

Opening lecture	Bollettino Accademia Gioenia Sci. Nat.	Vol. 41	N.° 369	pp. 1-17	Catania 2008	ISSN 0393 - 7143
-----------------	--	---------	---------	----------	--------------	------------------

**Il nuovo ruolo di un vecchio enzima, l'arginasi studiato da A. Clementi, nelle malattie neurodegenerative**

ANNA MARIA GIUFFRIDA STELLA

*Dipartimento di Scienze Chimiche, sezione di Biochimica Biologia Molecolare,  
Università di Catania,  
Viale Andrea Doria 6, 9515 Catania Italy. E-mail: amgbioc@unict.it*

RIASSUNTO

E' noto che l'enzima arginase ha un ruolo fondamentale nel ciclo urea. Essa è in grado di suddividere l'aminoacido arginina in L-ornitina ed urea. La legge del arginase postulata da A. Clementi stabilito che questo enzima è presente in alte concentrazioni nel fegato di ureotelic animali, mentre è presente soltanto in tracce, nel fegato di uricotelic animali come uccelli e rettili. L'espressione di urea aumenta durante il ciclo di enzimi fetale e lo sviluppo postnatale. Molti anni dopo la Postulazione della arginase diritto, l'importanza di arginina come precursore del "NO" (1) è stata dimostrata, indicando un ruolo chiave di questo enzima nella produzione di nitriti e nitrati. Gli studi riguardanti l'importanza del amminoacid arginina come precursore di urea da Krebs e di NO Moncada da prima e da Ignarro dopo, sono stati apprezzati dalla comunità scientifica, con l'attribuzione del Premio Nobel per Krebs nel 1932 e nel 1998 a Ignarro. Recentemente, alcuni A.A. (2) hanno individuato l'enzima arginase come un fattore antiapoptotic purificata da bovini fegato. Il meccanismo mediante il quale l'enzima arginase protegge da apoptosi neuronale è attribuita alla inibizione della produzione di NO mediante idrolisi di arginina. In conclusione è stato ipotizzato un nuovo ruolo per l'enzima arginase nel sistema nervoso suggerendo l'importanza di nuove strategie terapeutiche in varie condizioni fisiopatologiche, e in particolare nelle malattie neurodegenerative.

(1) Bredt et al., Nature 1990, 347, 768-770; (2) Esch et al., J. Neurosci. 1998, 18, 4083-4095

SUMMARY

**The new role of an old enzyme, the arginase investigated by A. Clementi, in neurodegenerative diseases.**

It is well known that the enzyme arginase has a key role in the urea cycle. It is able to split the aminoacid arginine into L-ornithine and urea. The law of arginase postulated by A. Clementi established that this enzyme is present in high concentrations in the liver of ureotelic animals, while it is present only in traces in the liver of uricotelic animals such as birds and reptiles. The expression of urea cycle enzymes increases during foetal and postnatal development. Many years after the postulation of the arginase law, the importance of arginine as precursor of "NO" (1) has been demonstrated, indicating a key role of this enzyme in the production of nitrites and nitrates. The studies concerning the importance of the amminoacid arginine as precursor of urea by Krebs and of NO by Moncada first and by Ignarro after, were appreciated by the scientific community with the attribution of the Nobel Prize to Krebs in 1932 and to Ignarro in 1998.

Recently some A.A. (2) have identified the enzyme arginase as an antiapoptotic factor purified from bovine liver. The mechanism by which the enzyme arginase protects from neuronal apoptosis is attributed to the inhibition of NO production by the hydrolysis of arginine. In conclusion it has been hypothesized a new role for the enzyme arginase in the nervous system suggesting the importance of new therapeutic strategies in various physiopathological conditions and particularly in neurodegenerative diseases (1) Bredt et al., *Nature* 1990, 347, 768-770; (2) Esch et al., *J. Neurosci.* 1998, 18, 4083-4095.

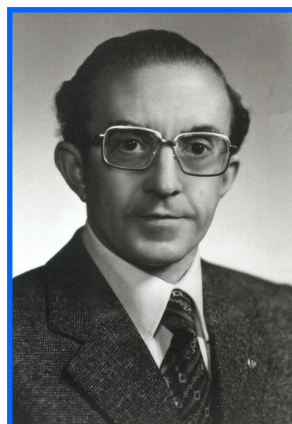
E' con profonda gioia e grande emozione che ho accettato l'invito del Consiglio Direttivo dell'Accademia Gioenia a tenere la lettura inaugurale dell'anno accademico, anno CLXXVI dalla Fondazione.

E' un compito molto arduo, data la presenza di Autorità accademiche e cittadine e data la difficoltà, essendo presente un pubblico dalla cultura molto vasta ed eterogenea, di trattare un argomento che possa essere di interesse per tutti e soprattutto di esporlo in maniera semplice e comprensibile pur mantenendo il rigore scientifico della trattazione.

I recenti progressi della ricerca scientifica mi hanno facilitato il compito permettendomi di svolgere un argomento di grande attualità e allo stesso tempo di ricordare le ricerche pionieristiche dei miei maestri il Prof. Antonino Clementi e il Prof. Giuseppe Ricceri.



*Antonino Clementi* (1888-1968)



*Giuseppe Ricceri* (1920-1983)

Sono lieta di continuare una tradizione che ha visto inaugurare l'anno accademico dell'Accademia Gioenia dai miei Maestri e in particolare dal Prof. Antonino Clementi nel 1937 con una relazione rivolta alla descrizione dei progressi della Biochimica comparata e dal Prof. Giuseppe Ricceri nel 1976 con una relazione sulle attuali conoscenze nel processo di biosintesi delle proteine.

Permettetemi di ricordare rapidamente le figure umane e scientifiche dei miei maestri, perchè non tutti, specialmente i più giovani hanno avuto la fortuna di incontrarli e la possibilità di conoscere e apprezzare le importanti ricerche eseguite nell'Istituto di Chimica Biologica che era allora ubicato in Via Androne, prima che nel 1968 si trasferisse alla Città Universitaria.

Ho avuto la gioia e la fortuna di incontrare il Prof. Antonino Clementi nell'anno accademico 1958/59, al mio ritorno da Losanna, dove avevo trascorso un proficuo periodo di attività di ricerca. Sono rimasta profondamente colpita dal suo entusiasmo per la ricerca scientifica, dalla vivacità dei suoi occhi magnetici che si illuminavano quando parlava delle sue ricerche.

Il Prof. Clementi era allora Professore di Fisiologia Umana nella Facoltà di Medicina di Catania e teneva allo stesso tempo l'insegnamento di Chimica Biologica, poichè non c'era ancora un titolare della disciplina.

Il Prof. A.Clementi ottenne dal Rettore Cesare Sanfilippo l'assegnazione di un posto di Assistente Straordinario ed io potei così iniziare a lavorare con lui e con il Prof. Giuseppe Ricceri, che era allora suo Assistente.

Nel 1963 il Prof. Ricceri vinceva il concorso di Professore Ordinario di Biochimica chiesto dalla Facoltà di Medicina di Catania e la disciplina Chimica Biologica assumeva così il ruolo di disciplina fondamentale negli studi medici.

Ricordo con profonda emozione la prolusione tenuta dal Prof. Ricceri nell'Aula Magna il 26 marzo del 1963 sul tema: Difetti enzimatici e neoplasie.



**PROLUSIONE** Prof. Giuseppe Ricceri, 26 Marzo 1963

Alla cerimonia intervenivano molti illustri biochimici delle Università italiane, tra cui il Prof. Arturo Bonsignore, biochimico della Facoltà Medica di Genova, il Prof. Giovanni Moruzzi, biochimico della Facoltà Medica di Bologna, il Prof. Rossi Fanelli biochimico della Facoltà Medica di Roma, illustrati nella foto, che ho il piacere di mostrarvi. In piedi il Prof. Clementi, che ringrazia il Rettore per le espressioni di stima rivolte al neocattedratico. Venivano ternati nello stesso concorso il Prof. Sandro Pontremoli, oggi Rettore dell'Università di Genova e il Prof. Paolo Cerletti, allievo di Rossi Fanelli.

Ricordo con grande gioia quei giorni carichi di emozione e di progetti per il futuro. Credo che queste due figure così importanti nella storia biochimica italiana abbiano costituito per me un modello ed un esempio da seguire, che ha pervaso tutto il mio impegno nella ricerca scientifica e nell'attività didattica, valori che spero di trasmettere a mia volta.

Ma non vorrei dilungarmi oltre su questi ricordi per me così belli e pieni di emozione perchè vorrei affrontare il tema scientifico della relazione.

Il Prof. Clementi durante il suo soggiorno a Heidelberg nel laboratorio del Prof. Kossel nel 1912, aveva intuito le tappe fondamentali del ciclo dell'urea che sarebbe stato più tardi formulato da Krebs, il quale per questa scoperta ha ottenuto nel 1932 il premio Nobel. Il Prof. Clementi durante il fervido e intenso periodo di ricerca trascorso a Heidelberg aveva eseguito esperimenti fondamentali che gli avevano permesso di enunciare " la legge dell' arginasi".

**L'enzima arginasi è presente nel fegato degli organismi a ricambio ureotelico, ivi compreso l'uomo, è scarsamente presente o assente nel fegato degli organismi a ricambio uricotelico (uccelli e rettili).**

Tale legge viene citata nei più importanti testi di biochimica internazionali tra cui il testo dell'illustre biochimico Ernest Baldwin dal titolo " Dynamic aspects of Biochemistry" (1), che così recita:

**It was Clementi who first drew attention to the striking fact that, while arginase occurs in high concentrations in the liver of ureotelic animals, it is present in traces at most in the liver of those which are uricotelic".**

Il Prof. Clementi comunicava i risultati delle sue ricerche al Congresso Internazionale di Fisiologia, che si svolgeva a Groningen nel 1913. La sua scoperta si sarebbe rivelata di grande importanza per la definizione del tipo di metabolismo azotato nelle varie specie animali e del ruolo dell'enzima arginasi nel ciclo dell'urea.

Le ricerche sul metabolismo dell'arginina sono state molto intense negli ultimi cento anni.

Questo interessante aminoacido fu isolato per la prima volta dai semi del lupino nel 1886 da Schultz e Steiger (37) e successivamente, nel 1895, è stato identificato come componente delle proteine da Hedin (22).

Vorrei fare rilevare che nel 1800 la letteratura scientifica più rilevante veniva pubblicata in riviste di lingua tedesca, soltanto più tardi nel 1900 la letteratura in lingua inglese assumeva una maggiore importanza nella divulgazione scientifica.

Nel 1930 la sintesi dell'arginina nei mammiferi veniva dimostrata da Rose e collaboratori nei classici studi nutrizionali e pubblicata su *Journal Biol. Chem.* (47).

Benchè l'attività dell'arginasi, l'enzima che idrolizza l'arginina in ornitina e urea fosse stato identificato da Kossel nel 1904 e pubblicato sempre su un giornale tedesco, *Zeit Physiol.Chem.* 1904, (24), fu soltanto dopo la scoperta del ciclo dell'ornitina da Krebs e Henseleit nel 1932 (25), che il ruolo fondamentale dell'arginina nelle varie vie metaboliche e fisiologiche veniva puntualizzato.

Desidero ricordare che il Prof. Clementi svolgeva proprio negli anni 1912 e 1913 le sue interessanti ricerche nel laboratorio di Kossel a Heidelberg e formulava la legge dell'arginasi

che certamente aveva stimolato le ricerche di Krebs sull'ureagenesi e la scoperta del ciclo dell'ornitina.

Gli studi fisiologici e nutrizionali sul ruolo della arginina nel 1930 e 1940 furono intensificati, ma è più tardi nel 1987 e nel 1988, che la scoperta sul ruolo chiave dell'arginina come precursore della sintesi dei nitriti / nitrati e dell'ossido nitrico ha aperto una nuova e intensissima attività di ricerca sull'arginina (4,17,35).

Pertanto la scoperta che l'arginina è un importante precursore per la sintesi di molecole "segnale" (NO, glutamato, agmatina) ha portato ad una profonda revisione del ruolo dell'arginina, che nei testi classici di biochimica era citata soltanto come precursore della biosintesi delle proteine, dell'urea e della creatina.

La stessa arginina, oltre i suoi prodotti del metabolismo prima citati (ossido nitrico, glutamato, agmatina) ha altri ruoli importanti nel metabolismo cellulare.

Per esempio l'argininil-t-RNA è non soltanto il precursore per la sintesi proteica, ma partecipa ad importanti processi di modificazioni post traduzionali delle proteine, che riguardano il legame dell'arginina con l'aspartato o il glutamato presenti nel terminale aminico delle proteine, permettendo così la degradazione proteolitica ubiquitina-dipendente (14).

L'arginina agisce pure come attivatore allosterico dell'enzima N-acetilglutamato sintasi che sintetizza N-acetilglutamato da glutamato e acetil-coA.

Poiché l'acetilglutamato è un cofattore essenziale per l'attività della carbamilfosfato sintetasi I, enzima chiave nella sintesi della arginina e dell'urea, l'arginina esercita un ruolo importante nel metabolismo.

La maggior parte degli enzimi per la sintesi dell'Arginina sono presenti in tutti i tessuti animali, mentre, N-acetilglutamato sintasi, carbamilfosfato sintasi I, ornitina carbamiltransferasi sono presenti soltanto nel fegato e nelle mucose intestinali.

In condizioni normali l'espressione degli enzimi del ciclo dell'urea inizia durante lo sviluppo fetale e continua ad aumentare dopo la nascita.

Successivamente, i livelli degli enzimi del ciclo dell'urea sono indotti in maniera coordinata dalle condizioni che comportano un aumentato catabolismo delle proteine e degli aminoacidi, come ad esempio una maggiore introduzione di proteine oppure il digiuno, o un aumento nei livelli di glucocorticoidi o del rapporto glucagone/insulina.

Queste risposte adattative a lungo termine riflettono largamente un aumento della velocità di trascrizione dei geni, che codificano per questi enzimi. Modificazioni rapide, a breve termine delle attività enzimatiche del ciclo dell'urea avvengono principalmente mediante modificazioni nella efficienza catalitica della carbamilfosfatosintasi I, (CPSI) che a sua volta è regolata dalle modificazioni della concentrazione mitocondriale di N-acetilglutamato.

Per quanto riguarda gli enzimi che catalizzano le tappe più importanti per la sintesi e il catabolismo dell'arginina i seguenti enzimi possono essere considerati come enzimi chiave: l'argininsuccinicosintasi, 2 isoenzimi dell'arginasi, 3 isoenzimi della NO sintasi e l'argininadecarbossilasi.

Modificazioni nell'attività di tali enzimi ed anche dei trasportatori degli aminoacidi cationici hanno un ruolo fondamentale nel determinare il destino metabolico dell'arginina sia in condizioni normali che patologiche.

L'arginina può stimolare la secrezione di ormoni come l'insulina, il glucagone, la prolattina, l'ormone della crescita. Pertanto la regolazione dell'omeostasi dell'arginina, che dipende dall'apporto dietetico di arginina, dal turnover delle proteine, dalla velocità di sintesi e catabolismo dell'arginina, è di notevole significato nutrizionale e fisiologico.

Negli individui adulti la maggior parte della sintesi endogena di arginina coinvolge il cosiddetto asse intestino-rene poiché l'intestino tenue rilascia citrullina nella circolazione ematica, che viene estratta principalmente dal rene e convertita in arginina.

Tuttavia il metabolismo dell'arginina è difficile da analizzare in vivo a causa:

- 1) della compartimentazione dei vari enzimi, nei diversi organi (fegato, intestino tenue, rene), e nelle diverse frazioni subcellulari, (citoplasma, mitocondri)
- 2) delle modificazioni dell'espressione di tali enzimi, durante lo sviluppo e in risposta, alla dieta, agli ormoni, alle citochine.

### ISOENZIMI ARGINASI

L'interesse per l'arginasi come possibile enzima regolatore è diventato crescente a causa del suo ruolo potenziale per regolare la disponibilità di arginina per la sintesi di NO, poliammine, agmatina, prolina e glutamato.

Esistono due distinti isoenzimi dell'Arginasi nei mammiferi, codificate da due diversi geni. Questi due enzimi sono alquanto simili per le loro proprietà e per la richiesta di manganese, ma differiscono per la localizzazione subcellulare e tissutale, per la regolazione dell'espressione e le proprietà immunologiche (23,30).

L'arginasi di tipo I è un enzima citosolico, altamente espresso nel fegato, come componente del ciclo dell'urea, e in misura molto limitata negli altri tessuti.

In contrasto l'arginasi di tipo II è un enzima mitocondriale, espresso nel rene, nel cervello, nell'intestino tenue, nella ghiandola mammaria, ma scarsamente nel fegato.

Le cellule endoteliali dell'aorta esprimono entrambi i tipi di arginasi I e II.

La diversa localizzazione subcellulare degli isoenzimi dell'arginasi può fornire un meccanismo per regolare il destino metabolico dell'arginina.

Per esempio la differente espressione degli isoenzimi dell'arginasi può servire alla utilizzazione preferenziale per la sintesi di prolina o di glutammato attraverso l'enzima ornitina amminotransferasi (OAT) o per la sintesi di poliammine attraverso l'enzima ornitina decarbossilasi (ODC).

L'elevata attività dell'arginasi I nel fegato serve ad assicurare che questa via di detossificazione del metabolismo azotato operi con larga efficienza. Tra gli enzimi del ciclo dell'urea, l'arginasi è l'unico che ha due distinti isoenzimi. Pertanto i difetti congeniti dell'arginasi epatica (tipo I) sono parzialmente compensati dalla elevata espressione dell'arginasi di tipo II nel rene, portando a una minore conseguenza del disturbo metabolico e della sintomatologia clinica.

Per quanto riguarda il **catabolismo dell'arginina in vivo**, le nostre conoscenze sono alquanto limitate a causa della complessa compartimentazione del metabolismo dell'arginina sia a livello tissutale che subcellulare. Sembra che soltanto il 5% della produzione di urea derivi dall'arginina del plasma dimostrando che vi è una stretta segregazione del pool di arginina tra fegato e plasma. Poiché l'attività dell'arginasi nella mucosa intestinale dell'adulto è molto elevata, (circa il 40% dell'arginina assorbita nel lume intestinale è degradata e il rimanente dell'arginina assorbita è rilasciata nel sangue venoso) le modificazioni dell'espressione dell'arginasi dell'intestino hanno il maggiore impatto nel destino metabolico dell'arginina e nella disponibilità dell'arginina della dieta agli altri tessuti.

Ma vediamo quale è l'importanza dell'arginina nel cervello.

Tutti gli intermedi del ciclo dell'ornitina sono presenti nel cervello e tuttavia parte dell'intero ciclo è mancante.

Uno degli enzimi più importanti che manca nel cervello è l'ornitincarbamiltransferasi, che catalizza la formazione di citrullina da ornitina e carbamilfosfato. Un altro enzima mancante nel cervello è la carbamilfosfato sintetasi I che sintetizza carbamilfosfato.

Il meccanismo di formazione della citrullina e il significato funzionale della via metabolica che forma arginina e ornitina dalla citrullina era sconosciuto. Probabilmente parte della citrullina si forma attraverso l'azione dell'enzima NO sintasi e un ruolo del ciclo dell'urea potrebbe essere quello di risintetizzare il precursore dell' NO.

E' anche molto interessante rilevare l'esistenza di due errori congeniti del metabolismo dell'urea i cui effetti sono importanti sulla funzione cerebrale.

Il più comune di questi è **l'argininsuccinicoaciduria causata dall'assenza dell'enzima argininsuccinasi**. In questa malattia i livelli di acido argininsuccinico nel liquido cerebrospinale (che normalmente sono molto bassi) sono invece molto più alti di quelli presenti nel plasma suggerendo che il cervello possa essere una sorgente importante di tale sostanza. Nei pazienti che sopravvivono dopo il periodo neonatale, i sintomi clinici sono un severo ritardo mentale e atassia intermittente. Un altro difetto congenito del metabolismo del ciclo dell'urea è la **citrullinemia**, una condizione nella quale nel sangue e nel liquido cerebrospinale i livelli di citrullina sono aumentati di quaranta volte rispetto al normale. Tale malattia è causata da una anomalia nella cinetica **dell'enzima argininsuccinico sintasi** e causa una severa deficienza mentale. Gli effetti centrali dell'acido argininsuccinico o della citrullina non sono stati studiati in maniera approfondita, ma nelle arterie sembra che l'acido argininsuccinico inibisca il rilasciamento dell'endotelio, probabilmente impedendo la sintesi dell'NO.

L'aminoacido arginina e l'enzima arginasi che fino a pochi anni or sono erano stati oggetto di studi legati al metabolismo delle proteine nei vari tessuti e nelle diverse specie animali, improvvisamente assumono un ruolo nuovo e diventano oggetto di studi importantissimi di neurobiologia (49).

L'arginina infatti assume un nuovo ruolo come precursore di un composto l'ossido nitrico o NO. Questa scoperta è stata fatta dal Prof. Moncada e collaboratori nel 1988 (35). Gli ulteriori studi su questo argomento hanno permesso al Prof. Ignarro di ottenere il Nobel nel 1998 (6).

Pertanto questo semplice aminoacido, che non è neanche elencato tra gli aminoacidi essenziali perchè può essere facilmente sintetizzato, ha permesso a due ricercatori di ottenere il più alto riconoscimento scientifico internazionale, il premio Nobel a Krebs per il ciclo dell'urea nel 1932 e al Prof. Ignarro per la sintesi e il ruolo dell'NO, nel 1998.

## NO SINTASI (NOS)

La famiglia degli isoenzimi della NOS è diventata negli anni recenti la più studiata del gruppo degli enzimi che metabolizzano l'arginina.

Sono state evidenziate 3 forme dell'enzima che sintetizza NO chiamate NO sintasi (NOS): 1) una forma costitutiva, associata con i neuroni (nNOS o tipo I), dipendente dagli ioni calcio 2) una forma inducibile (iNOS o tipo II) localizzata nelle cellule astrogliali, microgliali, indipendente dagli ioni calcio 3) una terza forma costitutiva associata con l'endotelio vascolare (eNOS o tipo III), dipendente dagli ioni calcio.

La nNOS e la eNOS sono espresse costitutivamente a bassi livelli in una grande varietà di tipi cellulari, mentre la iNOS normalmente non è espressa in molti tipi cellulari, ma è altamente inducibile da parte delle endotossine batteriche e dalle citochine infiammatorie.

Le attività degli isoenzimi costitutivi della NOS sono regolate dinamicamente da  $Ca^{2+}$ /calmodulina, mentre l'attività della iNOS, una volta espressa diventa costitutivamente attiva.

La capacità della cellula per la sintesi di NO è determinata, dai livelli di espressione della NOS, dalla efficienza catalitica della NOS, dall'attivazione via  $Ca^{2+}$ /calmodulina e dalla disponibilità di cofattori essenziali per l'attività della NOS.

L'arginina ha un ruolo nel promuovere la dimerizzazione della NOS (42).

Gli isoenzimi della NOS hanno distinte localizzazioni subcellulari probabilmente coinvolte nella regolazione dell'attività NOS particolarmente per la eNOS e la nNOS.

Questa regolazione probabilmente coinvolge modificazioni dinamiche nella interazione diretta proteine-proteine, nel posizionamento vicino ai canali ionici o ai trasportatori.

Recenti studi hanno messo in evidenza che la nNOS è associata al reticolo endoplasmico rugoso, alle membrane postsinaptiche nel cervello e con il sarcolemma nel muscolo scheletrico.

Si suppone che la localizzazione della nNOS vicino ai canali ionici permetta una regolazione molto precisa della sua attività. Al contrario la iNOS è principalmente citosolica benchè sia stata riscontrata associata alle membrane nei macrofagi.

Tuttavia le conoscenze sulla localizzazione subcellulare degli isoenzimi NOS, la loro regolazione e il significato fisiologico sono tuttora incomplete e richiedono ulteriori ricerche. Il basso livello di produzione di NO, comparato al catabolismo generale dell'arginina nelle cellule, riflette senza dubbio la notevole importanza dell'NO come agente citotossico o di segnale cellulare.

E' ancora oggetto di studio il trasporto dell'arginina nel cervello.

L'arginina libera sembra essere localizzata prevalentemente negli astrociti che possiedono il sistema di trasporto dell'arginina. I neuroni sono anche capaci di captare questo aminoacido perchè hanno lo stesso sistema di trasporto (48), tuttavia il contenuto in arginina dei neuroni è molto basso ed è un fattore limitante per la NOS neuronale.

E' stato infatti recentemente messo in evidenza che la velocità di attività della nNOS nei neuroni dipende dal rifornimento di arginina dalle cellule gliali.

Inoltre il contenuto in arginina proveniente dalla glia è aumentato dopo attivazione dei recettori ionotropici del glutamato (20,21) benchè la natura precisa delle molecole coinvolte nella cascata intracellulare di segnali che portano al rilascio di arginina non sia noto.

E' stato osservato che a concentrazioni subottimali di arginina, l'  $H_2O_2$  (derivata probabilmente da radicali liberi dell'ossigeno  $O_2^{\cdot-}$ ) assieme a  $NO^{\cdot}$  sono prodotti simultaneamente dalla NOS cerebrale. In tali condizioni, i radicali liberi ( $O_2^{\cdot-}$  e  $NO^{\cdot}$ ) reagiscono per formare perossinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) che è stato dimostrato essere tossico per i neuroni ma non per gli astrociti.

Poichè la mancanza di arginina indirizza la produzione di NO mediata dal glutamato nei neuroni verso la produzione di perossinitriti e di  $O_2^{\cdot-}$  alcuni AA hanno investigato se queste molecole potessero avere un ruolo importante nel senso che agiscono come molecole segnale per facilitare il rilascio di arginina prevenendo così la formazione di perossinitriti e di radicali  $O_2^{\cdot-}$  in seguito ad attivazione della nNOS (44).

Gli AA hanno dimostrato che sia i perossinitriti ( $ONOO^{\cdot}$ ) sia  $O_2^{\cdot-}$ , ma non i donatori di  $NO^{\cdot}$  oppure l' $H_2O_2$ , stimolano il rilascio di arginina nelle colture astrogliali di ratto.

Inoltre mentre l'effetto dell' $O_2^{\cdot-}$  sembra non specifico, l'effetto del perossinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) sembra essere mediato dalla attivazione del trasportatore dell'arginina.

Il trasportatore per l'arginina (attraverso un sistema carrier per gli aminoacidi basici) è stato dimostrato nelle colture astrocitarie (38-39).

Il sistema di trasporto dell'arginina può regolare la disponibilità di substrato per tutti quegli enzimi che richiedono arginina. Il più importante meccanismo per il trasporto dell'arginina in molti tipi cellulari è un sistema ad alta affinità,  $Na^+$ -indipendente, utilizzato anche per il trasporto di lisina e ornitina.

Il sistema di trasporto dell'arginina può essere indotto, assieme alla iNOS, in una grande varietà di tipi cellulari indicando che la capacità di trasporto dell'arginina aumenta per andare incontro all'elevata sintesi di NO.



Nelle colture astrogliali di ratto l'induzione della sintesi di NO è strettamente dipendente dalla coinduzione del sistema di trasporto dell'arginina.

Recenti studi hanno suggerito che la precisa localizzazione dei trasportatori dell'arginina possa essere responsabile del processo definito "il paradosso dell'arginina" e cioè che la sintesi endoteliale di NO possa essere regolata variando la concentrazione extracellulare di arginina, malgrado che la concentrazione intracellulare di arginina (0.1-1mM) sia in eccesso rispetto alla  $K_m$  (2.9  $\mu$ M) della NOS endoteliale (eNOS) per l'arginina.

La scoperta del ruolo dell'ossido nitrico (NO) come molecola con ruolo di messaggero nel sistema nervoso ha modificato radicalmente il nostro concetto di comunicazione neuronale.

Numerose ricerche sono state focalizzate allo studio delle proprietà biochimiche, e delle caratteristiche molecolari delle attività enzimatiche delle NO sintasi e sulle conseguenze biologiche della produzione di NO. (1, 5, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 35, 45, 46).

Diversi ruoli sono stati proposti per l'NO: neurotrasmissione, morfogenesi, plasticità sinaptica, regolazione dell'espressione genica.

Come già precisato la NOS neuronale è espressa principalmente nei neuroni. L'NO prodotto da questo enzima media la plasticità sinaptica, la trasmissione neuronale ed anche la neurotossicità che segue al danno ischemico. Le forme immunologiche non sembrano essere espresse nel cervello sano, ma possono essere indotte negli astrociti e nella microglia in seguito a infezione virale, stimolazione immunologica o trauma. Entrambe le eNOS e nNOS sono espresse costitutivamente e attivate rapidamente dall'aumento del calcio intracellulare mentre la iNOS richiede la sintesi proteica prima che l'enzima sia espresso. Una volta che la iNOS è espressa produce grandi quantità di NO che possono causare il danno neuronale. Pertanto l'NO prodotto dagli astrociti o dalla microglia può contribuire al danno neurologico in molte malattie neurodegenerative. Inizialmente le NOS venivano classificate come costitutive e inducibili. Tale nomenclatura non è accurata. Infatti è dimostrato che in seguito a danni traumatici o patologici tutte le forme NOS possono essere " indotte " nel senso che occorre nuova sintesi proteica.

### ARGINASI E NO SINTASI

Sembra che l'arginasi non competa con la sintesi di NO per l'arginina: la  $K_m$  per l'arginina è nel range 2-20 mM per l'arginasi dei mammiferi, ma è nel range 2-20  $\mu$ M per i vari isoenzimi della NOS. D'altra parte la  $V_{max}$  dell'arginasi a pH fisiologico è di 1400  $\mu$ mol/min/mg e pertanto è 1000 volte più alta di quella degli enzimi NOS (1  $\mu$ mol/min/mg), indicando per i due enzimi simili velocità di utilizzazione del substrato a basse concentrazioni di arginina.

Recentemente è stato dimostrato che l'inibizione dell'arginasi in colture di macrofagi trattati con LPS aveva come risultato una aumentata conversione dell'arginina in citrullina indicando che l'arginasi e la iNOS possono competere per l'arginina (48). Un aspetto delle ricerche sulle colture cellulari che necessita ulteriori approfondimenti è il chiarimento della misura in cui la deplezione di arginina è dovuta all'arginasi extracellulare comparata a quella intracellulare e cioè se l'arginasi e la iNOS sono in diretta competizione per il pool intracellulare di arginina.

Questo è un punto importante perchè la velocità di sintesi dell' NO potrebbe essere limitata dalla velocità di captazione dell'arginina. Pertanto una diminuzione dell'arginina extracellulare avrebbe un maggior impatto sulla velocità di sintesi di NO della corrispondente diminuzione della concentrazione intracellulare di arginina. In realtà le basi per un "interplay" tra arginasi e NOS sono rese più complesse dal fatto che essi usano lo stesso substrato. Per esempio i macrofagi, che esprimono iNOS, e le cellule endoteliali possono produrre sufficiente N-idrossiarginina da inibire l'attività arginasi.

Occorre inoltre tenere presente che la N-idrossiarginina può essere ossidata a citrullina e NO da un gran numero di proteine contenenti il gruppo eme come le perossidasi, il citocromo P-450, l'emoglobina e la catalasi, come pure dagli anioni superossidi, facendo così ipotizzare che la vita media della N-idrossiarginina possa variare da tessuto a tessuto. Poiché il contenuto in idrossiarginina può avere un ruolo importante nel metabolismo dell'arginina occorrono ulteriori ricerche per chiarire questo aspetto.

Per quanto invece riguarda la sintesi di arginina nelle cellule che producono NO la via di biosintesi dell'arginina rappresenta una sorgente altamente localizzata per la sintesi di NO nelle cellule non epatiche. La citrullina, che è coprodotta assieme a NO può essere riciclata in arginina attraverso una via che è stata indicata come ciclo citrullina/NO.

Questo riciclaggio è attuato attraverso l'azione combinata degli enzimi argininosuccinato sintasi (ASS) e argininosuccinato liasi (ASL) che sono espressi in tutte le cellule. L'esistenza del ciclo citrullina/NO è supportata dal fatto che la produzione di citrullina totale è più bassa rispetto alla produzione totale di NO per alcuni tipi cellulari e particolarmente dal fatto che la citrullina può sostituire l'arginina, almeno in parte, per la sintesi di NO nelle cellule intatte. Il fatto che la citrullina si accumula in misura notevole nel "medium delle cellule che producono NO" dimostra che il ciclo citrullina/NO è molto meno efficiente del ciclo epatico dell'urea, indicando che l'attività della argininosuccinato sintasi è inferiore a quella della iNOS.

L'osservazione che l'attività degli enzimi ASS e iNOS venivano indotte contemporaneamente ha portato a formulare l'ipotesi che la via di regolazione del ciclo dell'arginina possa rappresentare un meccanismo potenziale per la regolazione della sintesi inducibile di NO (33). Malgrado i risultati interessanti ottenuti con le colture cellulari, il contributo del riciclaggio di arginina per la sintesi di NO in vivo non è stato stabilito definitivamente.

La contemporanea induzione degli enzimi ASS e iNOS permette di formulare l'ipotesi che la via di regolazione del ciclo dell'arginina possa rappresentare un meccanismo potenziale per la regolazione della sintesi inducibile di NO.

L'arginina può essere catabolizzata attraverso molte vie metaboliche che sono co-espresse dentro la stessa cellula. Per esempio la iNOS, l'arginasi e l'arginina decarbossilasi possono essere coesprese nei macrofagi del topo e questo può portare ad una complessa interazione nella quale il prodotto di un enzima può inibire l'attività di un altro enzima come ad esempio l'inibizione dell'arginasi da parte della N-idrossiarginina.

La distribuzione cellulare dell'espressione dei diversi enzimi può variare notevolmente. Per esempio la iNOS può essere espressa in quasi tutte le cellule se esposte ad appropriati stimoli, mentre l'espressione dell'enzima arginina-glicina-amidino transferasi è molto più limitata, principalmente ristretta al rene e al pancreas. In sintesi il catabolismo dell'arginina nei mammiferi coinvolge molti organi ed è caratterizzato da una complessa compartimentazione a livello di diversi organi e tessuti.

### **ARGINASI E SINTESI DI POLIAMMINE**

Le poliammine, come è noto, sono essenziali per la proliferazione e differenziazione cellulare. In favore dell'ipotesi che l'arginasi possa regolare la disponibilità di ornitina per la sintesi della poliammine sta il fatto che l'attività dell'arginasi e della ornitina decarbossilasi sono indotte contemporaneamente e che le cellule che mancano di arginasi non possono proliferare in un mezzo di coltura privo di siero se non vengono aggiunte ornitina o poliammine. L'arginasi e l'Ornitinadecarbossilasi (ODC) vengono indotte nelle linee macrofagiche murine dall'aggiunta di LPS e cAMP sinergisticamente.

Queste osservazioni suggeriscono che l'induzione dell'arginasi serva per aumentare la sintesi delle poliammine nei macrofagi. Vi è pure una evidenza del legame tra attività arginasica e sintesi di poliammine nell'intestino tenue dove la sintesi di poliammine aumenta dopo lo svezzamento in maniera concomitante con l'induzione dell'arginasi e dell'ODC (2).

### **ARGININA - GLICINA AMIDINO TRANSFERASI**

Un'altra via metabolica molto importante del metabolismo dell'arginina è rappresentata dal sintesi della creatina da parte dell'enzima arginina: glicina amidino transferasi, un enzima mitocondriale. Questo enzima che trasferisce il gruppo guanidinico dalla arginina alla glicina per formare acido guanidinacetico e ornitina, è presente principalmente nei tubuli renali e nel pancreas, in misura minore nel fegato e in altri organi.

L'acido guanidinacetico è metilato per azione dell'enzima guanidinoacetato-N-metiltransferasi (un enzima citosolico localizzato principalmente nel fegato, pancreas e in misura minore nel rene per formare creatina che è poi rilasciata nella circolazione ematica. La creatina è attivamente captata dal sistema nervoso e dal muscolo scheletrico, dove è fosforilata per dare creatina fosfato che serve come riserva energetica e quando non è utilizzata subisce la degradazione a creatinina. La creatinina, che non è utilizzata dal muscolo, è eliminata attraverso i reni ed è ben noto che la escrezione urinaria di creatinina è utilizzata come marker della funzionalità renale. Pertanto l'omeostasi della creatina comporta l'intervento di tre organi: il rene, il muscolo, il fegato. L'importanza della sintesi di creatina è illustrata da una recente ricerca che ha identificato nell'uomo una deficienza genetica dell'enzima guanidina-acetato N-metiltransferasi che causa anomalie nel muscolo e nel cervello durante lo sviluppo postnatale (41).

La sintesi di creatina rappresenta una frazione misurabile dell'utilizzazione totale di arginina. Un uomo adulto di 70 kg elimina 1,5 g di creatinina al giorno. Per mantenere l'omeostasi della creatina, deve avvenire una sintesi equimolare di creatina che richiede 2,3 g di arginina al giorno equivalente a circa il 10% del flusso totale di arginina plasmatica. La regolazione della sintesi di creatina avviene principalmente attraverso modificazioni nei livelli dell'enzima renale arginina-glicina amidino transferasi, l'enzima che controlla la velocità di sintesi della creatina. L'attività di questo enzima è regolata dai livelli di creatina e dall'ormone della crescita, il cui meccanismo d'azione necessita ulteriori ricerche.

### **ARGININA DECARBOSSILASI**

Produce CO<sub>2</sub> e agmatina da arginina. L'enzima è presente nel cervello, fegato, intestino tenue, midollare surrenale, è localizzato nella frazione mitocondriale dell'omogenato cellulare.

Il ruolo dell'agmatina è ancora oggetto di ricerche. Le sono state attribuite alcune possibili funzioni: si può legare a recettori alfa<sub>2</sub> adrenergici suggerendo pertanto un ruolo nella trasduzione del segnale, può inibire l'attività ODC, inducendo la sintesi di un antizima e pertanto sopprimendo la proliferazione cellulare mediante riduzione della concentrazione cellulare di poliammine; infine, l'agmatina è un debole inibitore competitivo degli isoenzimi NOS. Tuttavia fino ad oggi non è stato stabilito se l'agmatina prodotta per via endogena possa avere un impatto significativo nella sintesi di NO o poliammine dall'arginina.

E' importante ricordare che gli isoenzimi della NO sintasi nei mammiferi sono stati scoperti appena 10 anni or sono e l'arginina decarbossilasi nei mammiferi solo 4 anni or sono.

Vorrei porre adesso l'accento sulla importanza dell'enzima arginasi e sulle recenti ricerche che hanno messo in evidenza le proprietà antiapoptotiche dell'arginasi.

## ATTIVITÀ ANTIAPOPTOTICA DELL'ARGINASI

L'attività antiapoptotica dell'Arginasi è stata dimostrata in neuroni corticali di ratto nei quali l'apoptosi era stata causata mediante deplezione di glutatione o stress ossidativo (20).

Poichè gli inibitori della sintesi di ossido nitrico e di proteine diminuiscono la morte necrotica e quella apoptotica in modelli animali di "stroke" e di danno del midollo spinale, gli enzimi che portano a una deplezione di arginina capaci di inibire simultaneamente la sintesi proteica e la generazione di ossido nitrico, possono essere agenti terapeutici utili per le malattie neurologiche acute (9).

L'apoptosi è un tipo di morte cellulare programmata caratterizzata morfologicamente da condensazione nucleare e citoplasmatica, addensamento della cromatina nucleare e perdita della permeabilità delle membrane.

La trasduzione dell'apoptosi nei neuroni richiede nuova sintesi proteica e coinvolge regolatori positivi e negativi come la famiglia delle proteine Bcl-2/Bax, i prodotti del gene p53 e altri.

Recentemente sono stati identificati altri geni simili al Bcl-2. Alcuni di questi hanno attività antiapoptotiche mentre altri come Bax possono stimolare l'apoptosi.

E' stato proposto per la proteina Bcl-2 un possibile ruolo protettivo nei confronti della apoptosi. Infatti, tale proteina blocca il rilascio di citocromo c dai mitocondri prevenendo la produzione di superossidi.

Gli enzimi noti come caspasi sembrano far parte di una via finale comune che porta alla degradazione delle proteine di riparazione e infine a una distruzione controllata delle cellule.

Le caspasi (cisteina-aspartasi) sono sintetizzate come proenzimi inattivi e convertiti in proteasi attive in cellule in cui è avviato il processo apoptotico.

La comprensione del meccanismo d'attivazione delle caspasi, inattive in cellule sane, è uno degli obiettivi principali delle ricerche condotte sull'apoptosi.

Differenti segnali di morte portano alla formazione di due distinte sub-unità a partire da procaspasi, in cui a livello di specifici residui di acido aspartico della catena singola viene rimossa una porzione N-terminale.

Le due subunità si assemblano in un tetramero per formare proteasi attive, che danno luogo alla morfologia caratteristica della apoptosi.

Benchè il processo apoptotico sia normalmente associato con i processi fisiologici che avvengono durante lo sviluppo del sistema nervoso, l'apoptosi può essere indotta nei neuroni in vitro da molti stimoli patologici incluso lo stress ossidativo, l'infezione virale, le tossine mitocondriali, la proteina Beta amiloide (9, 31).

Queste osservazioni sono in accordo con ricerche recenti, che hanno confermato che l'apoptosi è un meccanismo di perdita neuronale in un grande numero di malattie neurodegenerative: "stroke", trauma al midollo spinale, malattia di Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica, malattia di Huntington (31).

Tuttavia rimane ancora da chiarire il preciso segnale che attiva l'apoptosi in queste condizioni patologiche (40). Le specie reattive dell'ossigeno hanno un ruolo importante, tra le molecole candidate come secondi messaggeri che possono attivare l'apoptosi neuronale in condizioni patologiche.

L'attivazione dell'apoptosi sembra associata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno. E' stato infatti dimostrato che la produzione di radicali superossidi, nei mitocondri isolati da cellule apoptotiche è dovuta ad una modificazione della normale riduzione dell'ossigeno quando il citocromo c è rilasciato dai mitocondri.

Un probabile meccanismo anti ossidante della proteina Bcl-2 è dato dalla possibilità di bloccare il rilascio di citocromo c.

La modificazione del trasporto di elettroni sull'ossigeno, con la produzione di radicali superossidi, fornisce un meccanismo di "segnale redox" che è concomitante con l'attivazione della caspasi dipendente dal citocromo c. Le sostanze pro-ossidanti come  $H_2O_2$  o i semichinoni possono indurre apoptosi, i radicali liberi dell'ossigeno sono importanti regolatori della apoptosi;

Altri stimoli apoptotici come il trattamento con "Tumor Necrosis Factor" TNF $\alpha$ , lipopolisaccaridi, ceramide, etc. possono stimolare la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) dai mitocondri. Anche nel modello apoptotico indotto da p53 i ROS sono segnali cellulari centrali (36,47).

Al contrario gli agenti antiossidanti, la Manganese Superossido Dismutasi (Mn SOD), i composti che riducono i gruppi tiolici (SH) possono bloccare o ritardare l'apoptosi (28).

Dati presenti in letteratura dimostrano che l'aggiunta di  $H_2O_2$  in colture neuronali provoca apoptosi, mediata dalla proteina Beta-amiloide.

Inoltre sembra che l'acqua ossigenata possa attivare fattori di trascrizione coinvolti nella apoptosi come NF-KB suggerendo che i perossidi possano interagire nell'espressione di geni della morte cellulare in risposta a stimoli neuronali apoptici. Per esaminare il ruolo dell'acqua ossigenata nell'attivazione della apoptosi neuronale, sono stati saggiati gli effetti dell'aggiunta di catalasi a colture neuronali nelle quali veniva indotta l'apoptosi mediante deplezione di glutatione. Poichè l'acqua ossigenata è una specie molecolare non carica capace di attraversare le membrane cellulari, gli AA hanno ipotizzato che la catalasi extracellulare causando la diminuzione dell'acqua ossigenata extracellulare potesse ridurre l'acqua ossigenata intracellulare che verrebbe drenata verso l'esterno.

In effetti la catalasi aggiunta alle colture neuronali è capace di bloccare l'apoptosi neuronale. Tuttavia gli AA hanno evidenziato che l'attività antiapoptica non è dovuta alla catalasi, ma piuttosto all'enzima arginasi contenuto come contaminante nella preparazione della catalasi del fegato bovino. Inoltre gli AA hanno dimostrato che nelle colture di cellule neuronali gli effetti protettivi dell'arginasi sono da attribuire non soltanto alla inibizione dell'ossido nitrico sintasi ma anche alla deplezione di arginina e alla inibizione della sintesi proteica.

Queste osservazioni mettono in evidenza un nuovo meccanismo attraverso il quale l'arginina può partecipare alla regolazione dei processi che intervengono nella morte neuronale e indicano l'enzima arginasi come un nuovo agente attivo nella protezione antiapoptica neuronale.

Attraverso quale meccanismo l'arginasi previene l'apoptosi neuronale (13)?

L'arginasi extracellulare può annullare la necrosi eccitotossica nelle colture corticali neuronali mediante inibizione della produzione di ossido nitrico. In tali condizioni sperimentali, l'arginasi idrolizza l'arginina e impedisce la formazione di ossido nitrico. A favore di questa ipotesi sono anche le evidenze sperimentali che hanno dimostrato come l'aggiunta di ossido nitrico alle colture primarie neuronali è sufficiente per indurre apoptosi o necrosi a seconda della concentrazione di donatori di ossido nitrico. Queste osservazioni assieme ai risultati che dimostrano come l'arginasi e la ossido nitrico sintasi inducibile sono regolate in maniera coordinata in un gran numero di tipi cellulari sono in accordo con l'ipotesi che l'arginasi extracellulare previene l'apoptosi neuronale rimuovendo l'arginina utilizzata per la sintesi di ossido nitrico.

L'attività antiapoptica dell'arginasi è stata dimostrata in una preparazione di arginasi ricombinante pura.

Gli AA hanno dimostrato che, nel modello sperimentale da loro utilizzato, l'effetto antiapoptico dell'arginasi può essere attribuito alla inibizione della sintesi proteica a causa della diminuzione di arginina, la quale a sua volta, porta a un accumulo di t-RNA scarico, e di conseguenza alla fosforilazione del fattore eIF-2 $\alpha$ , alla inibizione della sintesi proteica e alla soppressione del processo apoptico.

L'esatto meccanismo attraverso il quale l'inibizione della sintesi proteica porti a una migliore sopravvivenza cellulare non è chiaro, sono state proposte diverse possibilità come ad es. inibizione di prodotti di geni "killer", "up-regulation" delle difese antiossidanti, presenza di proteine antiapoptiche.

La capacità dell'arginasi di inibire la produzione di ossido nitrico, associata con la necrosi eccitotossica e la sintesi proteica associata con l'apoptosi, permette di prospettare che gli enzimi che depletano l'arginina (infusi direttamente nel liquido cerebro-spinale (CSF) per evitare la deplezione dell'arginina endoteliale) potrebbero essere utili agenti terapeutici nel trattamento delle malattie neurologiche acute come lo "stroke" e il danno al midollo spinale. In tali stati patologici, la morte cellulare dipendente dall'ossido nitrico e mediata dalla NOS neuronale si può osservare per alcune ore o giorni dopo l'insulto iniziale, l'apoptosi (dipendente dalla sintesi proteica) si può osservare per diversi giorni o settimane dall'inizio dell'insulto.

La capacità dell'arginasi di regolare diverse vie metaboliche che portano alla morte neuronale permette di prospettare la possibilità che l'arginasi espressa nel sistema nervoso centrale possa avere il ruolo di regolatore intracellulare o extracellulare della sopravvivenza cellulare o della produzione di ossido nitrico.

In effetti è stata messa in evidenza la presenza dell'arginasi sia come attività enzimatica, che come proteina e come messaggero nel sistema nervoso centrale. Il 50% dell'arginasi presente nel cervello di ratto sembra il prodotto di un gene dominante (l'arginasi I) nel fegato bovino. Il rimanente 50% dell'arginasi cerebrale sembra essere dovuta a un secondo locus non epatico (arginasi II). Oltre alla diversa distribuzione tissutale l'arginasi I e II presentano proprietà differenti relative alle risposte come quelle immunologiche, alla carica, ed alla localizzazione subcellulare. Come già detto l'arginasi I è principalmente citosolica mentre l'arginasi II è localizzata a livello della matrice mitocondriale (19). Lo studio delle differenti funzioni biologiche di questi enzimi e della loro regolazione rimane pertanto un campo di ricerca molto importante da perseguire.

A livello cerebrale, studi immunocitochimici, condotti con un anticorpo specifico per l'arginasi epatica (arginasi I), hanno messo in evidenza che non tutti i neuroni del sistema nervoso centrale contengono l'arginasi I, tuttavia l'enzima è altamente espresso in condizioni basali in un gran numero di regioni cerebrali ivi incluse le cellule del Purkinje cerebellari.

Il contributo del riciclaggio di arginina per la sintesi NO in vivo non è stato stabilito definitivamente.

Se l'arginasi è colocalizzata con la NO sintasi nelle cellule neuronali della corteccia e del corpo striato resistenti alla apoptosi non è noto ma potrebbe essere una interessante possibilità alla luce dei risultati che hanno dimostrato le capacità antiapoptotiche dell'arginasi.

In conclusione, dalla letteratura scientifica più recente, emerge un nuovo ruolo per l'enzima arginasi che suggerisce l'importanza di svolgere ricerche più approfondite sulla localizzazione e la regolazione dell'arginasi nel sistema nervoso centrale, particolarmente allo scopo di evidenziare nuove strategie per regolare la morte cellulare e la sintesi di ossido nitrico in diverse condizioni fisiopatologiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ernest Baldwin " Dynamic aspects of Biochemistry" Cambridge, University Press 1963.
2. Baltrons M.A and Garcia A.(1999) Nitric oxide-independent down-regulation of soluble guanylyl cylase by bacterial endotoxin in astroglial cells. *J. Neurochem.* 73, 2149-2157
3. Bauer P.M., Fukuto J.M., Buga G.M., Pegg A.E. and Ignarro L.J. (1999) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 355-358.

4. Bretz D.S., Hwang P.M., and Snyder S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347, 768-770.
5. Brunet B. and Lapetina E.G. (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide -generating agents. *J.Biol. Chem.* 264, 15, 8455-8458.
6. Buga G.M., Wei L.H., Bauer P.M., Fukuto J.M., Ignarro L.J. (1998) NG-hydroxyl-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, 1256-64
7. Calabrese V., Copani A., Testa D., Ravagna A., Spadaro F., Tendi E., Nicoletti V., Giuffrida Stella A.M. (2000) Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect of nitric oxide on the synthesis of heat shock protein 70 and the oxidant / antioxidant balance in astroglial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* 60, 613-622.
8. Calabrese V., Bates T.E., and Giuffrida Stella A.M. (2000). NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. *Neurochemical Research* 25, 9, 1315-1341
9. Copani A., Condorelli F., Caruso A., Vancheri C., Sala A., Giuffrida Stella A.M., Canonico P.L., Nicoletti F., Sortino M.A. (1999). Mitotic signaling by Beta-amyloid causes neuronal death. *The FASEB Journal*. 13, 2225-2234.
10. Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D., Bretz D.S. and Snyder S.H. (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 6368-6371.
11. Dawson V.L. and Dawson T.M. (1996) Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem. Int.* 29, 2, 97-110
12. Dell'Albani P., Santangelo R., Nicoletti V.G., Giuffrida Stella A.M., de Vellis J. (1999). JAK/STAT signaling pathway is involved in iNOS induction in primary astroglial cell culture. *J. Neurochem.* 73, S71D
13. Esch F., Lin K., Hills A., Zaman K., Baraban J.M., Chatterjee S., Rubin L., Ash D.E. and Ratan R.R. (1998) Purification of a multipotent antideath activity from bovine liver and its identification as arginase: nitric oxide-independent inhibition of neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 18, 11, 4083-4095.
14. Ferber S. and Ciechanover A. (1987) Role of arginine tRNA in protein degradation by the ubiquitin pathway. *Nature* 326, 808-811.
15. Galea E. and Feinstein D.L. (1999) Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J.* 13, 2125-2137.
16. Garthwaite J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14, 2, 60-67.
17. Garthwaite J., Charles S.L. and Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 336, 385-388.
18. Giovannoni G., Heales S., Land J. and Thompson E. (1998) The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis.* 4, 212-217
19. Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K., Takiguchi M. and Mori M. (1996) Molecular cloning of cDNA for non hepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Letters.* 395, 2-3, 119-122.
20. Grima G., Benz B. and Do K.O. (1997) Glutamate-induced release of the nitric oxide precursor, arginine, from glial cells. *E J Neurosci.* 9, 11, 2248-2258.
21. Grima G., Cuenod M., Pfeiffer S., Mayer B. and Do K.O. (1998) Arginine availability controls the N-methyl D-aspartate-induced nitric oxide synthesis: involvement of a glial-neuronal arginine. *J Neurochem.* 71, 2139-2144

22. Hedin SG. Über die Bildung von Arginin aus Proteinkörper. *Z Physiol Chem.* 1895;21:155–168
23. Jenkinson C.P., Groody W.W. and Cederbaum S.D. (1996) Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 114, 1, 107-32
24. Kossel, A. and Dakin, H. D. (1904). "Ueber die Arginase." *Zeit. Physiol. Chemie*, 41, 321
25. H. A. Krebs - K. Henseleit, Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Zeit. Physiol. Chem.*, 210, 1932, 33-66.
26. Lipton S.A. (1996) Distinctive chemistries of NO-related species. *Neurochem. Int.* 29, 2, 111-114.
27. Marletta M.A. (1989) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *TIBS* 14, 488-492.
28. McCann S.M., Licinio J., Wong M.L., Yu W.H., Karanth S. and Rettori V. (1998) The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp. Gerontology.* 33, Nos 7/8, 813-826.
29. McCann SM and Rettori V. (1996) The role of nitric oxide in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 211,1, 7-15
30. Morris S.M. Jr, Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. (1997) Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene.* 9; 193, 2, 157-61.
31. Mu X., He J., Anderson D.W., Trojanowski J.Q., Springer J.E. (1996) Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Ann Neurol.* 40, 3, 379-86.
32. Nicoletti V.G., Caruso A., Tendi E.A., Privitera A., Console A., Calabrese V., Spadaro F., Ravagna A., Copani A. and Giuffrida Stella A.M. (1998) Effect of nitric oxide synthase induction on the expression of mitochondrial respiratory chain enzyme subunits in mixed cortical and astroglial cell cultures. *Biochimie* 80, 871-881.
33. Nussler A.K., Billiar T.R., Liu Z.Z., Morris S.M. Jr. (1994) Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J. Biol Chem.* 269, 2, 1257-61.
34. Palmer R.M., Ferrige A.G. & Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524-526.
35. Palmer R.M., Ashton D.S. and Moncada S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 16, 333, 6174, 664-666.
36. Santoro M.G. (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharm.* 59, 55-63.
37. Schultz E, Steiger E. Uber das Arginin. *Z Physiol Chem.* 1886;11:43– 65.
38. Schmidlin A and Wiesinger H. (1994) Transport of L-arginine in cultured glial cells. *Glia* 11, 262-268
39. Schmidlin A. and Wiesinger H. (1995) Stimulation of arginine transport and nitric oxide production by lipopolysaccharide is mediated by different signaling pathways in astrocytes. *J.Neurochem.* 65, 590-594.
40. Song Z. and Steller H. (1999) Death by design: mechanism and control of apoptosis. *TIBS* 24, M49-52
41. Stockler S. Isbrandt D. Hamfeld F., Schmidt B. and von Figura K. (1996) Guanidino acetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am. J. Hum Genet.* 58, 914-922.
42. Stuehr D.J. (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthase. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 339-359.
43. Suzuki Y.J., Forman H.J. and Sevanian A. (1996) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic.Biol.Med.* 22, 1/2, 269-285



44. Vega-Agapito V., Almeida A., Heales S.J.R. Medina J.M. and Bolanos (1999) J.P. Peroxynitrite anion stimulates arginine release from cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 73, 1446-1452.
45. Vernet D., Bonavera J., Swerdloff R.S., Gonzalez-Cadavid N.F. and Wang C (1998): Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocr.* 139, 7, 3254-3261.
46. Wei L.H., Arabolos, Ignarro L.J. (1998). Certain S-substituted isothioureas not only inhibit NO synthase catalytic activity but also decrease translation and stability of inducible NO synthase protein. *Nitric oxide.* 2, 3, 155-64.
47. Wesler Scullin C. and Rose W.C. (1930) Arginine metabolism. *J Biol Chem.* 89, 109-123.
48. Westergaard N., Beart P.M. and Schousboe A. (1993) Transport of L-3H-arginine in cultured neurons: characteristics and inhibition by nitric oxide synthase inhibitors. *J Neurochem.* 61, 364-367.
49. Wu G. and Morris S.M. Jr (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 336, 1-17.