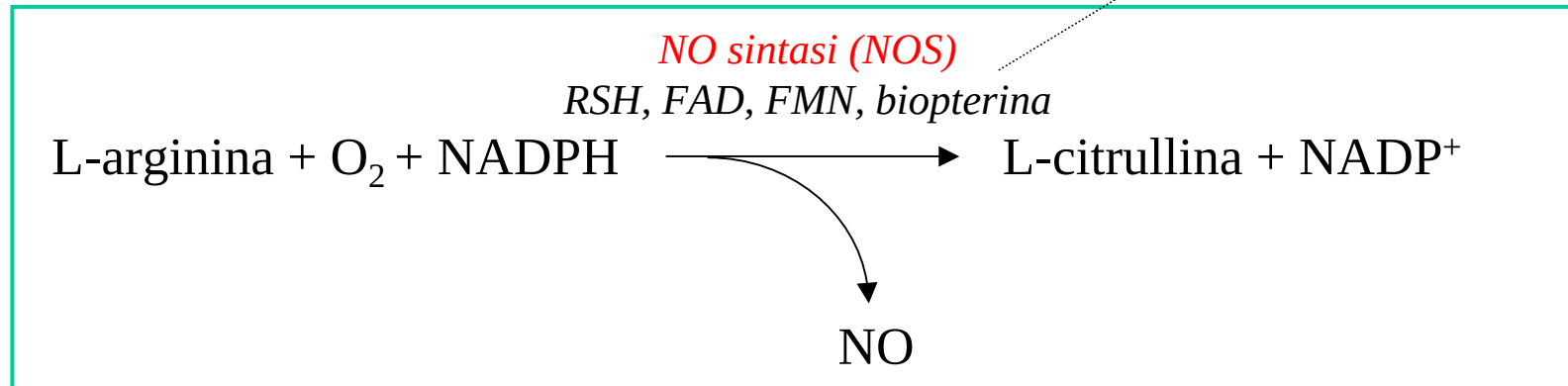


OSSIDO NITRICO

Se manca si produce superossido invece di NO

Endothelium derived relaxing factor (EDRF)

Radicale gassoso, diffusibile, a breve emivita



	eNOS	nNOS	iNOS
Originally cloned from	endothelial cells	neuronal cells	macrophages
Tissue expression	cardiac myocytes platelets, neurones	skeletal muscle, neutrophils, VSMC*	cardiac myocytes, glial cells, VSMC*, endothelium, neurones
Gene encoding and its position	<i>NOS3</i> 7q35-36	<i>NOS1</i> 12q24.2-31	<i>NOS2</i> 17q11.2-12
Major regulatory mechanism	Ca ⁺² dependent (Ca-calmodulin) Ca ⁺² independent (phosphorylation, palmitoylation)	Ca ⁺² dependent (Ca-dystrophin)	Ca ⁺² independent; transcriptional regulation e.g. by NF-κB
Subcellular localisation	Golgi apparatus plasmalemmal caveolae	cytosol endoplasmic reticulum sarcolemma postsynaptic densities caveolae (caveolin 3)	phagosomes

L'NO esiste come 3 specie che si possono interconvertire

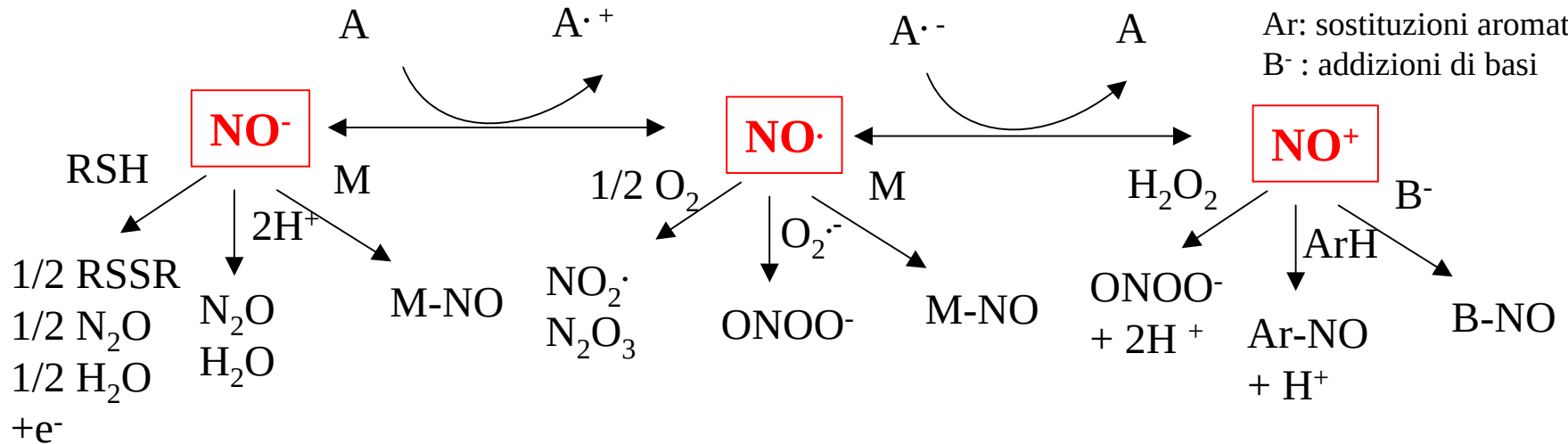
A: accettore di elettroni

M: metalli

RSH: tioli

Ar: sostituzioni aromatiche

B⁻: addizioni di basi



Anione nitrossile
N° ossidazione +1

Radicale
N° ossidazione +2

Catione nitrosonio
N° ossidazione +3

Il legame N-O nelle 3 specie ha una diversa forza e questo spiega le differenze in termini di proprietà biochimiche ed effetti biologici

L' NO· lega le emoproteine ed i centri ferro-zolfo

L' NO⁺ in composti nitrosi dà reazioni di nitrosazione con gruppi nucleofili (tioli, ammine, anelli aromatici, ecc)

L' NO⁻ dimerizza e si deidrata generando ossido di azoto (N₂O) o reagisce con i tioli (per dare ossidazione dei gruppi sulfidrilici) ed i metalli

Secondo messaggero

Rilassamento della muscolatura liscia

Inibizione piastrinica

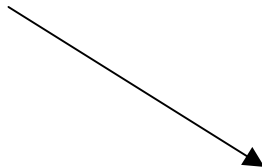
Neurotrasmissione

Regolazione immunologica

Differenziamento cellulare

Morfogenesi tissutale

Citossicità



Shock septico

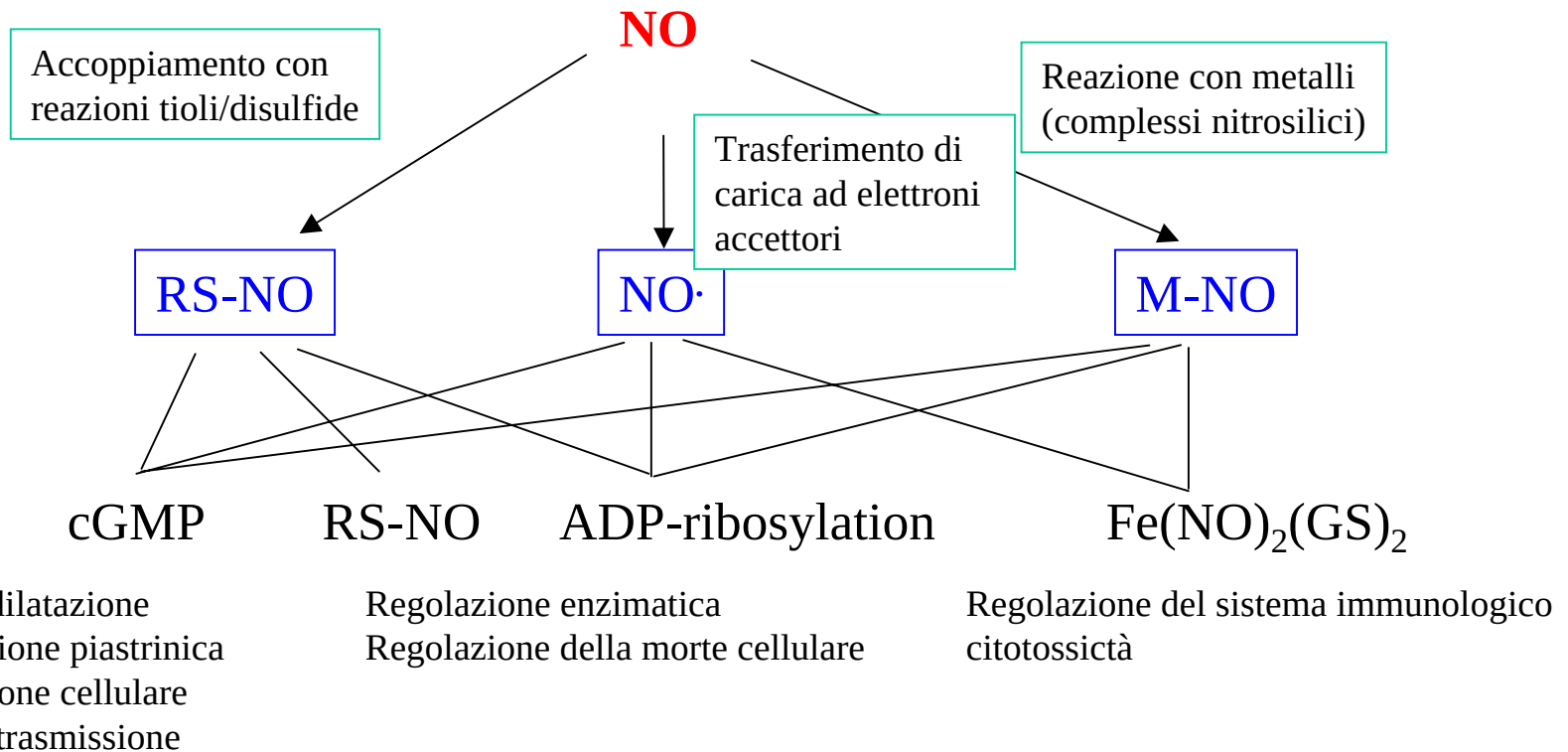
Difesa immunitaria non-specifica (tumori e patogeni intracellulari)

Patologie neurodegenerative acute e croniche

Distruzione delle cellule β nel diabete mellito

Rigetto di trapianti

Interazioni con effettori specifici e risposta biologica



cGMP-DIPENDENTI

cGMP-INDIPENDENTI

l'NO si lega al gruppo eme della guanilato ciclasasi solubile attivandola

inibizione di centri Fe-S

danno al DNA

ADP-ribosilazione --> privazione di energia e

S-nitrosazione di proteine

ossidazione a ac. sulfenico e sulfinico

nitratura di tirosine

	SIGNALING			TOXICITY	
	SNO	SSR	SOH	SO ₂ H	SO ₃ H
	Reversible			Irreversible	
<u>1. NITROSANT</u>					
NO	+	-	-	-	-
R-SNO	-	+	-	-	-
N ₂ O ₃	-	-	(-)	-	-
<u>2. NITROSANT / OXIDANT</u>					
OONO ⁻	-	-	-	+	+
<u>3. OXIDANT</u>					
O ₂	-	-	-	-	+
O ₂ ^{-•}	-	-	(-)	+	-
H ₂ O ₂	-	-	-	+	-
OH [•]	-	-	-	+	-

L'NO reagisce con diversi gruppi chimici dando reazioni reversibili o irreversibili.
 Le reazioni reversibili sono collegate al signalling --> sopravvivenza cellulare
 Le reazioni irreversibili sono collegate agli effetti tossici

S-nitrosazione

Avviene in presenza di ossigeno

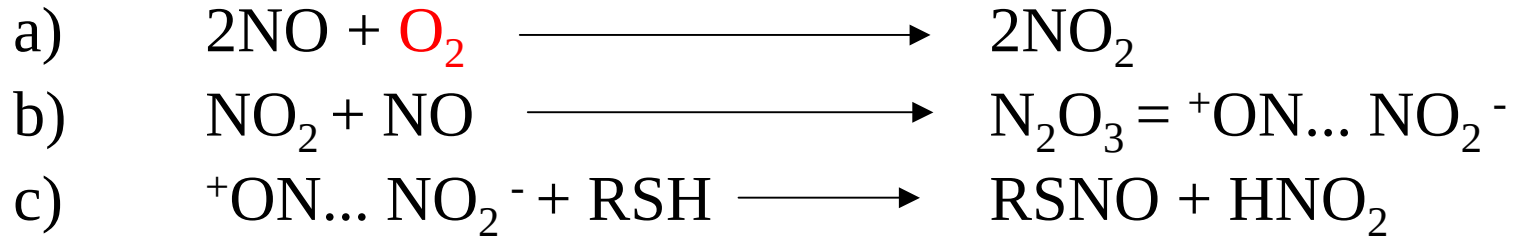
Perdita della funzione da parte delle proteine

Regola la trasduzione del segnale

Aumenta attività

{ p21
tioredossina
NF-kB
AP-1
Oxy-R
HIF-1 α
Transglutaminasi (FXIII)
JNK
Caspasi
GAPDH
Emoglobina

Sintesi di SNO (S-nitrosotiole)



Reazione di terzo ordine

La reazione limitante è la prima (NO è nanomolare e O₂ è micromolare)

O₂ è accettore di elettroni, ma possono essere anche NAD⁺ o metalloproteine (emoglobina, ceruloplasmina)

- Attacco elettrofilico di NO⁺ a tiole
- Attacco di NO⁻ a gruppi SH di cisteine elettropositivi (recettore NMDA)
- Direttamente da NOS (si forma NO⁻ o NO + superossido in presenza di GSH)

Catabolismo di SNO (S-nitrosotio)

E' importante per reazioni di transnitrosazione e per compartimentalizzazione (caspasi inattive nello spazio intermembranale dei mitocondri, poi attive nel citosol)

INORGANICO: fotolisi

rame

mercurio

ORGANICO: Xantina/xantina ossidasi

tioredossina/tioredossina riduttasi

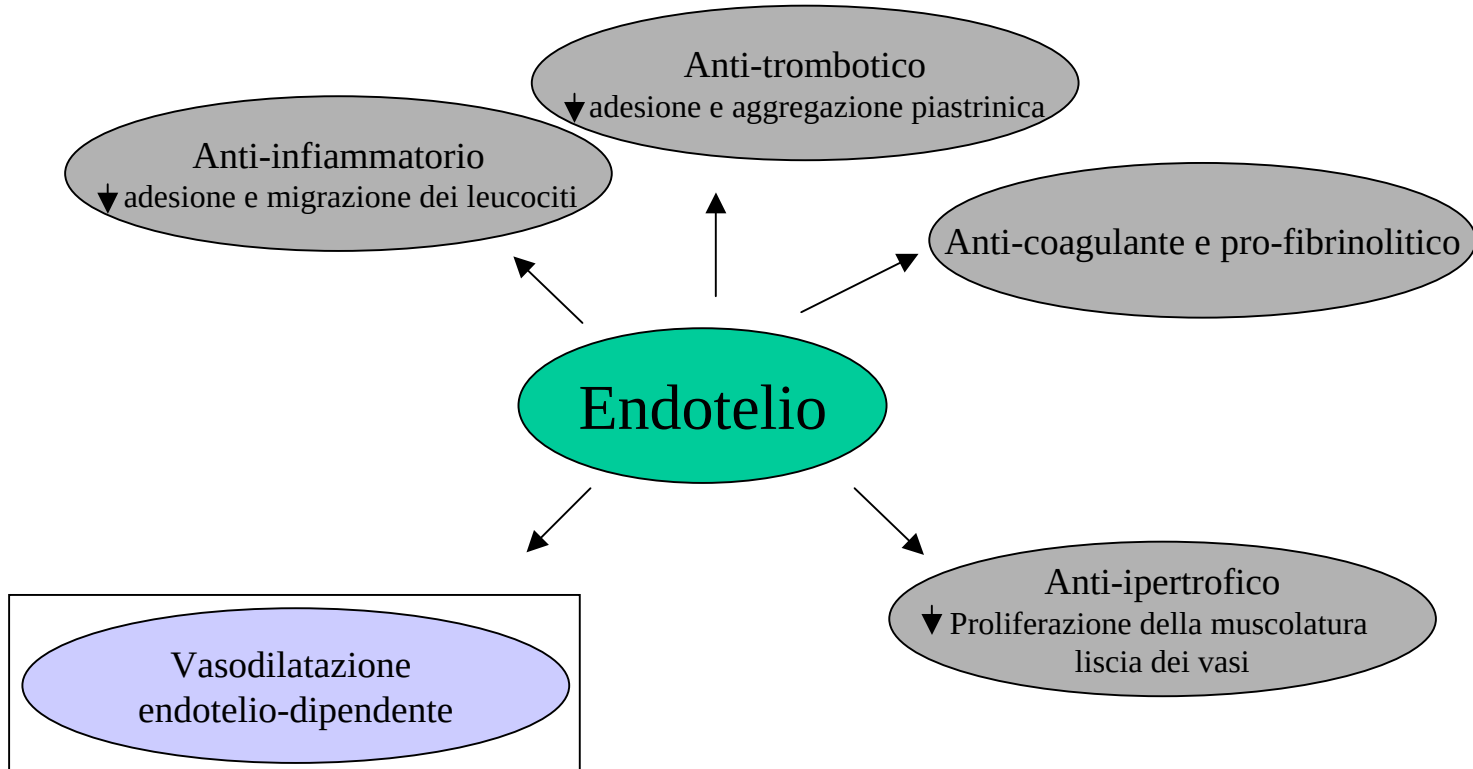
g-glutamyl transeptidasi

glutathione perossidasi

SOD

formaldeide deidrogenasi glutathione-dipendente (GSNO riduttasi)

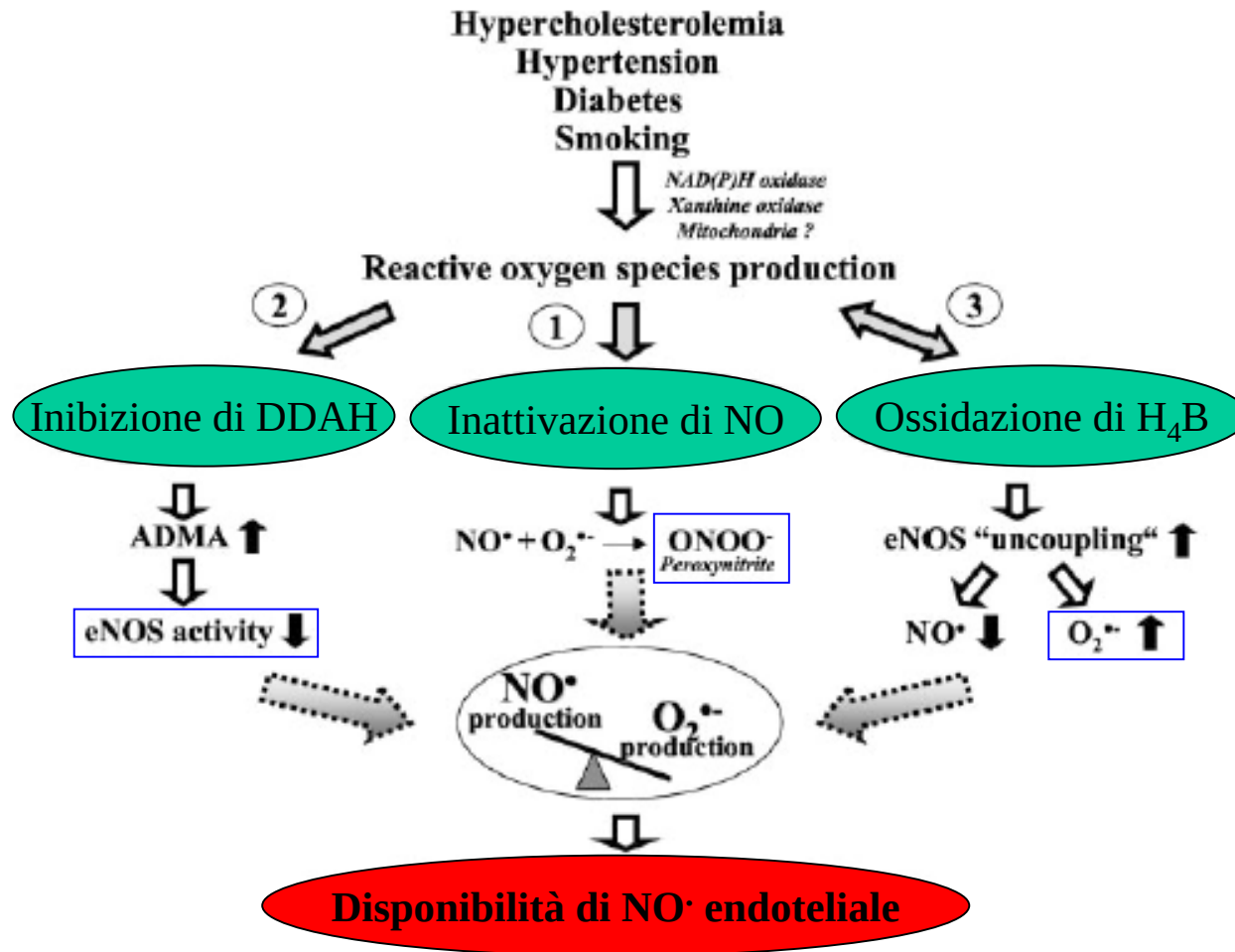
Endotelio



Condizioni predisponenti all'aterosclerosi (ipercolesterolemia, ipertensione, diabete, fumo) sono associate a disfunzioni dell'endotelio portando ad un fenotipo pro-infiammatorio e pro-trombotico

★ Infiammazione ha un ruolo chiave in tutti gli steps dell'aterosclerosi e L'NO ha potente azione anti-infiammatoria (inibisce migrazione ed infiltrazione di leucociti)

★ L'NO ha effetto antitrombotico perché limita l'attivazione piastrinica



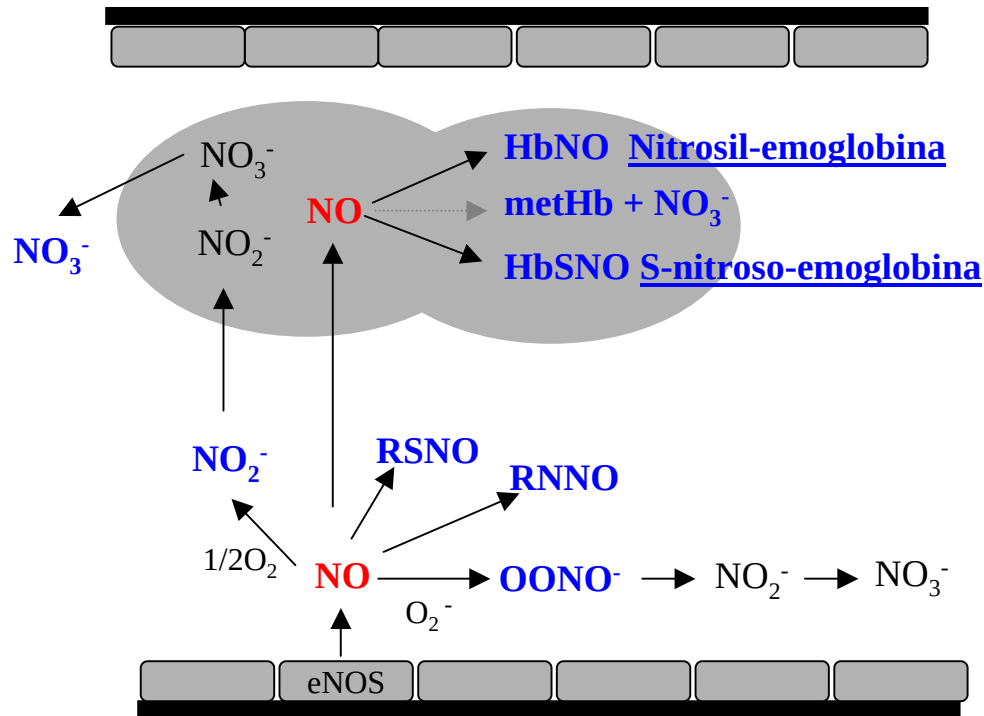
DDAH = dimetilarginina dimetilaminoidrolasi

ADMA = asimmetrica dimetilarginina (inibitore della NOS)

Emoglobina

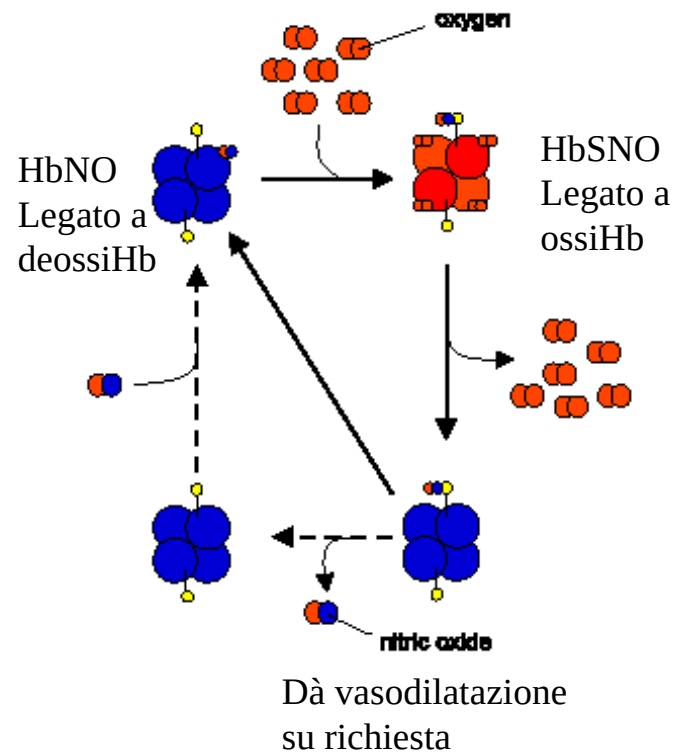
Regolazione del tono vascolare e del flusso sanguigno

NO prodotto dall'endotelio viene conservato nel circolo sanguigno sotto forma di HbSNO, HbNO, RSNO e NO_2^-



deossiHb + NO $\rightarrow$ HbNO (Deposito, stabile)
ossiHb + NO $\rightarrow$ metHb + NO_3^- (Inattivazione)
HbSNO (Cys 93 della β -globina) $\rightarrow$ trasportatore

L'NO derivante dalla NOS è catturato dal gruppo eme per mantenere i livelli eritrocitari di NO



Gradiente di HbSNO e HbNO negli eritrociti di ratto ed umani.

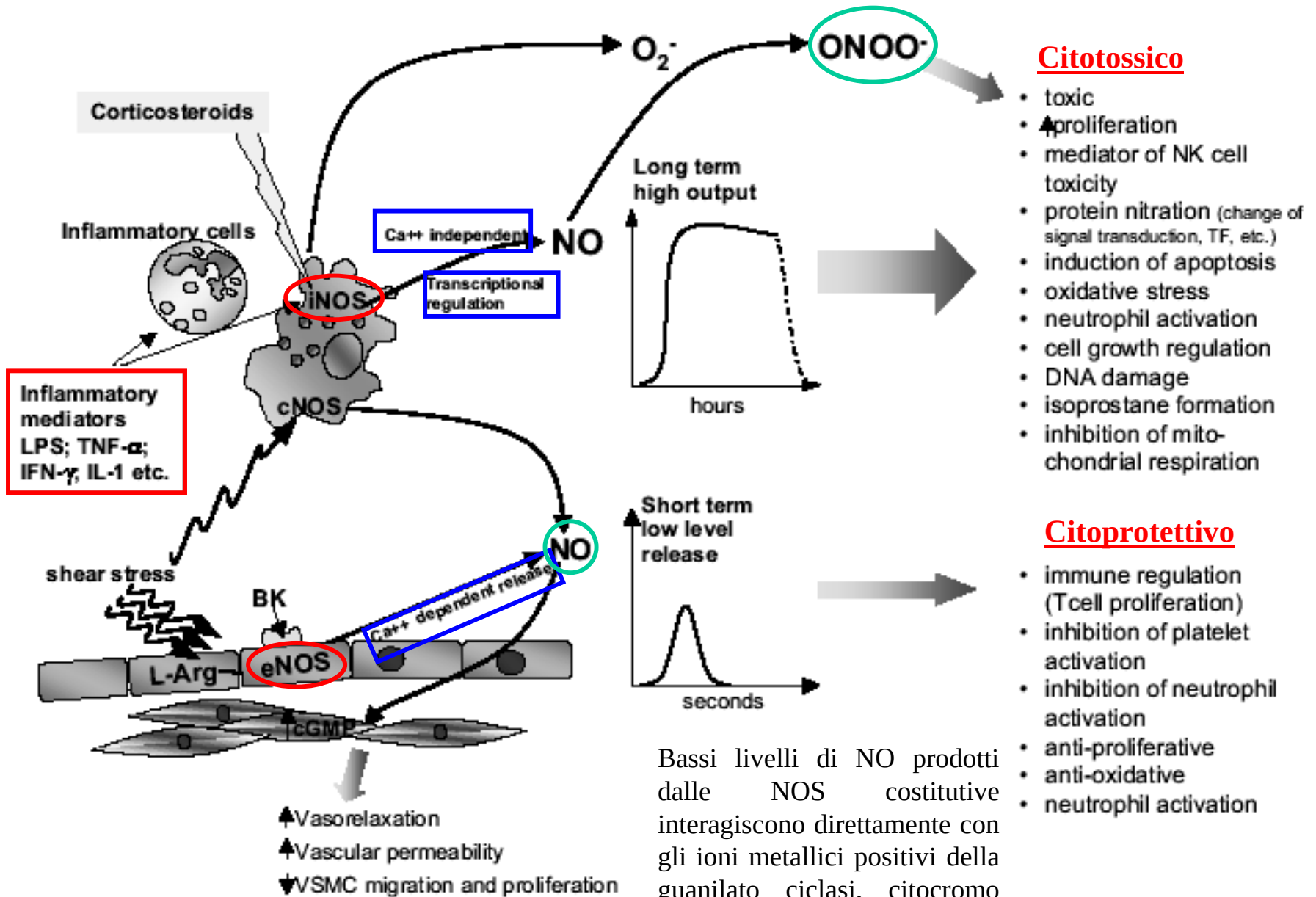
HbSNO nei polmoni --> rilascia NO nel transito arteria-vena per aumentare il flusso sanguigno ed il rilascio di ossigeno nella microcircolazione. Poi, nelle vene la deossiHb lega preferenzialmente l'NO nel gruppo eme.

Sistema immunitario

Symptom	Mediators
<i>Vascular permeability</i>	Vasoactive amines Bradykinin Leukotrienes C ₄ , D ₄ , E ₄ PAF Complement (C3a and C5a) Substance P Nitric oxide
<i>Vasodilatation</i>	Nitric oxide PGL ₂ , PGE ₁ , PGE ₂ , PGD ₂ Hydrogen peroxide
<i>Vasoconstriction</i>	Tromboxane A ₂ , Leukotrienes C ₄ , D ₄ , E ₄ Superoxide
<i>Chemotaxis and leukocyte adhesion</i>	Chemokines LTB ₄ , HETE, lipoxins Complement (C5a) Bacterial antigens Superoxide
<i>Pain</i>	Bradykinin Prostaglandins Superoxide
<i>Fever</i>	IL-1; TNF; IL-6 Prostaglandins
<i>Tissue and endothelial damage</i>	Reactive oxygen species Nitric oxide (iNOS) Lyzosomal enzymes

Durante infiammazione:

aumento di permeabilità vascolare, rilascio di eicosanoidi , rilascio di peptidi attivi (IL-1, bradichinina), rilascio di ammine (istamina, idrossitriptamina)



Bassi livelli di NO prodotti dalle NOS costitutive interagiscono direttamente con gli ioni metallici positivi della guanilato ciclasi, citocromo P450 e NOS stessa.

NO

- ★ Inibisce proliferazione cellule T.
- ★ Inibisce la funzione secretoria IgE-mediata delle mast cellule (rilascio di istamina).
- ★ Inibisce l'espressione di citochine (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ) da parte di linfociti, eosinofili, monociti.

RN/OS

Regolano l'espressione di cellule d'adesione, influenzando così il richiamo di cellule nei siti infiammatori.

Aumentano l'espressione di chemochine e citochine

NO e morte cellulare

★ SCAVENGER

Protettivo nei confronti di ischemia/riperfusion (cervello, miocardio)
Inibisce perossidazione lipidica (reagisce con radicali perossilici e alcossilici)
Inibisce citossicità mediata da superossido o perossido d'idrogeno

★ INDUZIONE DI PROTEINE PROTETTIVE

Hsp70 --> protegge epatociti da morte mediata da TNFa
Ciclo-ossigenasi 2
Eme-ossigenasi 1
Metallothioneina
Bcl-2

★ MECCANISMI cGMP DIPENDENTI

Attivazione di chinasi cGMP-dipendenti
Epatociti e linfociti T

★ S-NITROSAZIONE

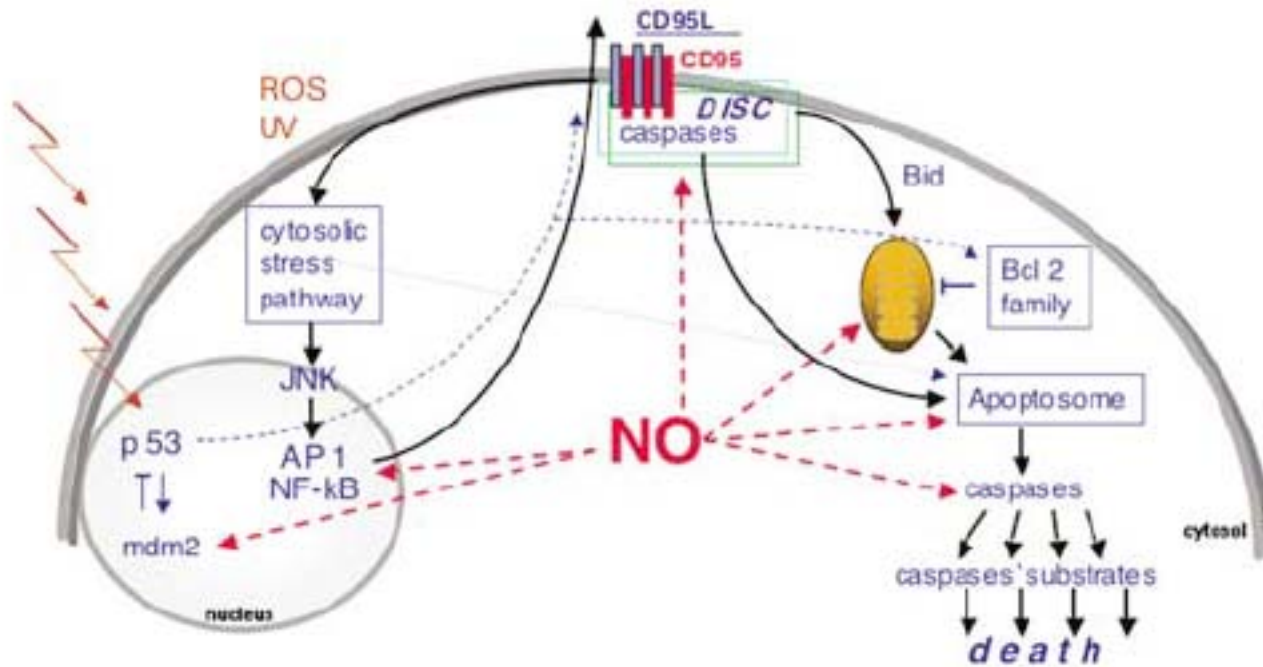
Inizio e/o amplificazione del segnale apoptotico

Caspasi

Transglutaminasi tissutale

AP-1

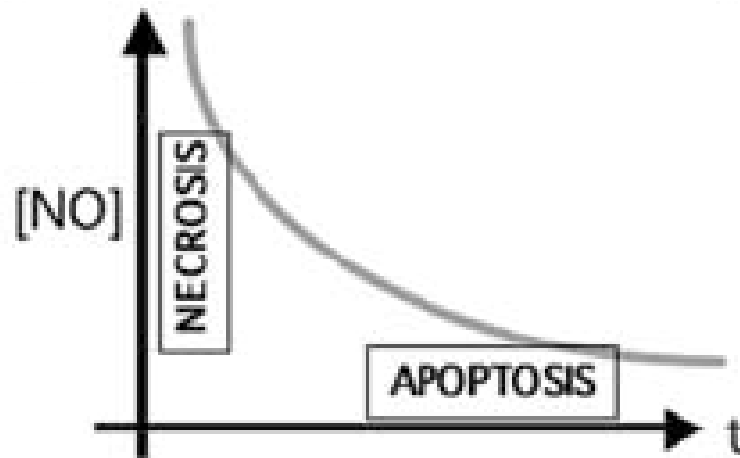
NF-kB



Induzione morte cellulare

Dipende da

reazioni chimiche che l'NO fa in un determinato stato redox cellulare
concentrazione
tempo di esposizione



Esposizione acuta ad alte dosi di NO --> necrosi

Esposizione cronica a basse dosi di NO --> apoptosi

Necrosi

Effetti diretti

Effetti indiretti (formazione di perossinitrito)

- ★ Inibizione di sintesi del DNA (ribonucleotide reductasi)
- ★ Inibizione di respirazione mitocondriale
(citocromo c ossidasi --> perossinitrito --> inibizione di complessi I e III)
- ★ Inibizione di reazioni metaboliche (aconitasi --> perdita di energia)

Perossinitrito dà perossidazione lipidica, taglio del DNA, nitratura di tirosine

Apoptosi

Macrofagi, neuroni, cellule β del pancreas, timociti, condrociti, epatociti

Accompagnato da accumulo di p53
Cambiamenti nella famiglia di Bcl-2
Attivazione di caspasi
Traslocazione del citocromo c

Recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) e Ca^{++} (Recettore è inibito da NO)

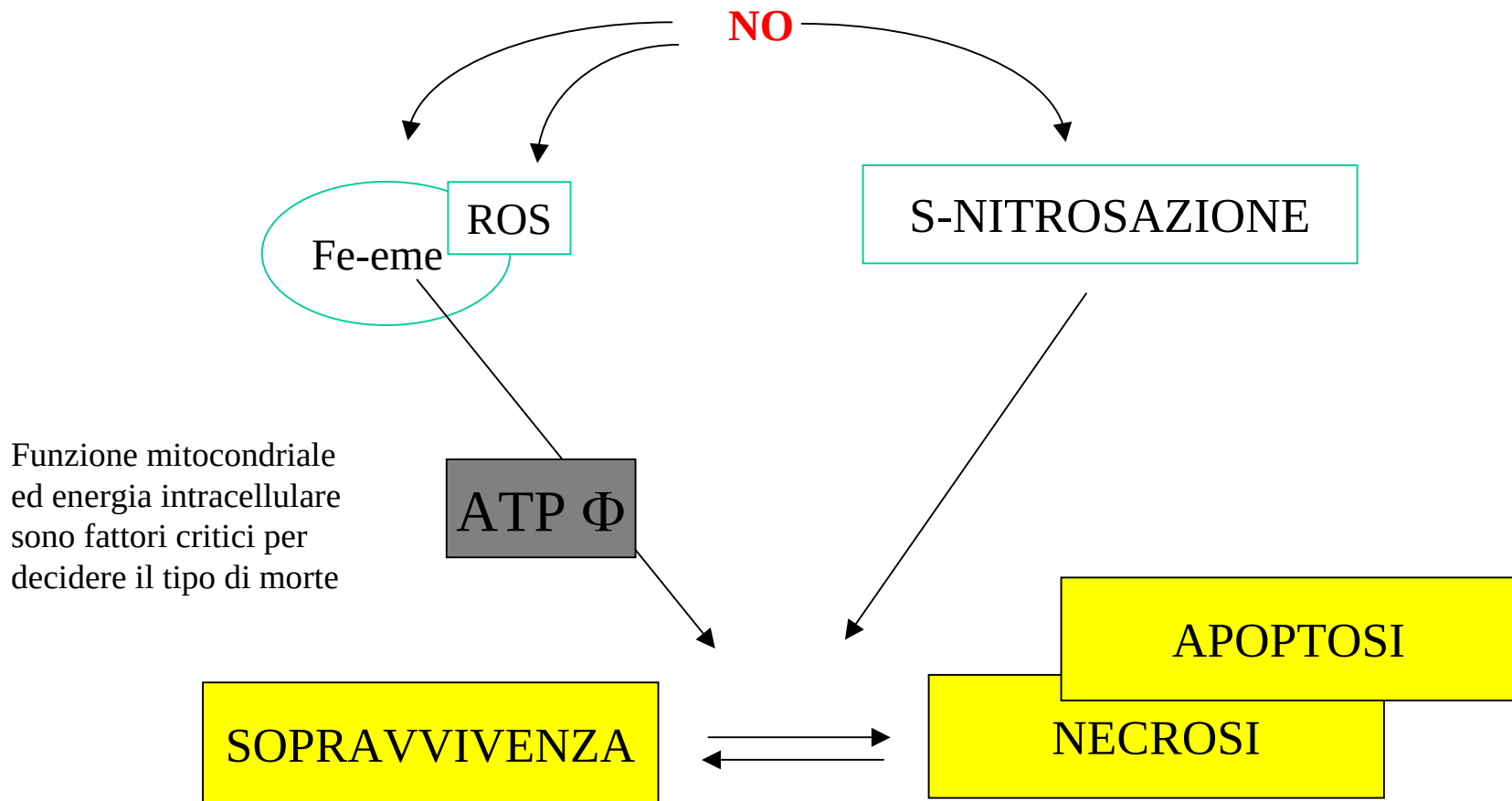
Inibizione di GAPDH (glicolisi)

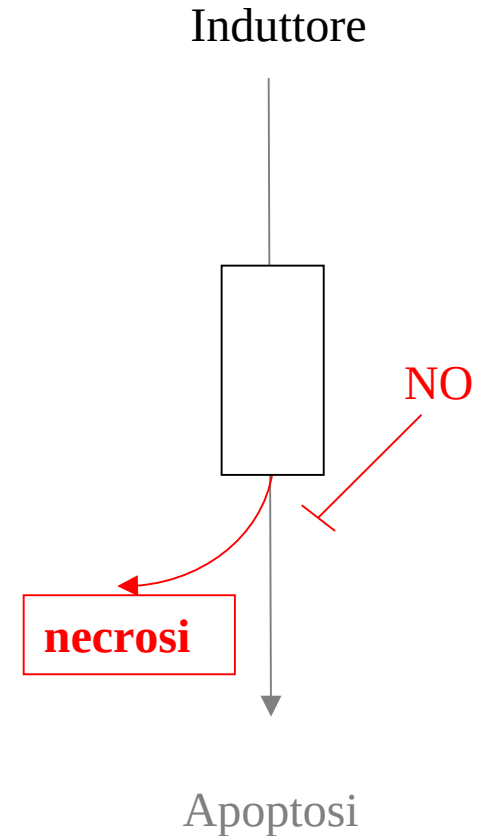
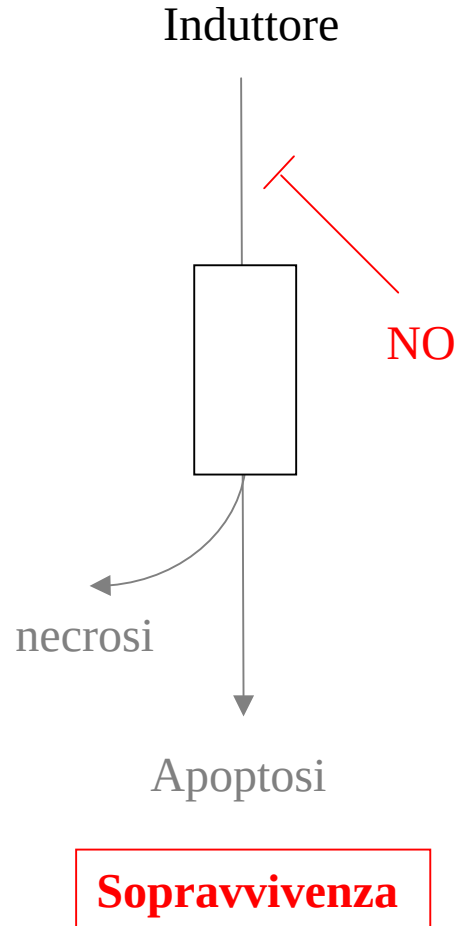
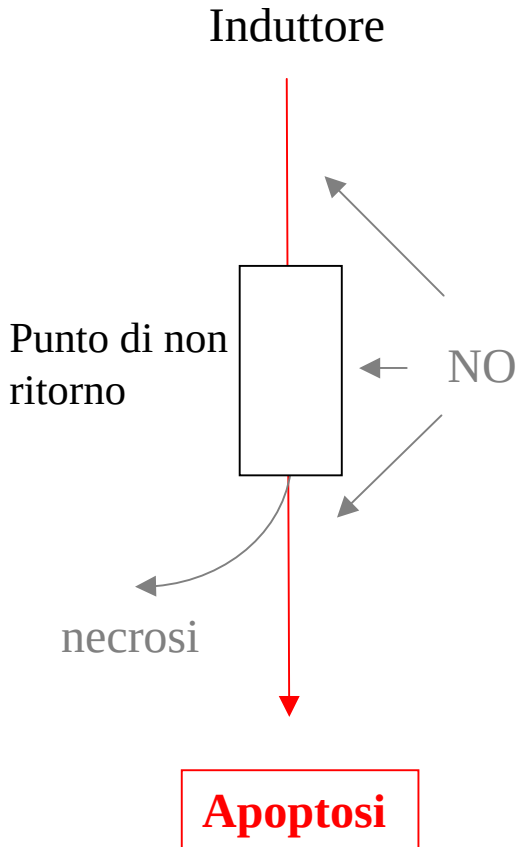
Shift apoptosi/necrosi

Anti-cd95 triggered death in T cells
ceramide triggered death in T cells

Agisce dopo il punto di non ritorno

L'abilità di indurre o prevenire la morte è influenzata da
ambiente cellulare
stato redox
concentrazione
tempo di esposizione
presenza di ossigeno, superossido e altre molecole





Inibizione di apoptosi protegge fegato da danno infiammatorio e parete dei vasi sanguigni da aterogenesi

Azione citotossica di NO porta a stati patologici