

Identificazione delle modifiche indotte dal perossinitrito a carico delle tirosine della sinaptofisina, una proteina delle vescicole sinaptiche: implicazioni funzionali

C. Mallozzi, M. Ceccarini, S. Camerini, G. Macchia, M. Crescenzi, T.C. Petrucci, A.M.M. Di Stasi

Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Biologia Cellulare e Neuroscienze, V.le R. Elena, 299 - 00161 Roma

mallozzi@iss.it

Lo stress ossidativo esercita un ruolo importante nell'insorgenza del danno nelle malattie neurodegenerative. In particolare, il danno eccitotossico mediato dalla eccessiva stimolazione del recettore NMDA è stato correlato alla simultanea produzione dei radicali NO e O_2^- e alla conseguente formazione di perossinitrito. La presenza di nitrotirosine nelle proteine è considerato un marcatore specifico della produzione di perossinitrito *in vivo* e una delle cause di interferenza nella trasduzione dei segnali mediati dalla fosforilazione in tirosina. I nostri studi su sinaptosomi di ratto trattati con perossinitrito hanno evidenziato: (i) un aumento del complesso esocitotico, SNARE e del rilascio del glutammato, (ii) la modulazione dell'attività delle chinasi della famiglia di *src*, (iii) la formazione di 3-nitrotirosine a carico di specifiche proteine delle vescicole sinaptiche tra cui la sinaptofisina [1]. La sinaptofisina è una proteina integrale delle vescicole sinaptiche, substrato di della tirosina chinasi *src*, che espone nel versante citoplasmatico la regione C-terminale caratterizzata dalla presenza di nove repeats di un pentapeptide YG(P/Q)QG in cui cinque tirosine hanno un'alta probabilità di fosforilazione. Tale regione è responsabile delle interazioni con le proteine coinvolte nel processo di esocitosi. Abbiamo osservato che il perossinitrito, fino a 100 μ M, stimola la fosforilazione in tirosina della sinaptofisina, mentre a concentrazioni più elevate ne determina la nitratura. Allo scopo di studiare se le modifiche a carico delle tirosine possano influenzare le interazioni della sinaptofisina con *src* e/o con altre proteine coinvolte nel processo di esocitosi, abbiamo espresso la regione codificante l'estremità C-terminale della sinaptofisina (aa 219-307) come proteina fusa alla GST. La proteina di fusione è stata fosforilata *in vitro* da *src*, mentre la forma nitrata è stata ottenuta dopo trattamento con perossinitrito 1 mM. Esperimenti di pull down hanno dimostrato che solo la forma fosforilata di sinaptofisina interagisce in modo specifico con il dominio SH2 di *src* ed è al contempo in grado di stimolarne l'attività enzimatica. Mediante la spettrometria di massa (MALDI-TOF) si è potuto identificare le fosfotirosine indotte nella sinaptofisina dal perossinitrito sia *in vivo* che *in vitro* in due peptidi adiacenti contenenti ciascuno le tirosine 263 e 269 e le tirosine 273 e 283, rispettivamente. Le nitrotirosine, invece, erano presenti in un unico peptide contenente due tirosine in posizione 250 e 257. La presenza di nitrotirosine in questa regione della proteina potrebbe modificare le interazioni della sinaptofisina con altri componenti del complesso di esocitosi modificando il processo che porta al rilascio del neurotrasmettitore. Infatti, risultati preliminari indicano che la sinaptofisina nitrata associa più sinaptobrevina II (VAMP 2), una proteina vescicolare che partecipa alla formazione del complesso SNARE. L'identificazione e la caratterizzazione delle modifiche indotte dal perossinitrito nella sinaptofisina e le conseguenze funzionali di tali modifiche possono contribuire a chiarire il ruolo del perossinitrito nella regolazione dell'attività sinaptica.

[1] A.M.M. Di Stasi, C. Mallozzi, G. Macchia, G. Maura, T.C. Petrucci, and M. Minetti, *J. Neurochem.* 2002, 82, 420-429.