C6 glioma cells. *J. Mol. Neurosci.* MN 38, 31–40.
- Motterlini, R., Haas, B., and Foresti, R. (2012). Emerging concepts on the anti-inflammatory actions of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs). *Med. Gas Res.* 2, 28.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Napolitano, M., Comegna, M., Succio, M., Leggiero, E., Pastore, L., Faraonio, R., Cimino, F., and Passaro, F. (2014). Comparative analysis of gene expression data reveals novel targets of senescence-associated microRNAs. *PloS One* 9, e98669.
- Nitti, M., Furfaro, A.L., Traverso, N., Odetti, P., Storace, D., Cottalasso, D., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., and Domenicotti, C. (2007). PKC delta and NADPH oxidase in AGE-induced neuronal death. *Neurosci. Lett.* 416, 261–265.

- Nitti, M., Furfaro, A.L., Cevasco, C., Traverso, N., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., and Domenicotti, C. (2010). PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation. *Cell. Signal.* 22, 828–835.
- Nitti, M., Piras, S., Marinari, U.M., Moretta, L., Pronzato, M.A., and Furfaro, A.L. (2017). HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxid. Basel Switz.* 6.
- Ostrow, J.D., Pascolo, L., Shapiro, S.M., and Tiribelli, C. (2003). New concepts in bilirubin encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 988–997.
- Otsuki, A., Suzuki, M., Katsuoka, F., Tsuchida, K., Suda, H., Morita, M., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2016). Unique cisrome defined as CsMBE is strictly required for Nrf2-sMaf heterodimer function in cytoprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 45–57.
- Paladino, S., Conte, A., Caggiano, R., Pierantoni, G.M., and Faraonio, R. (2018). Nrf2 Pathway in Age-Related Neurological Disorders: Insights into MicroRNAs. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 47, 1951–1976.
- Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 4, 89–96.
- Piras, S., Furfaro, A.L., Piccini, A., Passalacqua, M., Borghi, R., Carminati, E., Parodi, A., Colombo, L., Salmons, M., Pronzato, M.A., et al. (2014). Monomeric A β 1-42 and RAGE: key players in neuronal differentiation. *Neurobiol. Aging* 35, 1301–1308.
- Piras, S., Furfaro, A.L., Brondolo, L., Passalacqua, M., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., and Nitti, M. (2017). Differentiation impairs Bach1 dependent HO-1 activation and increases sensitivity to oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Sci. Rep.* 7.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., and Castello, P.R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 20, 332–340.
- Pulkkinen, K.H., Ylä-Herttuala, S., and Levonen, A.-L. (2011). Heme oxygenase 1 is induced by miR-155 via reduced BACH1 translation in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 2124–2131.
- Qaisiya, M., Coda Zabetta, C.D., Bellarosa, C., and Tiribelli, C. (2014). Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell. Signal.* 26, 512–520.
- Qaisiya, M., Brischetto, C., Jašprová, J., Vitek, L., Tiribelli, C., and Bellarosa, C. (2017). Bilirubin-induced ER stress contributes to the inflammatory response and apoptosis in neuronal cells. *Arch. Toxicol.* 91, 1847–1858.
- Rada, P., Rojo, A.I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J.D., and Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1121–1133.
- Raju, V.S., McCoubrey, W.K., and Maines, M.D. (1997). Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim. Biophys. Acta* 1351, 89–104.
- Rodrigues, C.M.P., Solá, S., Silva, R.F.M., and Brites, D. (2002). Aging confers different sensitivity to the neurotoxic properties of unconjugated bilirubin. *Pediatr. Res.* 51, 112–118.

- Rushmore, T.H., Morton, M.R., and Pickett, C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* *266*, 11632–11639.
- Scapagnini, G., D'Agata, V., Calabrese, V., Pascale, A., Colombrita, C., Alkon, D., and Cavallaro, S. (2002). Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* *954*, 51–59.
- Schipper, H.M. (2004). Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1012*, 84–93.
- Schipper, H.M., Bennett, D.A., Liberman, A., Bienias, J.L., Schneider, J.A., Kelly, J., and Arvanitakis, Z. (2006). Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* *27*, 252–261.
- Schipper, H.M., Song, W., Zukor, H., Hascalovici, J.R., and Zeligman, D. (2009). Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J. Neurochem.* *110*, 469–485.
- Sedlak, T.W., Saleh, M., Higginson, D.S., Paul, B.D., Juluri, K.R., and Snyder, S.H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5171–5176.
- Shenvi, S.V., Smith, E., and Hagen, T.M. (2012). Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the *Gclc* promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the aging rat liver? *Aging Cell* *11*, 297–304.
- Silva, R.F.M., Rodrigues, C.M.P., and Brites, D. (2002). Rat cultured neuronal and glial cells respond differently to toxicity of unconjugated bilirubin. *Pediatr. Res.* *51*, 535–541.
- Song, W., Su, H., Song, S., Paudel, H.K., and Schipper, H.M. (2006). Over-expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia. *J. Cell. Physiol.* *206*, 655–663.
- Song, W., Patel, A., Qureshi, H.Y., Han, D., Schipper, H.M., and Paudel, H.K. (2009). The Parkinson disease-associated A30P mutation stabilizes alpha-synuclein against proteasomal degradation triggered by heme oxygenase-1 over-expression in human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* *110*, 719–733.
- Song, W., Zukor, H., Liberman, A., Kaduri, S., Arvanitakis, Z., Bennett, D.A., and Schipper, H.M. (2014). Astroglial heme oxygenase-1 and the origin of corpora amylacea in aging and degenerating neural tissues. *Exp. Neurol.* *254*, 78–89.
- Song, W., Cressatti, M., Zukor, H., Liberman, A., Galindez, C., and Schipper, H.M. (2017). Parkinsonian features in aging GFAP.HMOX1 transgenic mice overexpressing human HO-1 in the astroglial compartment. *Neurobiol. Aging* *58*, 163–179.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* *235*, 1043–1046.
- Su, C., Shi, Q., Song, X., Fu, J., Liu, Z., Wang, Y., Wang, Y., Xia, X., Song, E., and Song, Y. (2016). Tetrachlorobenzoquinone induces Nrf2 activation via rapid Bach1 nuclear export/ubiquitination and JNK-P62 signaling. *Toxicology* *363–364*, 48–57.

- Sun, Z., Chin, Y.E., and Zhang, D.D. (2009). Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2658–2672.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Sun, J., Doi, H., Satomi, S., and Igarashi, K. (2003). Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* *278*, 49246–49253.
- Takeda, A., Perry, G., Abraham, N.G., Dwyer, B.E., Kutty, R.K., Laitinen, J.T., Petersen, R.B., and Smith, M.A. (2000). Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *J. Biol. Chem.* *275*, 5395–5399.
- Tan, M.-K.M., Lim, H.-J., Bennett, E.J., Shi, Y., and Harper, J.W. (2013). Parallel SCF adaptor capture proteomics reveals a role for SCFFBXL17 in NRF2 activation via BACH1 repressor turnover. *Mol. Cell* *52*, 9–24.
- Tebay, L.E., Robertson, H., Durant, S.T., Vitale, S.R., Penning, T.M., Dinkova-Kostova, A.T., and Hayes, J.D. (2015). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* *88*, 108–146.
- Tibullo, D., Giallongo, C., Puglisi, F., Tomassoni, D., Camiolo, G., Cristaldi, M., Brundo, M.V., Anfuso, C.D., Lupo, G., Stampone, T., et al. (2018). Effect of Lipoic Acid on the Biochemical Mechanisms of Resistance to Bortezomib in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Mol. Neurobiol.* *55*, 3344–3350.
- Tomasi, M.L., Ryoo, M., Yang, H., Iglesias Ara, A., Ko, K.S., and Lu, S.C. (2014). Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-mediated inhibition of glutathione synthesis in mice. *Free Radic. Biol. Med.* *68*, 148–158.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2887–2900.
- Tsou, Y.-H., Shih, C.-T., Ching, C.-H., Huang, J.-Y., Jen, C.J., Yu, L., Kuo, Y.-M., Wu, F.-S., and Chuang, J.-I. (2015). Treadmill exercise activates Nrf2 antioxidant system to protect the nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP+ toxicity. *Exp. Neurol.* *263*, 50–62.
- Ursini, F., Maiorino, M., and Forman, H.J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol.* *8*, 205–215.
- Uruno, A., Yagishita, Y., Katsuoka, F., Kitajima, Y., Nunomiya, A., Nagatomi, R., Pi, J., Biswal, S.S., and Yamamoto, M. (2016). Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 1655–1672.
- Vargas, M.R., and Johnson, J.A. (2009). The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev. Mol. Med.* *11*, e17.
- Vaya, J., and Schipper, H.M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J. Neurochem.* *102*, 1727–1737.
- Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J.D., et al. (2013). RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* *73*, 3097–3108.

- Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., Luo, M., Wu, Q., Yu, L., and Chu, H. (2015). Transcriptional upregulation of HO-1 by EGB via the MAPKs/Nrf2 pathway in mouse C2C12 myoblasts. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *29*, 380–388.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., Henderson, C.J., and Wolf, C.R. (2007). Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19589–19594.
- Wang, Y., Xu, J., Gao, G., Li, J., Huang, H., Jin, H., Zhu, J., Che, X., and Huang, C. (2016). Tumor-suppressor NFκB2 p100 interacts with ERK2 and stabilizes PTEN mRNA via inhibition of miR-494. *Oncogene* *35*, 4080–4090.
- Wang, Y., Ding, N., Guan, G., Liu, G., Huo, D., Li, Y., Wei, K., Yang, J., Cheng, P., and Zhu, C. (2018). Rapid Delivery of Hsa-miR-590-3p Using Targeted Exosomes to Treat Acute Myocardial Infarction Through Regulation of the Cell Cycle. *J. Biomed. Nanotechnol.* *14*, 968–977.
- Watts, R.N., Ponka, P., and Richardson, D.R. (2003). Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochem. J.* *369*, 429–440.
- Wegiel, B., Nemeth, Z., Correa-Costa, M., Bulmer, A.C., and Otterbein, L.E. (2014). Heme oxygenase-1: a metabolic nuke. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1709–1722.
- Xiong, R., Wang, Z., Zhao, Z., Li, H., Chen, W., Zhang, B., Wang, L., Wu, L., Li, W., Ding, J., et al. (2014). MicroRNA-494 reduces DJ-1 expression and exacerbates neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* *35*, 705–714.
- Yang, H., Wang, Q., and Li, S. (2016). MicroRNA-218 promotes high glucose-induced apoptosis in podocytes by targeting heme oxygenase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *471*, 582–588.
- Yao, P.-L., Chen, L., Dobrzański, T.P., Zhu, B., Kang, B.-H., Müller, R., Gonzalez, F.J., and Peters, J.M. (2017). Peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ inhibits human neuroblastoma cell tumorigenesis by inducing p53- and SOX2-mediated cell differentiation. *Mol. Carcinog.* *56*, 1472–1483.
- Ye, F., Li, X., Li, L., Yuan, J., and Chen, J. (2016). t-BHQ Provides Protection against Lead Neurotoxicity via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 2075915.
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K., and Igarashi, K. (2007). Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6962–6971.
- Zhang, H., and Forman, H.J. (2009). Signaling pathways involved in phase II gene induction by alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Toxicol. Ind. Health* *25*, 269–278.
- Zhang, H., Davies, K.J.A., and Forman, H.J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic. Biol. Med.* *88*, 314–336.
- Zhao, J., Cheng, Y.-Y., Fan, W., Yang, C.-B., Ye, S.-F., Cui, W., Wei, W., Lao, L.-X., Cai, J., Han, Y.-F., et al. (2015). Botanical drug puerarin coordinates with nerve growth factor in the regulation of neuronal survival and neurogenesis via activating ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in the neurite extension process. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 61–70.

Zhou, L., Zhang, H., Davies, K.J.A., and Forman, H.J. (2018). Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells. *Redox Biol.* *14*, 35–40.

Zhou, X., Zhao, L., Mao, J., Huang, J., and Chen, J. (2015). Antioxidant effects of hydrogen sulfide on left ventricular remodeling in smoking rats are mediated via PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *144*, 197–203.

Zhou, Y., Wu, H., Zhao, M., Chang, C., and Lu, Q. (2016). The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *50*, 345–356.