

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Sanitaria

Tesi di Laurea

*“Identificazione e caratterizzazione di molecole
polifenoliche presenti nella sansa di oliva taggiasca con
azione citoprotettiva in neuroni corticali murini”*

Candidato:

Giada Garzillo

Relatore:

Prof.ssa Monica Averna

Correlatore:

Prof.ssa Elena Grasselli

Anno accademico 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1. Olio Extravergine d'oliva e Dieta Mediterranea.....	5
1.2. Recupero dei composti fenolici presenti nelle materie di scarto dell'olio d'oliva.....	6
1.3. Proprietà dei composti fenolici.....	8
1.4. Overattivazione del recettore NMDA (NMDAR).....	10
1.5. Sistema proteolitico Ca ²⁺ -dipendente mediato dalla Calpaina.....	12
2. SCOPO DEL LAVORO.....	17
3. MATERIALI E METODI.....	18
3.1. Reagenti ed anticorpi.....	18
3.2. Colture cellulari.....	18
3.3. Estrazione delle molecole polifenoliche dalla sansa di oliva taggiasca.....	19
3.4. Saggio di vitalità cellulare.....	20
3.5. Analisi di Immunoblot.....	21
3.6. Saggio per quantificare la concentrazione di Ca ²⁺ all'interno della cellula.....	22
3.7. Test di misurazione dell'attività intracellulare della Calpaina.....	22
3.8. HPLC e analisi di spettrometria di massa.....	23
3.9. Analisi statistica.....	25
4. RISULTATI.....	26
4.1. Valutazione della concentrazione massima non tossica di HPTOPE in neuroni corticali murini.....	26

4.2. Effetto di HPTOPE in neuroni corticali murini in condizioni tossiche di glutammato.....	27
4.3. Effetto di HPTOPE in neuroni corticali murini in condizioni tossiche di NMDA e AMPA.....	28
4.4. Effetto di HPTOPE sull'omeostasi intracellulare di Ca ²⁺	31
4.5. HPTOPE previene l'attività proteolitica aberrante della Calpaina-1.....	33
4.6. Identificazione delle molecole presenti in HPTOPE.....	36
5. DISCUSSIONE.....	39
6. BIBLIOGRAFIA.....	43

1. INTRODUZIONE

1.1 Olio extravergine d'oliva e Dieta Mediterranea

Sono ormai noti da anni studi che dimostrano, attraverso l'ausilio di numerosi modelli animali, come la Dieta Mediterranea (MD) sia sempre associata a tanti benefici per la salute, in particolare per l'azione protettiva nell'ambito delle malattie cardiovascolari e prevenzione di alcuni tipi di tumori. Recenti studi dimostrano che una maggiore aderenza alla dieta mediterranea è associata a un minor rischio di disturbi mentali, tra cui il declino cognitivo e la depressione, suggerendo un possibile ruolo nella neuroprotezione. La dieta mediterranea, infatti, è stata associata ad un declino cognitivo più lento e ad un ridotto rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) [1].

Questo modello alimentare è caratterizzato da un elevato consumo di alimenti vegetali (es. verdura, frutta, legumi e cereali), un elevato apporto di olio d'oliva come principale fonte di grassi, un moderato apporto di pesce, un apporto da basso a moderato di latticini, carne e pollame [2].

Olea Europea L. è un albero da frutto nativo dell'Asia minore e della Siria la cui coltivazione si è diffusa in tutta l'area Mediterranea. Per questo motivo, ad oggi i maggiori produttori di olio di oliva sono la Spagna, l'Italia e la Grecia. L'olio extravergine di oliva, estratto tramite procedura di spremitura a freddo dal frutto, è un alimento noto per le sue pregiate proprietà nutrizionali e gli effetti benefici sulla salute [1]. Infatti, in questo alimento sono presenti alti livelli di acidi grassi che rappresentano il 98-99% del peso totale (in particolare acidi monoinsaturi come l'acido oleico) e altri composti come fenoli, fitosteroli, tocoferoli e squalene che possiedono un alto valore biologico anche se presenti in basse percentuali (1-2%) [2].

Tra questi ultimi composti, i fenoli rappresentano una classe di molecole molto studiate in relazione all'effetto antiossidante attribuito all'olio extravergine d'oliva, il quale contiene sia fenolici idrofilici sia fenoli lipofilici [3].

In particolare, le principali sottoclassi di composti fenolici presenti nell'olio extravergine d'oliva sono gli alcoli fenolici, i flavonoidi, i lignani e i secoiridoidi [3].

Recenti studi basati su modelli di economia circolare, promuovono l'uso di tecnologie ecologiche che permettano di recuperare i composti bioattivi che si concentrano nei prodotti di scarto della filiera produttiva dell'olio extravergine di oliva. Infatti, la maggior concentrazione di composti fenolici (circa il 98%) è presente soprattutto nei residui solidi e nelle acque di scarto, mentre solo il 2% si trova nel prodotto finale [4].

Sebbene questi composti siano presenti solo in basse percentuali nel prodotto finale di lavorazione dell'oliva, sono responsabili di diversi effetti benefici sulla salute umana e per questo motivo sono fonte di numerosi studi volti ad avvalorare il consumo di olio d'oliva come frutto di grande interesse medico e scientifico [3].

1.2 Recupero dei composti fenolici presenti nelle materie di scarto dell'olio d'oliva

Attualmente, l'olio extra vergine di oliva può essere ottenuto con due principali processi di macinazione: il sistema a tre fasi, ampiamente utilizzato in Italia, Grecia e altri paesi del Mediterraneo, e il sistema a due fasi, utilizzato principalmente in Spagna. Nel primo caso l'olio d'oliva viene separato da altri due sottoprodotti, le acque reflue di frantoio e una sansa solida (sansa di oliva) mentre, nel secondo sistema, si ottiene solo un rifiuto semisolido che contiene sia acqua che sansa solida. La produzione di grandi quantità di questi sottoprodotti, soprattutto nei 3-4 mesi di produzione intensiva di olio d'oliva, e la variabilità della composizione dei rifiuti sono i principali problemi nella gestione dei residui [3]. La sansa di oliva può raggiungere fino al 30% di produzione di olio di oliva e viene generalmente distribuita mediante spargimento controllato sul suolo agricolo. Tuttavia, una grande quantità di sansa solida di frantoio rimane senza un'effettiva applicazione perché solo piccole quantità vengono utilizzate come fertilizzanti naturali, biomasse combustibili e additivi nell'alimentazione animale. Questo rappresenta un grande problema ambientale. I sottoprodotti dell'olio d'oliva sono impiegati per la produzione di mangimi, cosmetici, alimenti e nutraceutici, mentre l'utilizzo delle acque reflue è consentito solo per l'uso in agronomia. [3]

Pertanto, un uso appropriato di questi residui di olio d'oliva potrebbe non solo migliorare lo stato economico dei produttori di olio d'oliva, ma potrebbe anche ridurre tale problema ambientale. Risulta quindi di grande interesse valutare la possibilità di recuperare un estratto arricchito con composti fenolici, da sottoprodotto a basso costo e largamente disponibile, soprattutto nell'area mediterranea. [6]

L'estrazione di composti fenolici dalla sansa di oliva viene effettuata mediante metodiche che generalmente sfruttano diversi solventi come metanolo/acqua o acetato di etile [8], anche se l'ausilio di questi solventi potrebbe compromettere la stabilità delle molecole polifenoliche presenti nell'estratto [9].

Pertanto, recenti studi mettono in evidenza altre metodiche di estrazione dagli scarti dell'olio d'oliva come microonde ed ultrasuoni [10] o resine assorbenti [11].

Tuttavia, l'interesse è maggiormente rivolto allo sviluppo di nuovi processi basati su tecniche di estrazione più selettive, rispettose dell'ambiente e convenienti. Tra queste tecnologie ritroviamo una metodica che utilizza solventi liquidi a temperatura e pressione elevate, migliorando così le prestazioni di estrazione rispetto a quelle tecniche eseguite a temperatura ambiente e pressione atmosferica. L'estratto che ne deriva si definisce PLE (estratto liquido pressurizzato) [12].

Sebbene questi rifiuti solidi di natura eterogenea possano essere trovati insieme a molti composti chimici, come metalli alcalini (potassio) e alcalino-terrosi (calcio e magnesio), zuccheri, che provengono dall'acqua di vegetazione e poiché solo il 2% dei composti fenolici viene trasferito all'olio e fino al 98% viene trattenuto nel pannello, la sansa di oliva è stata considerata un'interessante fonte di composti fenolici di notevole interesse scientifico. [6]

1.3 Proprietà dei composti fenolici

Negli ultimi anni molti studi si sono concentrati sul ruolo biologico dei composti fenolici, i quali presentano attività come antiossidanti, antiallergici, antinfiammatori, antivirali, antiproliferativi e anticancerogeni. La dieta mediterranea è caratterizzata da un consumo giornaliero di olio extravergine di oliva in quantità comprese tra 25 e 50 g/giorno, per cui è stato ipotizzato che i fenoli presenti nell'olio di oliva possano essere in parte responsabili dell'effetto benefico determinato dalla dieta mediterranea [7].

Un impiego importante dei composti fenolici potrebbe essere correlato a disordini neurodegenerativi, sia cronici, come il morbo di Alzheimer (AD) e il morbo di Parkinson (PD), sia acuti come l'ictus e le lesioni del midollo spinale (LM). I disordini neurodegenerativi sono associati ad elevata morbilità e mortalità e poche o nessuna opzione efficace è disponibile per il loro trattamento. Queste malattie rappresentano un problema sanitario primario [5]. Ad esempio, l'AD è la forma più comune di demenza e colpisce circa 27 milioni di persone in tutto il mondo con un'incidenza che aumenta dall'1% di età compresa tra 60 e 70 anni al 6-8% di 85 anni. Il morbo di Parkinson, la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa, colpisce dall'1% al 2% della popolazione di età superiore ai 65 anni. Questi disturbi condividono caratteristiche patologiche comuni come l'induzione di stress ossidativo, aggregazione proteica anormale, omeostasi del Ca^{2+} perturbata, eccitotossicità, infiammazione e apoptosi [7].

Nell'ambito del sistema nervoso centrale si ha una possibile alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} in seguito a stimolazione dei recettori ionotropici del glutammato i quali, in quanto canali ionici, provocano un massiccio ingresso di Ca^{2+} , altamente coinvolto nel processo di morte neuronale. [7]

Il mantenimento dell'omeostasi della concentrazione di Ca^{2+} è un fattore cruciale per la sopravvivenza delle cellule, infatti questo ione è coinvolto in diverse vie di trasduzione del segnale e regola diversi eventi fisiologici Ca^{2+} -dipendenti [13].

Cambiamenti controllati della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare sono correlati a funzioni cellulari come la proliferazione cellulare, la motilità, la secrezione e l'espressione di geni specifici [14]. Una prolungata e massiva alterazione della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, però, è stata correlata a diverse malattie acute e croniche [15].

L'esaurimento dell'energia e l'aumento del danno ossidativo influenzano la funzione di diverse proteine sinaptiche come la Na^+ e K^+ -ATPasi e possono provocare una perdita dell'omeostasi locale del Ca^{2+} . Inoltre, l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} citosolico promuove l'attivazione di numerosi enzimi intracellulari che possono indurre la generazione di specie endogene reattive dell'ossigeno (ROS) [13]. Il sovraccarico intracellulare di Ca^{2+} è, inoltre, associato ad eccitotossicità e può indurre sia apoptosi che necrosi [17].

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono ossidare e danneggiare le macromolecole cellulari e, per questo motivo, un ruolo fondamentale è rappresentato da antiossidanti esogeni, i quali sono importanti perché hanno una duplice funzione ovvero prevenire l'ossidazione di componenti intracellulari – ed in particolare agire contrastando la lipoperossidazione che rappresenta un danno importante a carico della membrana plasmatica – e allo stesso tempo promuovere la sintesi di agenti antiossidanti già presenti nella cellula [7].

I composti fenolici, che sono presenti in vari alimenti di origine vegetale caratteristici della Dieta mediterranea, come l'olio d'oliva, possono agire come antiossidanti in vari modi: sono implicati nella riduzione di concentrazione di radicali idrossilici, collaborando con i fisiologici sistemi che si occupano della riduzione di specie reattive; riducono la probabilità di aterosclerosi in quanto implicati nell'inibizione dell'ossidazione delle LDL; il loro ruolo antiossidante determina una riduzione dei ROS, e per questo potrebbe essere coinvolto nel contrastare la genesi tumorale [5].

Recenti studi hanno dimostrato che gli effetti benefici dei polifenoli sono presenti anche nella regolazione del Ca^{2+} in maniera diretta, come l'effetto benefico dell'oleuropeina e i suoi metaboliti coinvolti nella disregolazione del Ca^{2+} mediante i canali del Ca^{2+} di tipo T. [16]

Pertanto, è forte e positiva la correlazione tra l'attività dei composti fenolici, in relazione alla quota di essi presenti nella dieta mediterranea, e gli effetti benefici sulla salute umana. [7]

1.4 Overattivazione del recettore NMDA (NMDAR)

Gli amminoacidi eccitatori (EAAs, *excitatory amino acids*) principalmente rappresentati sono L-Glutammato (Glu) e L-Aspartato (Asp). Essi agiscono mediante due grosse categorie recettoriali, localizzate sui neuroni del sistema nervoso centrale: recettori metabotropici e ionotropici. I recettori metabotropici sono recettori accoppiati a proteine G, mentre i recettori ionotropici sono canali per il passaggio di ioni. La famiglia dei recettori ionotropici del glutammato è codificata da 18 geni, i cui prodotti si uniscono per formare canali ionici ligando-dipendenti contenenti un sito di riconoscimento dell'agonista, una subunità transmembrana per il passaggio di ioni e ulteriori subunità che, in seguito a cambiamenti conformazionali indotti dall'agonista, consentono l'apertura o la chiusura del poro di permeazione. I recettori del glutammato mediano la trasmissione sinaptica eccitatoria veloce nel sistema nervoso centrale e sono localizzati su cellule neuronali e non neuronali [17-18]. Questi recettori regolano un ampio spettro di processi nel cervello, nel midollo spinale, nella retina e nel sistema nervoso periferico. I recettori ionotropici del glutammato sono proteine integrali di membrana composte da quattro grandi subunità e vi è una somiglianza di sequenza tra tutte le subunità del recettore note, inclusi i recettori AMPA (α -Amino-3-Idrossi-5-Metil-4-isoxazolpropionato), Kainato e NMDA (N-metil-D-aspartato) [17].

La famiglia dei recettori NMDA (NMDAR) è composta da tre diverse subunità denominate GluN1-3. Le proprietà funzionali specifiche che determinano il ruolo del recettore nella trasduzione del segnale sono determinate dal meccanismo di apertura e chiusura del canale, e dalle caratteristiche strutturali che formano il canale ionico. [18]

Sono diversi i geni che codificano per le subunità del recettore NMDA: un singolo gene GRIN1 codifica per GluN1, quattro geni GRIN2 codificano per GluN2A-D e due geni GRIN3 codificano per GluN3A-B. Tutti i recettori NMDA noti sono eterotetrameri, e le diverse subunità insieme formano un poro per il passaggio ionico centrale. È stato definitivamente dimostrato che la stechiometria del recettore NMDA è costituita da due subunità GluN1 che legano la glicina e due subunità GluN2 che legano il glutammato (cioè recettori GluN1/2). La subunità GluN3 pare sia fondamentale per il legame con la glicina, anche se ad oggi il suo assemblaggio e ruolo fisiologico restano poco chiari [19].

L'attuale modello di apertura del canale propone tre passaggi sequenziali: a) legame del ligando nella sua tasca, b) cambiamenti conformazionali conseguenti alla chiusura del sito di legame con il ligando a conchiglia, c) la propagazione di questi cambiamenti che porta all'apertura del canale [18].

Per l'apertura del recettore NMDA è richiesta la presenza simultanea di due diversi ligandi per l'attivazione di un tipico recettore GluN1/GluN2. Il ligando induce il movimento dei domini inferiori ed ha un impatto immediato sulle regioni linker collegate al canale ionico. La subunità centrale del canale termina con il poro ionoselettivo, che determina le proprietà fondamentali del canale come la permeazione ionica e la conduttanza unitaria. In questa subunità è presente un sito QRN, fondamentale per determinare la permeabilità al calcio [18].

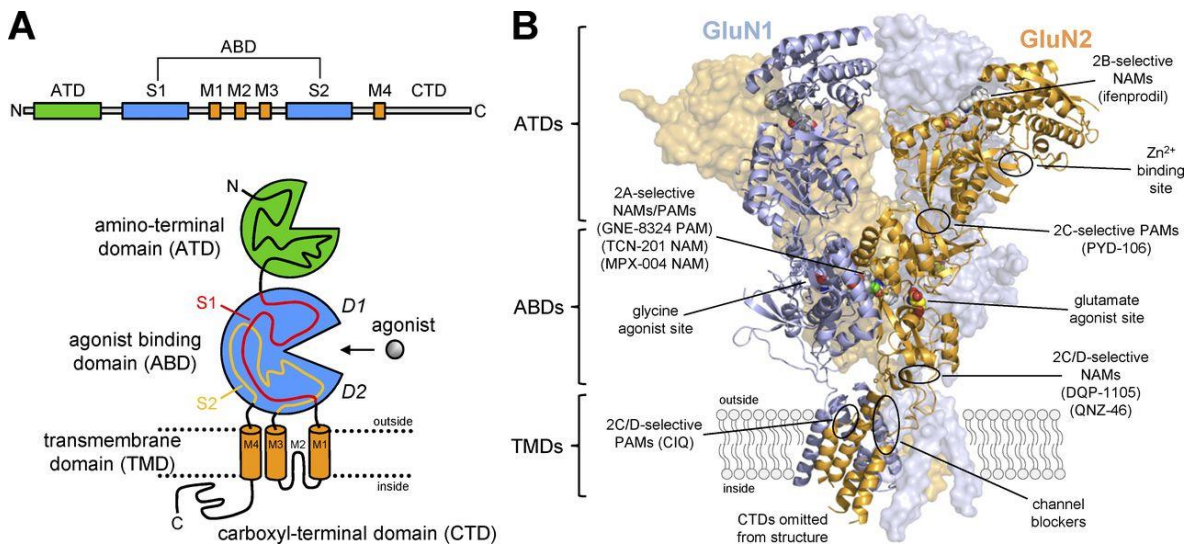


Figura 1: Struttura del recettore NMDA (NMDAR). Il recettore presenta una subunità GluN1, sito di legame della glicina, e una subunità GluN2, sito di legame per il glutammato.

Il poro del recettore NMDA è, però, fortemente bloccato in modo voltaggio-dipendente da Mg^{2+} extracellulare, ma questo blocco può essere rilasciato dalla depolarizzazione che accompagna la rapida attivazione dei recettori AMPA adiacenti, in particolare quando c'è una serie di eventi sinaptici ravvicinati. Pertanto, la corrente ionica mediata dai recettori NMDA dipende sia dal potenziale di membrana che dalla frequenza del rilascio sinaptico. In seguito alla loro attivazione, seguirà un aumento di Ca^{2+} intracellulare, il quale fungerà da mediatore intracellulare con conseguenti cambiamenti nel neurone postsinaptico [19].

La neurotrasmissione glutammatergica eccitatoria tramite il recettore N-metil-d-aspartato (NMDAR) è fondamentale per la plasticità sinaptica e la sopravvivenza dei neuroni. Tuttavia, l'eccessiva attività NMDAR provoca eventi intracellulari in grado di promuovere la morte cellulare, alla base di un potenziale meccanismo di neurodegenerazione verificatosi nella malattia di Alzheimer (AD). Gli studi indicano che gli esiti distinti delle risposte mediate da NMDAR sono indotti da attività recettoriali in regioni specifiche, seguite da diverse vie di segnalazione a valle. L'attivazione di NMDAR sinaptici avvia la plasticità e stimola la sopravvivenza cellulare. Al contrario, l'attivazione di NMDAR extrasinaptici promuove la morte cellulare e quindi contribuisce all'eziologia di condizioni neurodegenerative [20].

In condizioni di eccitotossicità neuronale, l'overattivazione di NMDAR promuove condizioni tossiche per la cellula e dati già presenti in letteratura confermano che esiste una correlazione diretta tra NMDAR e l'attivazione della calpaina [32] [33].

1.5 Il sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente: ruolo fisiopatologico della Calpaina

L'aumento del Ca^{2+} è stato identificato come il principale meccanismo d'innescò di tante patologie. Disturbi dell'omeostasi del Ca^{2+} sono stati osservati anche nei tessuti soggetti anziani con e senza patologie associate all'età come il morbo di Alzheimer. Pertanto, è probabile che alcune delle azioni del Ca^{2+} in eventi patologici discreti siano rilevanti anche per condizioni degenerative meno definite e più protratte nel tempo. Pertanto, i processi calcio-dipendenti rappresentano un punto di convergenza in un insieme eterogeneo di meccanismi degenerativi e sono quindi bersagli logici per strategie di intervento, oltre che rappresentare un potenziale di partenza per generare preziosi markers di patogenesi [21].

Nell'ambito dei possibili markers, le calpaine sono un gruppo di cistein-endopeptidasi intracellulari Ca^{2+} -dipendenti, che sono state identificate in tutti gli eucarioti e batteri, ma non negli archeobatteri. Nell'uomo questo gruppo di enzimi include 15 isoforme, alcune delle quali sono presenti in modo ubiquitario e altre mostrano un profilo di espressione tessuto-specifico. Identificate per la prima volta nel 1964, le calpaine prendono il loro

nome dalla calmodulina con la quale condividono alcuni aspetti funzionali e parte della sequenza amminoacidica. Le calpaine sono implicate in alcuni processi patologici e fisiologici come il rimodellamento del citoscheletro, la proliferazione cellulare, la migrazione, l'invasione, l'apoptosi e la trasduzione del segnale [22].

In seguito alla loro attivazione, le calpaine possono catalizzare i processi proteolitici di proteine intracellulari portando alla modificazione del comportamento cellulare e della vitalità. Poiché l'enzima partecipa non solo nella normale cascata di trasduzione del segnale intracellulare, ma anche in vari stati patologici, gli studi sulle calpaine hanno suscitato un grande interesse sia nella ricerca di base che in quella clinica degli ultimi dieci anni [22]. È documentato il coinvolgimento della loro attività in vari eventi patofisiologici, ma usualmente come un fattore aggravante. Tecniche genetiche hanno dimostrato la relazione causa-effetto tra un deficit di calpaina e una funzione difettiva dei tessuti. Queste condizioni, definite “calpainopatie” sono spesso incompatibili con la sopravvivenza cellulare, dimostrando l'importanza fisiologica delle calpaine [23].

Il sistema della calpaina comprendeva originariamente tre molecole: due proteasi Ca^{2+} -dipendenti, μ -calpaina (conosciuta come calpaina 1) e m-calpaina (conosciuta come calpaina 2), e un terzo polipeptide, la calpastatina, la cui unica funzione nota è quella di inibire le due calpaine. Sia la μ - che la m-calpaina sono eterodimeri contenenti una subunità identica di 28 kDa e una subunità di 80 kDa che condivide l'omologia di sequenza del 55-65% tra le due proteasi. La struttura della m-calpaina rivela sei domini nella subunità 80-kDa: 1) una sequenza NH₂-terminale di 19 aminoacidi; 2) e 3) due domini che costituiscono il sito attivo, IIa e IIb; 4) dominio III; 5) una sequenza estesa di 18 aminoacidi che collega il dominio III al dominio IV; e 6) dominio IV, che assomiglia alla famiglia di polipeptidi *EF-hand*. Il singolo gene della calpastatina può produrre otto o più polipeptidi della calpastatina che vanno da 17 a 85 kDa mediante l'uso di diversi promotori ed eventi di splicing alternativi. Il significato fisiologico di queste diverse calpastatine non è chiaro, sebbene tutte si leghino a tre punti diversi sulla molecola della calpaina; il legame ad almeno due dei siti è Ca^{2+} dipendente [23].

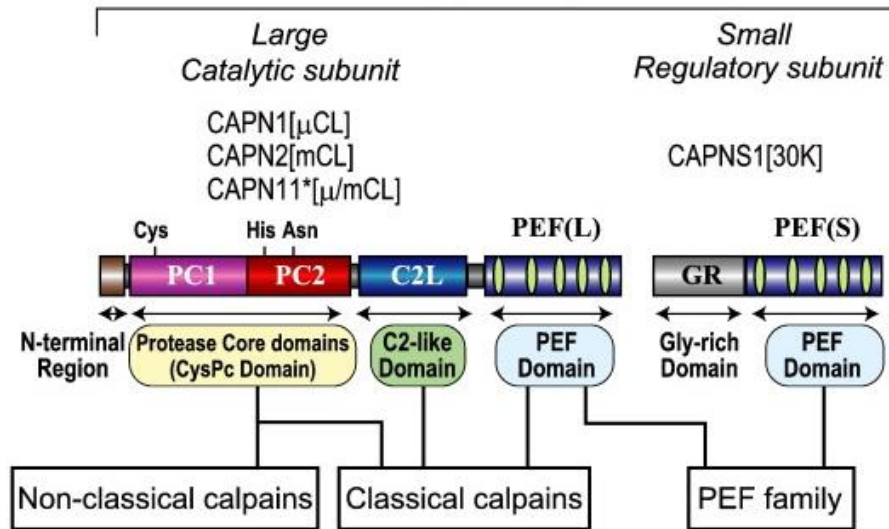


Figura 2: Struttura schematica della calpaina. Le calpaine sono composte da una subunità catalitica grande e una subunità regolatoria piccola.

Il meccanismo catalitico delle calpaine è comune ad altre proteasi, quali cisteina-proteasi, serina-proteasi e treonina-proteasi, e dipende dai 3 amminoacidi collettivamente noti come “triade catalitica”. Il ruolo fisiologico delle calpaine è legato alla trasduzione di segnali extracellulari mediati da variazioni della permeabilità delle membrane al Ca^{2+} o dalla mobilitazione di questo ione dai depositi interni. Queste proteine sono coinvolte in condizioni fisiologiche e fisiopatologiche come la regolazione del ciclo cellulare, l'apoptosi, il rimodellamento del citoscheletro, le malattie di Alzheimer e di Parkinson e le distrofie muscolari [25].

Inoltre, si è dimostrato come la calpaina partecipi ad una varietà di funzioni cellulari come il rimodellamento del citoscheletro/attacco alla membrana durante la fusione cellulare e la motilità, il processamento delle proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, l'espressione genica e la via apoptotica [27].

Ampiamente studiate sono la cinetica del legame del Ca^{2+} e l'inizio dell'attività proteolitica nella calpaina, ed è stato dimostrato che l'attività compare solo dopo un certo ritardo. Questo ritardo è stato attribuito ad un cambiamento conformazionale indotto da Ca^{2+} che rende il sito attivo dell'enzima accessibile al substrato. La maggior parte degli studi biochimici e strutturali riguardano i due enzimi μ - e m-calpaina che esercitano la

loro attività catalitica in vitro a concentrazioni di Ca^{2+} micromolare (10-50 μM) o millimolare (0,2-0,35 mM), rispettivamente. La calpaina del sistema proteolitico attivato dal Ca^{2+} in eritrociti umani è una μ -calpaina, la quale lega in vitro un massimo di otto equivalenti di Ca^{2+} . In vivo, la μ -calpaina sembra essere attivata a concentrazioni fisiologiche di Ca^{2+} di 100-300 μM , suggerendo il coinvolgimento di altri attivatori [25]. In presenza di Ca^{2+} , la subunità di 80 kDa della calpaina va incontro ad autoproteolisi intramolecolare che, per la rimozione del peptide dalla porzione N-terminale, genera un frammento da 75 kDa che presenta un'elevata affinità per il Ca^{2+} . In questo modo gli eventi autoproteolitici contribuiscono a rendere accessibile il sito attivo al substrato [26].

Una diminuzione dell'omeostasi del Ca^{2+} nella cellula può portare a una difettiva regolazione dell'attività della calpaina, accompagnata da una massiva degradazione dei substrati della calpaina stessa. Sebbene sia stato dimostrato che gli inibitori della calpaina possano prevenire o rimuovere l'inizio delle patologie associate alla calpaina, questi studi sono solitamente basati sull'utilizzo di inibitori sintetici che non sono del tutto specifici per la calpaina e spesso non possono essere utilizzati in vivo [25].

L'incremento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare che si verifica in queste condizioni patologiche generalmente non è sufficiente a indurre l'attività proteolitica delle calpaine, specialmente per l'alta richiesta di Ca^{2+} della calpaina-2. In alcuni casi, il Ca^{2+} potrebbe raggiungere i livelli che porterebbero all'attivazione della calpaina-1 ma, piuttosto che attivare la calpaina direttamente, sembrerebbe che l'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} colpisca la regolazione dell'attività della calpaina [26].

Studi precedenti [37] dimostrano che tra i vari substrati della calpaina ritroviamo l'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS). nNOS è una sintasi costitutiva Ca^{2+} -dipendente, ampiamente espressa nel sistema nervoso centrale e regolata finemente dal recettore NMDAR, la quale promuove la produzione di ossido nitrico (NO). L'ossido nitrico (NO), molecola gassosa a diffusione libera, svolge un ruolo fisiologico come secondo messaggero, specialmente nel sistema nervoso centrale. nNOS è correlata a danni cellulari associati alla produzione anormale di NO proprio a causa dell'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} e della successiva proteolisi aberrante da parte della calpaina. Infatti, l'attivazione non necessaria della calpaina e della NO sintasi sono considerati gli

eventi cruciali che portano alla morte cellulare e, per questo motivo, comuni in diverse malattie neurodegenerative umane [28].

È stato dimostrato che nNOS subisce un taglio proteolitico da parte della calpaina, con un meccanismo Ca^{2+} -dipendente, passando da una forma nativa di 160 kDa ad una forma attiva di 130 kDa. Questo evento è un esempio dell'attività proteolitica fisiologica che coinvolge la calpaina, la quale è direttamente coinvolta nella modulazione della produzione di ossido nitrico [29].

Sebbene le calpaine giochino un ruolo in diverse condizioni patologiche come le neurodegenerazioni, malattie oftalmiche, cancro, miopatie, malattie ischemiche, diabete e disfunzioni endoteliali, solo in pochi casi le mutazioni dei geni delle calpaine causano un chiaro stato patologico. In molte di queste patologie associate alla calpaina, infatti, le calpaine non rappresentano le cause genetiche [27].

2. SCOPO DEL LAVORO

Studi precedenti svolti su linee cellulari [31] hanno dimostrato come un estratto ottenuto dalla sansa di oliva taggiasca, con metodiche che sfruttano alta pressione e temperatura (HPTOPE), presenti proprietà peculiari utili alla fisiologia cellulare, come l'azione antagonizzante allo stress ossidativo e un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare di Ca^{2+} .

L'obiettivo di questa tesi è capire se l'effetto protettivo di HPTOPE è presente anche su neuroni corticali murini. La scelta di questo modello avviene per acquisire informazioni utili nell'ambito delle malattie neurodegenerative, le quali presentano spesso un'alterazione nell'omeostasi intracellulare di Ca^{2+} , essenziale per la funzionalità e la sopravvivenza neuronale [15].

L'influsso di Ca^{2+} nei neuroni è garantito dall'attivazione dei recettori glutammatergici maggiormente espressi nel sistema nervoso centrale, in particolare i recettori NMDA (NMDAR) e AMPA (AMPA). Essi sono canali ionotropici in grado di garantire un flusso ionico all'interno della cellula e che, in condizioni di eccitossicità, potrebbero implicare delle conseguenze sull'omeostasi del Ca^{2+} . Un'alterazione del Ca^{2+} è spesso associata ad un danno cellulare che, qualora irreversibile, potrebbe evolvere in morte cellulare.

Lo scopo del mio lavoro è quindi capire se HPTOPE sia in grado di proteggere i neuroni corticali murini da una morte indotta da un sovraccarico di Ca^{2+} in seguito a stimolazione eccessiva dei recettori glutammatergici e, solo in caso di protezione da parte dell'estratto, identificare e caratterizzare le molecole bioattive presenti nell'estratto. Se HPTOPE fosse davvero in grado di proteggere i neuroni corticali murini grazie alle sue proprietà funzionali e non tossiche, potrebbe rappresentare in futuro un punto di partenza per lo sviluppo di nuovi interventi terapeutici nell'ambito delle neurodegenerazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti e anticorpi

NMDA, AMPA, glutammato, MK-801 e poli-L-lisina sono stati acquistati dall'azienda Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Il reagente ECL Select™ per la determinazione dei dati dopo Western Blot e la nitrocellulosa 0.45 µm Amersham™ Protran® Premium sono stati ottenuti da GE Healthcare (Chicago, IL, USA). Calcium-Green™ - 1AM, t-butilossicarbonile (t-BOC), medium Neurobasal™, supplemento B-27, Glutamax®, penicillina e streptomina sono stati acquistati dall'azienda Life Technologies Italia (Milano, Italia). L'anticorpo monoclonale anti-nNOS è stato acquistato da BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA). L'anticorpo monoclonale anti-β-actina arriva dall'azienda Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germania). Gli anticorpi secondari anti-mouse e anti-rabbit e il cocktail di inibitori delle proteasi e fosfatasi sono stati tutti acquistati dalla Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

3.2 Colture cellulari

Le colture di neuroni sono state preparate a partire dalla corteccia cerebrale di embrioni di topo E-18 recuperati da un topo femmina gravida (C57BL/6) anestetizzata con CO₂. Rapidamente, gli embrioni sono stati rimossi, micro-sezionati e pezzi di corteccia di cervello sono stati dissociati mediante digestione enzimatica con tripsina 0.25% per 20 min a 37 °C e successivamente triturati con una pipetta Pasteur. Una volta dissociati, i neuroni sono stati seminati in un supporto per colture cellulari con 0.1 mg/mL di poli-L-lisina. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37 °C, in incubatore con CO₂ al 5%, nel medium Neurobasal™, al quale è stato addizionato B-27 (1:50 v/v), Glutamax® (1% v/v), 10 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomina. Ogni settimana è stato cambiato il 50% del terreno. Alla coltura non è stato aggiunto un agente antimittotico per controllare la proliferazione gliale perché l'utilizzo di un medium di coltura senza siero limita la crescita delle cellule non neuronali. I neuroni hanno maturato la loro piena funzionalità e struttura dopo 14 giorni in vitro.

3.3 Estrazione delle molecole polifenoliche dalla sansa di oliva taggiasca

Le molecole bioattive presenti nella sansa di oliva taggiasca sono state estratte mediante un reattore ad alta pressione e temperatura (HPHT) (modello 4560, PARR Instrument Company, Moline, IL, USA).

HPHT ha il vantaggio di un effetto simultaneo sull'estrazione fenolica dalla sansa di oliva perché le alte temperature, in particolare 180 °C, riducono la viscosità consentendo così una migliore penetrazione delle particelle della matrice e migliorandone l'estrazione. L'aumento delle temperature può anche interrompere le forti interazioni causate dalle forze di van der Waals, dal legame idrogeno e dalle attrazioni dipolo-dipolo tra le molecole di soluto e i siti attivi sulla matrice. L'uso della pressione, pari a 25 bar, dovrebbe facilitare l'estrazione da campioni che sono stati intrappolati nei pori della matrice. Lo scopo della pressurizzazione della cella di estrazione è garantire una maggiore solubilità delle molecole [6].

L'estratto derivante da sansa di oliva (SLE) è stato ottenuto mediante estrazione a temperatura ambiente per 24 ore, utilizzando lo stesso rapporto solido/liquido e la stessa composizione di solvente utilizzata per l'estrazione di HPTOPE. SLE è stato conservato a -20 °C per analisi successive.

Dopo l'estrazione, la fase ottenuta ricca in polifenoli è stata separata dalla sansa di oliva mediante centrifugazione a 6000 xg per 10 min. Successivamente, l'estratto è stato seccato mediante un liofilizzatore (Laborata, Heidolph, Germania) e il campione liofilizzato è stato risospeso in una soluzione di 1 mL contenente etanolo/acqua in rapporto 1:1. L'estratto, conservato a -20 °, risulta stabile in termini di attività biologica e concentrazione totale di polifenoli per oltre 6 mesi.

La concentrazione di polifenoli totale è stata determinata, per entrambi gli estratti, mediante il saggio Folin-Ciocalteu ed espressa come mg equivalenti di acido caffeico (CAE) per mL di solvente ($\text{mg}_{\text{CAF}}/\text{mL}$). I singoli composti fenolici sono stati quantificati con la metodica HPLC, mediante una colonna a fase inversa C18 (modello 201TP54 Vydac, Hesperia, CA, USA) associata ad un rivelatore a serie di diodi.

Sono state ottenute diversi campioni di HPTOPE ma il metodo di estrazione era lo stesso. Dopo l'estrazione ad alta temperatura e pressione, la concentrazione totale di polifenoli e singoli composti fenolici presenti in HPTOPE è riportata in **Tabella 1**.

Polifenoli totali (mg _{CAE} /mL)	19.2
Tirosolo (mg/mL)	0.51
Acido caffeico (mg/mL)	0.23
Acido cumarico (mg/mL)	0.18
Oleuropeina (mg/mL)	3.59
Apigenina (mg/mL)	0.08

Tabella 1: Concentrazione (mg/mL) di polifenoli totali e composti fenolici singoli presenti in HPTOPE. La concentrazione totale di polifenoli è stata ottenuta mediante saggio di Folin-Ciocalteu ed è espressa come mg di acido caffeico equivalenti (CAE) per mL di solvente (mg_{CAF}/mL).

3.4 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio del Rosso Neutro, il quale fornisce una stima della vitalità delle cellule in coltura. Si basa sulla capacità cellulare di internalizzare il Rosso Neutro nei lisosomi per diffusione passiva. I neuroni (2.5×10^4) sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti con 200 μ L di terreno Neurobasal ed esposte agli stimoli indicati nel **capitolo Risultati**. Successivamente sono state incubate con 100 μ L di colorante Rosso Neutro in ogni pozzetto a 37 °C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, per 1 ora. Solo dopo le cellule sono state lavate con 150 μ L di terreno Neurobasal e lisate con una soluzione di lisi (Destain solution) contenente 51% acqua, 48% etanolo e 1% acido acetico. In questo modo il colorante è comparso nel pozzetto in seguito alla lisi cellulare e l'assorbanza è stata rilevata da uno spettrofotometro, impostato ad una lunghezza d'onda di 540 nm.

Questo saggio di vitalità cellulare eseguito con il Rosso Neutro si basa sul principio secondo il quale questo colorante sia in grado di penetrare nelle cellule vitali, nelle quali si posiziona a livello dei lisosomi tramite diffusione passiva. La successiva lisi delle

cellule indotta dall'utilizzo della "Destain Solution" determina la fuoriuscita del colorante accumulato all'interno delle stesse cellule; perciò, i pozzetti appariranno di colore rosa più o meno intenso in base alla quantità di cellule vitali che sono state in grado di trattenere il colorante. Le letture allo spettrofotometro permettono di misurare la vitalità cellulare in rapporto all'intensità del colorante che si trova nel pozzetto dopo la lisi [30].

3.5 Analisi di Immunoblot

I neuroni corticali murini (3×10^5), seminati in piastre da 35 mm, sono stati lisati mediante sonicazione in 150 μ L di 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, contenente 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi 1:100. Il lisato è stato centrifugato a 10.000 xg per 10 minuti a 4 °C, è stato prelevato il surnatante e la quantificazione proteica è avvenuta mediante metodica Lowry. I campioni sono stati bolliti a 95 °C per 5 min. Le proteine (20 μ g/lane) sono state separate mediante elettroforesi in un gel all'8% per separare le proteine in base al loro peso molecolare. Le bande proteiche rilevate tramite elettroforesi, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa utilizzando la tecnica di immunoblot. Per saturare i siti di legame in eccesso, alla membrana di nitrocellulosa è stata aggiunta una soluzione contenente polvere di latte al 5% sciolta in 0.1% Tween/PBS per 1 ora a temperatura ambiente, per prevenire le interazioni tra la membrana e l'anticorpo utilizzato per rilevare la proteina bersaglio. Successivamente, dopo quattro lavaggi con 0.1% Tween/PBS, la membrana è stata incubata per 16 ore a 4 °C in agitazione lenta con l'anticorpo primario: anti-nNOS (1:2500) e anti- β -actina (1:1000), diluiti in 0.1% Tween/PBS.

Trascorse 16 ore, sono stati effettuati quattro lavaggi della membrana di nitrocellulosa con 0.1% Tween/PBS per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso che non ha legato la membrana. Successivamente, la membrana è stata incubata per 1 ora a 22 °C con l'anticorpo secondario (HRP)-linked anti-Mouse (1:5000) diluito in 0.1% Tween/PBS. In questo modo, l'anticorpo secondario legherà l'anticorpo primario e la formazione dell'immunocomplesso consentirà la rilevazione del segnale.

Il segnale immunoreattivo è stato sviluppato con il reagente ECL Select TM per Western Blotting ed acquisito mediante lo strumento ChemiDoc XRS con il software Quantity One Image 4.6.1 (Bio-Rad, Segrate (MI), Italia).

3.6 Saggio per quantificare la concentrazione di Ca²⁺ all'interno della cellula

I neuroni corticali murini (2.5×10^4), seminati in piastre da 96 pozzetti, sono stati incubati in HEPES buffer contenente 10 μ M Calcium GreenTM-1AM, sonda provvista di un gruppo acetossimetil (AM) estere, che consente l'ingresso nella cellula attraverso la membrana plasmatica. Nella cellula la sonda subisce un taglio da parte di fosfodiesterasi e resta all'interno della cellula. Qualora il Ca²⁺ aumenti in seguito a specifica stimolazione, questa sonda diventa fluorescente e consente di rilevare la concentrazione di Ca²⁺ intracellulare in relazione alla fluorescenza.

Dopo 40 min a 37 °C, fase di loading in cui avviene l'ingresso della sonda nelle cellule, le cellule sono state lavate due volte con HEPES buffer e successivamente esposte agli stimoli specifici (vedi **capitolo Risultati**) in presenza o assenza di HPTOPE o MK-801. L'intensità di fluorescenza (eccitazione 485 nm; emissione 535 nm) è stata misurata ogni 10 secondi per 4 min utilizzando la modalità "top reading" nel lettore di piastre LB 940 Mithras (Bertod Technologies, Baden Wurttemberg, Germania). I diversi valori di fluorescenza sono stati calcolati come la differenza tra ogni valore di fluorescenza registrato e quello registrato al tempo zero. I valori ottenuti sono stati sottratti dai valori di controllo.

3.7 Test di misurazione dell'attività intracellulare della calpaina

I neuroni corticali murini (2.5×10^4), seminati in piastre da 96 pozzetti, sono stati incubati a 37 °C per 20 min con 50- μ M t-BOC in HEPES buffer, il quale è un substrato fluorescente della calpaina. Le cellule sono state lavate due volte con HEPES buffer per rimuovere l'eventuale substrato in eccesso, successivamente esposte a NMDA in assenza o presenza di HPTOPE. L'emissione di fluorescenza è stata rilevata al tempo zero e dopo un 1 ora mediante il lettore di piastre Mithras LB 940. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono state 355 e 485 nm, rispettivamente.

3.8 HPLC e analisi di spettrometria di massa

HPTOPE, inizialmente, ha subito un pretrattamento: 10 min a 37 °C, 2 min di agitazione veloce sul vortex e, infine, 10 min a 6.000 xg per separare la frazione insolubile dall'estratto. Dopo tutto questo, 20 µL del sopranatante sono stati uniti a 30 µL di acqua ottenendo un totale di 50 µL utilizzati per l'analisi HPLC mediante lo strumento Agilent 1260 con colonna C18 Luna ® (dimensione del poro di 300 Å, dimensione della particella 5 µm, e 3.9 mm x 150 mm). I parametri con cui è stata effettuata l'analisi sono riportati in **Tabella 2**.

Colonna	Temper.	Eluenti	Gradiente		Flusso	Volume iniettato	λ
			t	% B			
Luna C18 (Dimensioni poro: 300 Å, Dimensioni particelle: 5 µm), 3.9 mm x 150 mm (ID x L)	30 °C	A: H ₂ O + 1% Acido acetico B: CH ₃ CN/CH ₃ OH (1:1)	5	0	1 mL/min	50 µL	220 nm 254 nm
			10	5			
			30	30			
			40	40			
			45	48			
			55	70			
			60	100			

La lettura è stata effettuata a 220/254 nm. Le frazioni sono state raccolte ogni 60 secondi, portate a secco mediante un liofilizzatore e conservate a -20 °C. Sono state successivamente ricostituite con 100 µL di tampone sodio-borato 50 mM (pH 7.5).

Dopo aver effettuato diversi test di vitalità sui neuroni, solo le frazioni significativamente bioattive sono state sottoposte all'analisi di spettrometria di massa.

La separazione cromatografica è stata effettuata mediante Agilent 1100 μ HPLC con un micro-campionatore automatico e una colonna Zorbax C18 (dimensioni poro 300 Å, dimensioni particelle 3.5 μ m, 0.5 mm x 150 mm) mantenuta a 30 °C. I parametri con cui è stata effettuata l'analisi sono riportati in **Tabella 3**.

Colonna	Temp.	Eluenti	Gradiente		Flusso	Volume iniettato	λ
			t	% B			
Luna C18 (Dimensioni poro: 300 Å, Dimensioni particelle: 3.5 μ m), 0.5 mm x 150 mm (ID x L)	30 °C	A: H ₂ O + 0.1% Acido Formico (FOA) B: CH ₃ OH + 0.1% FOA	5	10	20 μ L/min	8 μ L	220 nm 254 nm
			50	100			
			60	100			

Lo strumento prevedeva una spettrometria di massa con una sorgente di elettrospray (ESI) ortogonale e con analizzatore a trappola ionica ad elevata capacità (Agilent 1100 MSD XCT ion trap). Tutti i parametri sono stati stabiliti in modo tale da ottenere la migliore ionizzazione dei componenti presenti nelle frazioni. Le analisi sono state eseguite in modalità "ion-charged control" con target impostato a 100.000 e un tempo di accumulo di 300 ms. I singoli parametri utilizzati sono stati:

- Voltaggio capillare: 3.8 V
- Pressione di nebulizzazione: 20 psi
- Gas essicante: 8 L/min
- Temperatura secca: 360 °C
- Medie di roteazione: 3
- Ampiezza di frammentazione: 0.8 V

Tutti gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità di scansione completa, rompendo le specie più abbondanti sotto ogni picco. L'acquisizione è stata eseguita su ioni negativi e positivi nell'intervallo di massa di 50-1200 e analizzata mediante un software integrato Agilent Data Analysis (LC/MSD Trap Software version 5.3).

3.9 Analisi statistica

I dati sono stati presentati come la media \pm SEM. La significatività delle differenze è stata analizzata tramite ANOVA e successivamente da “post-hoc Turkey’s test”, o dove indicato da *t*-test, utilizzando il software Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), con significato statistico mantenuto a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Valutazione della concentrazione massima non tossica di HPTOPE in neuroni corticali murini

Allo scopo di ottenere le informazioni utili per sostenere le ipotesi di questa tesi, abbiamo utilizzato neuroni corticali murini dopo 14 giorni in vitro (DIV), tempo necessario al raggiungimento di una condizione di maturità nella quale i neuroni corticali murini esprimono al meglio le loro caratteristiche fenotipiche (**Figura 3**).

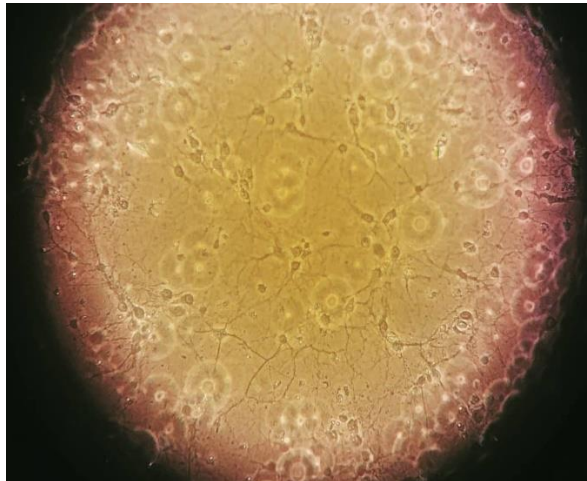


Figura 3: Neuroni corticali murini osservati al microscopio ottico. I neuroni corticali murini hanno raggiunto una condizione di maturità dopo 14 giorni in vitro (DIV).

Al fine di definire le condizioni idonee per gli esperimenti successivi, abbiamo esposto i neuroni corticali murini a concentrazioni crescenti di HPTOPE, per definirne la concentrazione massima non tossica per la cellula. Come mostrato in **Figura 4**, dopo 24 ore di incubazione, abbiamo stabilito che la concentrazione massima non tossica è 10 $\mu\text{g/mL}$, determinata attraverso un saggio di vitalità con Rosso Neutro mediante il quale è evidente che, a concentrazioni superiori di 10 $\mu\text{g/mL}$ di HPTOPE, i neuroni iniziano a morire mostrando una riduzione della vitalità cellulare.

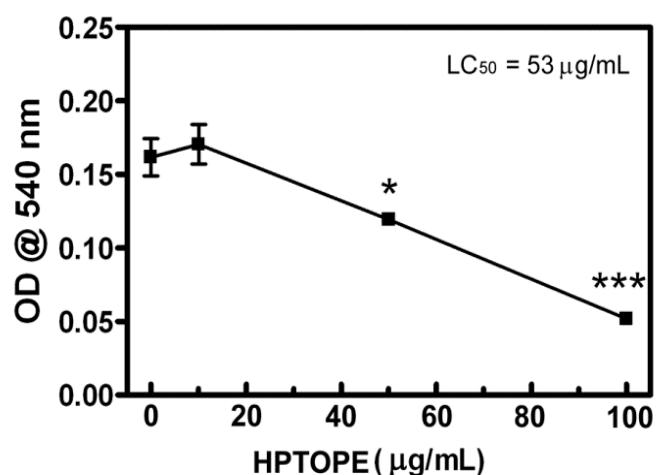


Figura 4: Vitalità cellulare di neuroni corticali murini esposti a concentrazioni crescenti dell'estratto derivante da sansa di oliva taggiasca ottenuto mediante alta temperatura e pressione (HPTOPE). I neuroni sono stati incubati con concentrazioni crescenti di HPTOPE per 24 ore. La vitalità cellulare è stata ottenuta con il saggio di vitalità con Rosso Neutro. I risultati rappresentano le medie \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

4.2 Effetto di HPTOPE in neuroni corticali murini in condizioni tossiche di glutammato

Come ormai noto, la tossicità del glutammato mediata attraverso i propri recettori è implicata in tanti processi neurodegenerativi. L'attivazione dei recettori per il glutammato determina un influsso di Ca^{2+} , il quale agisce come secondo messaggero nella regolazione del rilascio del neurotrasmettitore, nella plasticità sinaptica e nell'espressione genica. L'aumento considerevole di Ca^{2+} è correlato ad eventi intracellulari che possono coinvolgere il processo di morte cellulare [17-20].

Per andare a valutare proprio un'alterazione nell'influsso intracellulare di Ca^{2+} in relazione ad HPTOPE, abbiamo stimolato i neuroni con una concentrazione citotossica di glutammato, equivalente a 300 μM , in presenza di 10 $\mu\text{g/mL}$ di HPTOPE per 24 ore.

Come mostrato in **Figura 5**, quando i neuroni sono trattati con glutammato, HPTOPE non è in grado di proteggere le cellule dalla morte Ca^{2+} -mediata. Questo risultato suggerisce due possibili ipotesi: le molecole bioattive presenti nell'estratto non sono in grado di proteggere le cellule dalla morte causata dalla tossicità del glutammato oppure

che le molecole agiscono attraverso un meccanismo più selettivo, che coinvolge precisi target recettoriali.

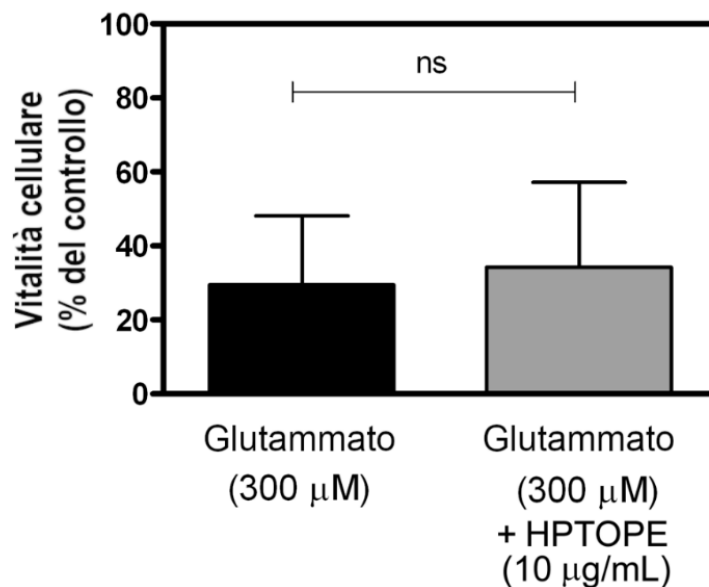


Figura 5: Vitalità cellulare di neuroni corticali murini esposti a glutammato e HPTOPE. Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati trattati per 24 ore con 300 µM di glutammato in presenza o assenza di 10 µg/mL di HPTOPE. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio vitalità con Rosso Neutro. I risultati rappresentano le medie \pm SEM di nove esperimenti indipendenti.

4.3 Effetto di HPTOPE in neuroni corticali murini in condizioni tossiche di NMDA e AMPA

Ipotizzando che HPTOPE possa agire su targets molecolari più specifici implicati nella morte cellulare mediata dalla tossicità del glutammato, abbiamo deciso di stimolare i neuroni utilizzando due agonisti dei principali recettori ionotropici per il glutammato: NMDA (N-Metil-d-Aspartato), agonista selettivo del recettore NMDAR, e AMPA (α -amino(-3-Idrossi-5-Metil-4-isoxazol)-propionato), agonista selettivo del recettore AMPAR.

Entrambi i recettori, ampiamente espressi nel sistema nervoso centrale, sono responsabili dell'influsso di Ca^{2+} nei neuroni in quanto recettori ionotropici [17].

Abbiamo inizialmente stimolato i neuroni corticali murini con 300 μ M di NMDA per 24 ore in assenza o in presenza di 10 μ g/mL di HPTOPE. Come mostrato in **Figura 6A**, HPTOPE previene la morte cellulare. Questo risultato suggerisce che le molecole bioattive presenti nell'estratto agiscono attraverso un meccanismo che coinvolge NMDAR.

Per confrontare al meglio i risultati, abbiamo utilizzato un estratto derivante da sansa di oliva, denominato SLE, ottenuto attraverso estrazione a temperatura ambiente per 24 ore, utilizzando lo stesso rapporto solido/liquido dell'estrazione di HPTOPE. Abbiamo osservato, però, una mancanza dell'effetto protettivo da parte di SLE sui neuroni corticali murini stimolati con la stessa concentrazione di NMDA, diversamente da quanto osservato in presenza di HPTOPE. In entrambi i metodi di estrazione non sono stati utilizzati solventi per valutare al meglio la bioattività delle molecole presenti nell'estratto senza che queste potessero subire delle alterazioni da parte del solvente stesso: nel caso di HPTOPE, però, è bene notare come il metodo di estrazione mediante elevate temperature e pressione preservi le molecole presenti al suo interno, le quali infatti determinano una protezione in caso di stimolazione dei neuroni con NMDA. SLE perde questa capacità protettiva e ciò potrebbe essere correlato alla metodica di estrazione effettuata a temperatura ambiente. Questo dato sottolinea come il metodo di estrazione sia fondamentale al fine di preservare le molecole bioattive e le loro proprietà protettive naturali.

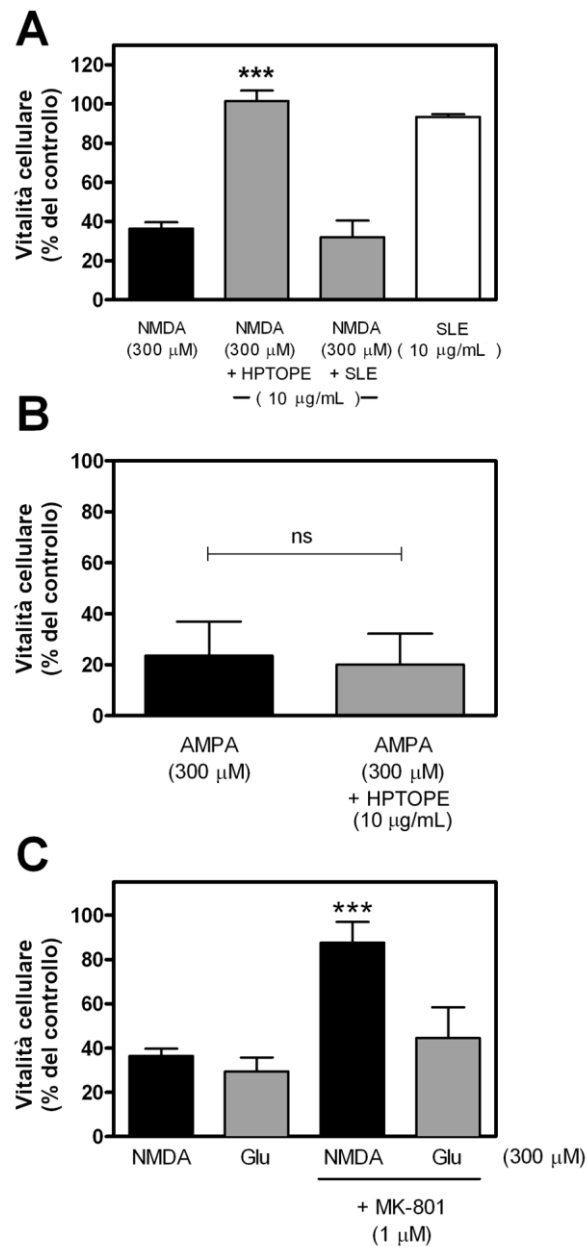


Figura 6: Vitalità cellulare su neuroni corticali murini in seguito a stimolazione con agonisti dei recettori ionotropici per il glutammato. (A) Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati trattati per 24 ore a 37°C con 300 μM NMDA in presenza o assenza di 10 μg/mL di HPTOPE o SLE. I risultati rappresentano le medie ± SEM da quattordici (NMDA e NMDA + HPTOPE) o tre (NMDA e NMDA + SLE) esperimenti indipendenti. **(B)** Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati trattati per 24 ore a 37°C con 300 μM AMPA in presenza o assenza di 10 μg/mL di HPTOPE. I risultati rappresentano le medie ± SEM da due esperimenti indipendenti. **(C)** Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati trattati con 300 μM NMDA e glutammato in presenza o assenza di 1 μM di MK-801. I risultati rappresentano le medie ± SEM da quattordici (NMDA), nove (Glu), sei (Glu + MK-801), o cinque (NMDA + MK-801) esperimenti indipendenti.

Successivamente, abbiamo stimolato i neuroni con le stesse condizioni ma utilizzando 300 μM di AMPA, come mostrato in **Figura 6B**. I risultati dimostrano che HPTOPE non è in grado di proteggere dalla morte cellulare.

Questi risultati dimostrano che l'attività protettiva sui neuroni mediata dalle molecole presenti in HPTOPE è direttamente correlata all'eccitotossicità mediata dall'attivazione del recettore NMDAR. Il trattamento mirato alla stimolazione del recettore AMPAR, infatti, conferma che quando l'influsso di Ca^{2+} è mediato da un recettore ionotropico diverso, HPTOPE non è in grado di prevenire la morte cellulare.

Per supportare quest'ipotesi, abbiamo trattato i neuroni con concentrazioni tossiche di NMDA o glutammato per 24 ore in presenza o assenza di 1 μM di dizocilpina (MK-801), antagonista selettivo di NMDAR che impedisce l'apertura del canale. Come mostrato in **Figura 6C**, MK-801, proprio come HPTOPE, non è stato in grado di contrastare la morte cellulare causata dal glutammato ma ha protetto significativamente i neuroni dalla morte causata dalla stimolazione con NMDA.

4.4 Effetto di HPTOPE sull'omeostasi intracellulare di Ca^{2+}

HPTOPE è in grado di proteggere le cellule dalla morte indotta da una overstimolazione di NMDAR e per questo motivo siamo andati a valutare l'effetto dell'estratto sull'omeostasi di Ca^{2+} , il quale entra nella cellula proprio in seguito a stimolazione da parte del recettore NMDA. Per confermare l'efficacia di protezione delle molecole presenti nell'estratto, abbiamo misurato le variazioni della concentrazione di Ca^{2+} mediante il fluoroforo Calcium GreenTM - 1AM (CG) dopo aver esposto i neuroni a 300 μM di NMDA, AMPA e glutammato. Inoltre, i neuroni sono stati esposti anche a MK-801. Tutti i dati, riportati in **Figura 7**, stimabili con delta di Fluorescenza, dimostrano che HPTOPE preserva la vitalità cellulare agendo in maniera specifica sull'influsso di Ca^{2+} attraverso NMDAR mentre non è in grado di agire sulle cellule quando queste sono stimulate con glutammato o AMPA. Questi risultati dimostrano che HPTOPE è in grado di agire sull'influsso di Ca^{2+} attraverso NMDAR e risulta inefficace quando l'ingresso di Ca^{2+} è promosso da AMPAR o altri recettori per il glutammato. Nonostante ciò, come mostrato in figura **Figura 7E**, MK-801 non è in grado di bloccare l'influsso intracellulare

di Ca^{2+} promosso dalla stimolazione con glutammato, lasciando ipotizzare che, sotto queste condizioni, NMDAR non è l'unico recettore responsabile dell'influsso di Ca^{2+} mediato dal glutammato, e quindi è promossa la morte neuronale.

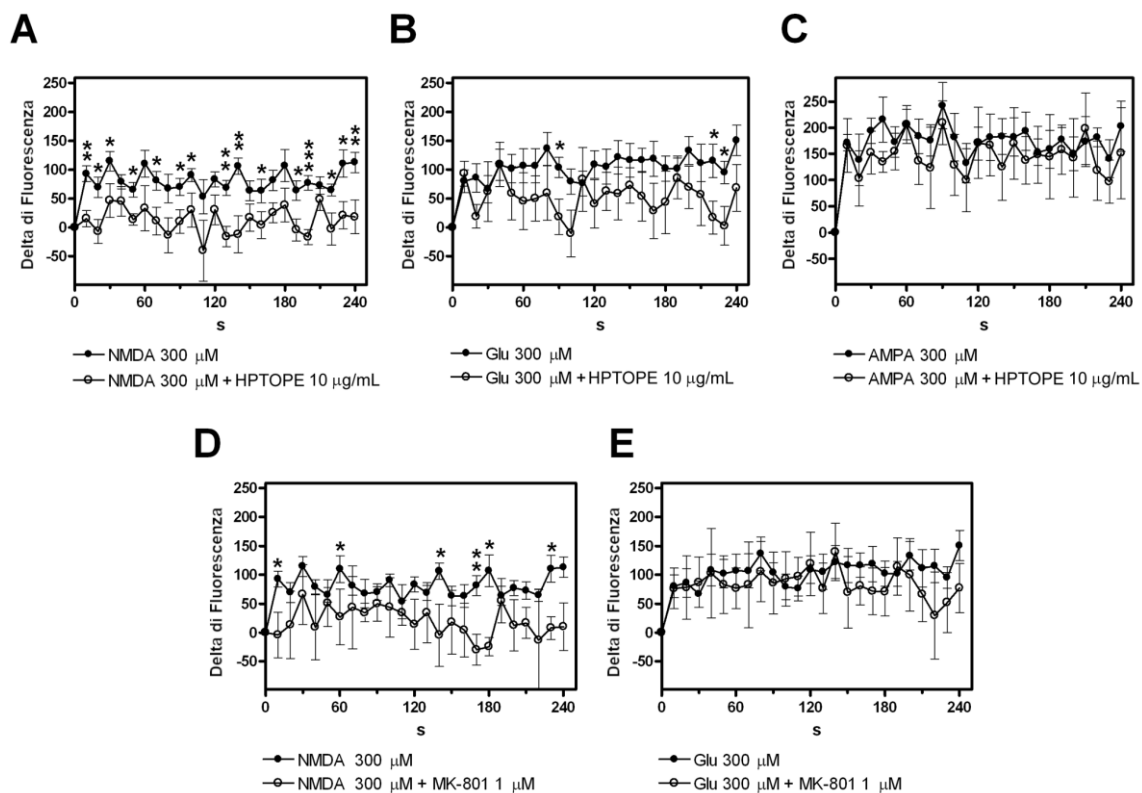


Figura 7: Valutazione dell'incremento di Ca^{2+} in neuroni corticali murini esposti a stimoli citotossici in presenza di HPTOPE. Il Calcium GreenTM – 1AM (CG) è stato caricato nei neuroni trattati con gli agonisti indicati in assenza (●) o in presenza (○) di 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di HPTOPE o 1 μM di MK-801 per il tempo indicato a 37°C. la fluorescenza delta è stata monitorata ogni 10 s per 4 min. La variazione della concentrazione di Ca^{2+} è espressa come “delta di fluorescenza”, cioè la differenza tra la fluorescenza CG-dipendente dei campioni stimolati e quelli di controllo, misurata per entrambi ai tempi indicati e sottratta dalla fluorescenza misurata all'inizio. (A) I risultati rappresentano le medie \pm SEM da sette (●) o sei (○) esperimenti indipendenti. (B) I risultati rappresentano le medie \pm SEM da dieci (●) o sei (○) esperimenti indipendenti. (C) I risultati rappresentano le medie \pm SEM da quattro esperimenti indipendenti. (D) I risultati rappresentano le medie \pm SEM da undici (●) o tre (○) esperimenti indipendenti. (E) I risultati rappresentano le medie \pm SEM da dieci (●) o quattro (○) esperimenti indipendenti.

4.5 HPTOPE previene l'attività proteolitica aberrante della calpaina-1

I cambiamenti intracellulari della concentrazione di Ca^{2+} sono correlati a molteplici funzioni cellulari ma una prolungata e alterata compromissione del suo ingresso all'interno della cellula possono essere correlati a patologie acute e croniche [14-15]. Per questo motivo, l'attività protettiva da parte delle molecole presenti nell'estratto suggerisce un probabile effetto anche sull'attività di sistemi proteolitici Ca^{2+} -dipendenti, primo fra tutti la calpaina.

Per dimostrare un effetto diretto anche sul sistema proteolitico della calpaina, abbiamo incubato i neuroni con un substrato che diventa fluorescente solo in seguito a taglio promosso dalla calpaina-1, ter-butilossicarbonil (*t*-BOC), per correlare l'attività proteolitica intracellulare dell'enzima in diverse condizioni: come mostrato in **Figura 8**, nel caso di stimolazione con concentrazioni tossiche di NMDA, è possibile valutare l'ingresso di Ca^{2+} con un aumento significativo della fluorescenza e quindi un incremento dell'attività proteolitica della calpaina-1; al contrario, quando noi trattiamo i neuroni con NMDA in presenza di HPTOPE, l'inibizione dell'ingresso di Ca^{2+} riduce drasticamente l'attività proteolitica della calpaina. Questi dati suggeriscono che HPTOPE è in grado di agire sul mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} , garantendo una protezione anche dall'attivazione aberrante della calpaina e preservandone la sua attività fisiologica.

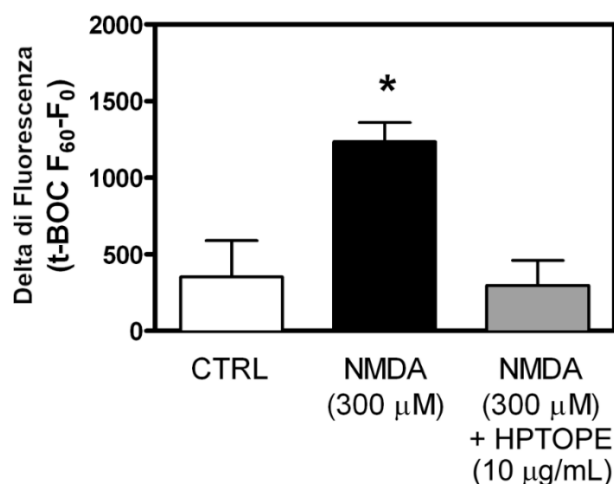


Figura 8: Valutazione dell'attività della calpaina-1 in neuroni corticali murini in seguito a stimolazione del recettore NMDAR in presenza di HPTOPE. ter-butilossicarbonil (*t*-BOC) è stato utilizzato su neuroni corticali murini, i quali successivamente trattati con 300 μM di NMDA in assenza o in presenza di 10 μg/mL di HPTOPE. L'attività proteolitica è espressa come "delta di Fluorescenza", cioè la differenza tra la fluorescenza dipendente da *t*-BOC misurata a 60 minuti (F₆₀) e quella registrata al tempo 0 (F₀). I risultati rappresentano le medie ± SEM da cinque esperimenti indipendenti.

Per confermare ulteriormente che HPTOPE protegge i neuroni dall'attività proteolitica aberrante da parte della calpaina-1, abbiamo valutato anche la digestione enzimatica mediata dalla calpaina-1 su uno dei suoi substrati caratteristici ovvero la ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS).

È stato dimostrato che nNOS subisce un taglio proteolitico da parte della calpaina, con un meccanismo Ca²⁺-dipendente, passando da una forma nativa di 160 kDa ad una forma attiva di 130 kDa [29].

Come mostrato in **Figura 9**, abbiamo analizzato i livelli proteici di nNOS in seguito a trattamento con concentrazioni tossiche di NMDA, osservando un abbassamento dei livelli di entrambe le forme di nNOS, nativa ed attiva. Questo dato dimostra proprio che in seguito a overstimolazione di NMDAR, l'influsso importante di Ca²⁺ determina un'attività aberrante della calpaina, la quale perde il suo ruolo fisiologico e acquisisce un ruolo chiave nella degradazione di entrambe le forme di nNOS. Se invece i neuroni sono trattati con concentrazioni tossiche di NMDA in presenza di HPTOPE, abbiamo osservato, oltre alla conservazione della forma nativa di nNOS, una tendenza

all'accumulo della forma nNOS da 130 kDa attivata, confermando che HPTOPE impedisce l'attività proteolitica aberrante della calpaina, consentendole di mantenere la sua funzione fisiologica.

Considerando nell'insieme tutti i dati raccolti, essi indicano che HPTOPE è in grado di proteggere i neuroni da eventi intracellulari mediati dall'influsso di Ca^{2+} promosso da un'overattivazione di NMDAR, inclusa l'attività proteolitica aberrante della calpaina-1.

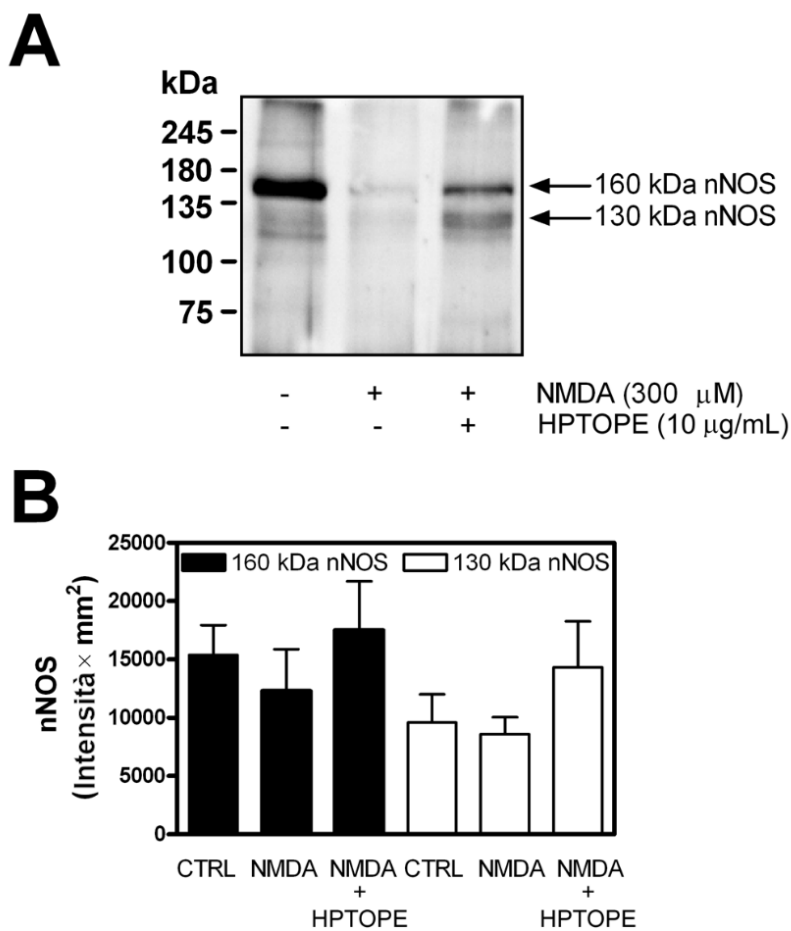


Figura 9: Valutazione dell'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS) in neuroni corticali murini in seguito alla stimolazione di NMDAR in presenza di HPTOPE. Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati incubati per 4 ore con 300 μ M di NMDA in presenza o assenza di 10 μ g/mL di HPTOPE. Le aliquote dei lisati neuronali con il quantitativo totale di proteine sono state sottoposte a SDS/PAGE 8% e immunoblot per nNOS. (A) Un Blot rappresentativo. (B) Le bande immunoreattive sono state quantificate, normalizzate con il segnale della β -actina e riportate come intensità \times mm^3 . I risultati rappresentano le medie \pm SEM da nove esperimenti indipendenti.

4.6 Identificazione delle molecole presenti in HPTOPE mediante spettrometria di massa

Per identificare la struttura e la natura delle molecole bioattive presenti in HPTOPE, abbiamo svolto diverse analisi utilizzando cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), mediante la quale abbiamo ottenuto un profilo cromatografico, mostrato in **Figura 10A**.

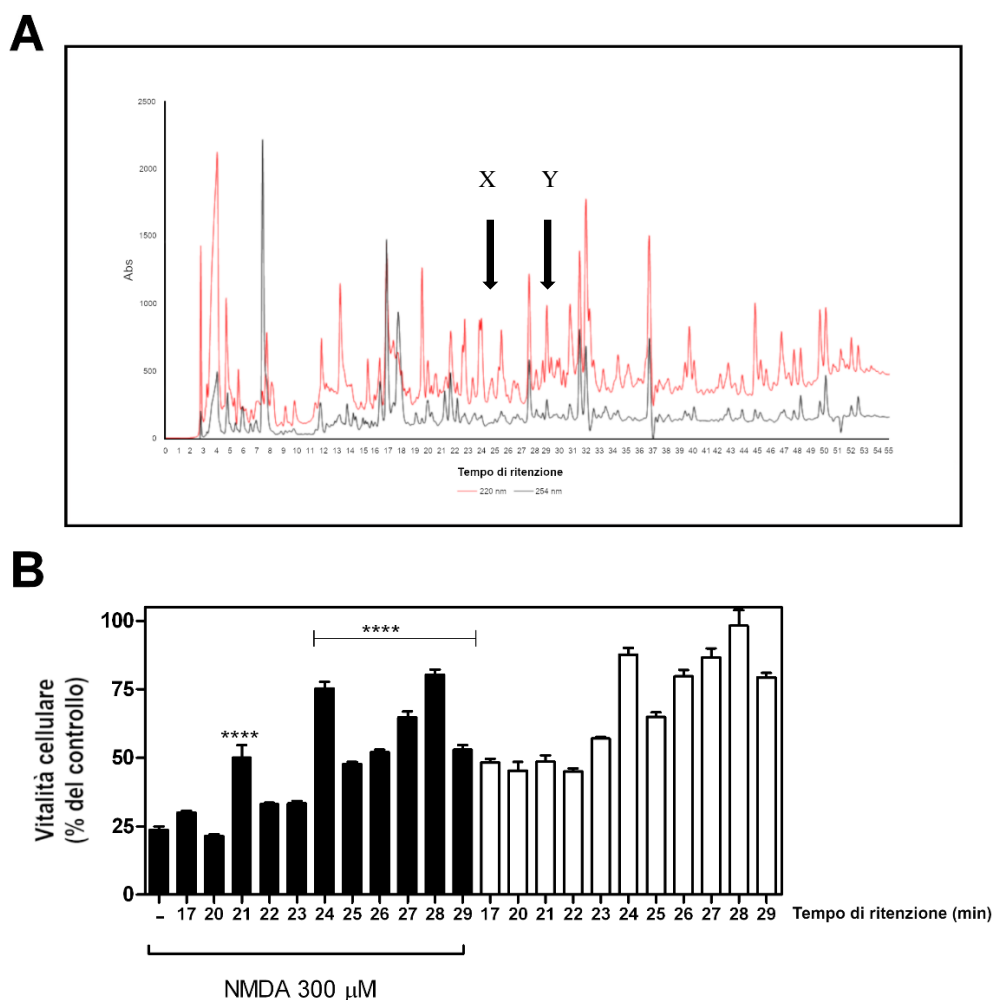


Figura 10: Saggio di frazioni cromatografiche derivanti da HPTOPE. Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati incubati per 24 ore in presenza di diverse frazioni cromatografiche di HPTOPE. **(A)** HPTOPE (20 μ L) è stato frazionato da HPLC ed è stato monitorato a 220 (rosso) e 254 (nero) nm. In X e Y sono presenti le molecole identificate citate precedentemente. **(B)** Un'aliquota (1/10) di esse, ricostituita con 100 μ L di frazione è stata saggiata in presenza (barre nere) o assenza (barre bianche) di 300 μ M di NMDA. La vitalità cellulare è stata valutata con il saggio con Rosso neutro. I risultati rappresentano le medie \pm SEM da un saggio indipendente.

Le frazioni significativamente attive sono state identificate dal minuto 17 al minuto 29. Queste frazioni sono state successivamente testate in presenza o assenza di NMDA (**Figura 10B**) su neuroni corticali murini e poi analizzate con metodiche di spettrometria di massa.

Abbiamo visto che le molecole presenti nelle frazioni identificate mostrano una struttura simile ad altre molecole note per essere presenti nella sansa di oliva, in particolare procianidine (**Figura 11A**), le quali possono organizzarsi in dimeri o trimeri di catechine/epicatechine e/o gallo catechine/epigallo catechine. Dalla spettrometria di massa emerge anche un'altra struttura attribuibile ad un idrossiderivato della loganina (**Figura 11B**).

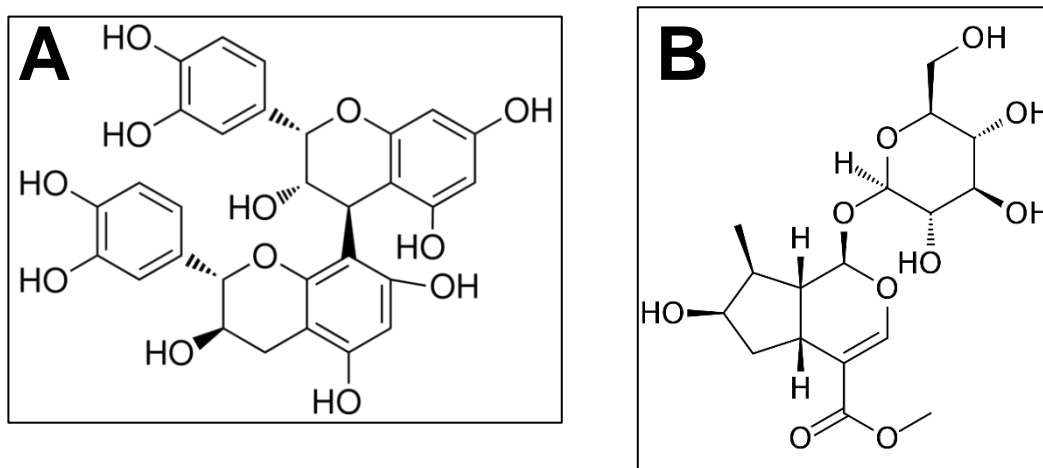


Figura 11: Struttura di Procianidina B2 e Loganina. Le molecole identificate nell'estratto di sansa di oliva taggiasca sono la Procianidina B2 (A) e la Loganina (B).

Sulla base di questi dati, abbiamo testato inizialmente la vitalità dei neuroni in seguito a overstimolazione del recettore NMDAR in presenza o assenza della massima concentrazione non tossica di loganina e procianidina B2, ovvero 0.4 $\mu\text{g/mL}$ e 5.8 $\mu\text{g/mL}$ rispettivamente (**Figura 12A**). Il risultato presente in **Figura 12B** dimostra come la loganina non sia in grado di proteggere le cellule dalla morte cellulare indotta da Ca^{2+} . Questo risultato suggerisce che potrebbe essere la procianidina B2 la molecola bioattiva responsabile dell'effetto protettivo di HPTOPE.

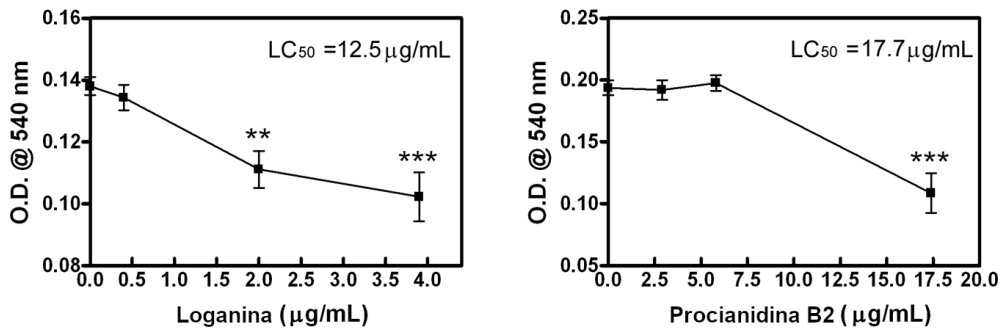
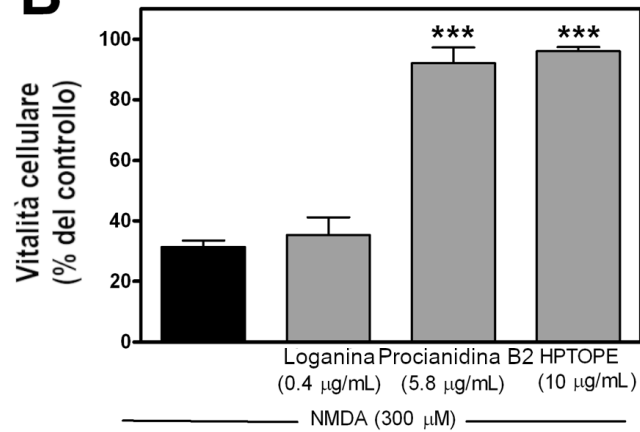
A**B**

Figura 12: Vitalità cellulare di neuroni corticali murini in presenza di loganina o procianidina B2.

Dopo 14 giorni in vitro, i neuroni sono stati esposti per 24 ore agli stimoli indicati, e la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio con Rosso Neutro. **(A)** La vitalità cellulare è stata valutata in seguito all'esposizione di neuroni a concentrazioni crescenti di loganina e procianidina B2. I risultati rappresentano le medie \pm SEM da due esperimenti indipendenti. **(B)** La vitalità cellulare è stata valutata in seguito all'esposizione di neuroni a NMDA in assenza o in presenza degli stimoli indicati. I risultati rappresentano le medie \pm SEM da tre esperimenti indipendenti.

5. DISCUSSIONE

Durante il mio lavoro di tesi abbiamo identificato molecole, estratte dalla sansa di oliva taggiasca, in grado di prevenire la morte cellulare di neuroni corticali murini indotta da un influsso intracellulare di Ca^{2+} , promosso da un'overstimolazione del recettore NMDAR.

In particolare, abbiamo visto che l'estratto riduce l'influsso di Ca^{2+} mediato dall'attivazione di NMDAR in neuroni esposti a concentrazioni citotossiche di glutammato e NMDA e ciò significativamente riscontrabile nella vitalità cellulare delle cellule in seguito a esposizioni con gli stimoli indicati in presenza o assenza di HPTOPE.

Abbiamo dimostrato che la regolazione dell'influsso di Ca^{2+} esercitata da HPTOPE si traduce in una significativa prevenzione nell'overattivazione del sistema proteolitico mediato dalla calpaina.

In condizioni di eccitotossicità neuronale, l'overattivazione di NMDAR promuove condizioni tossiche per la cellula e dati già presenti in letteratura confermano che esiste una correlazione diretta tra NMDAR e l'attivazione della calpaina [32] [33].

È assodato che l'attivazione incontrollata della calpaina è letale nei neuroni [34] e per questo motivo ipotizziamo che la protezione dalla morte cellulare in neuroni trattati con HPTOPE possa essere correlata ad un ripristino dell'attività proteolitica fisiologica della calpaina.

Inoltre, è possibile trovare una correlazione tra l'attivazione aberrante del sistema proteolitico della calpaina e la morte neuronale mediante valutazione della degradazione di alcuni suoi substrati specifici: è questo il caso di nNOS che, in presenza di HPTOPE, subisce un accumulo della sua forma attiva di 130 kDa prodotta dall'attività fisiologica della calpaina. L'inibizione del processo proteolitico aberrante e l'attivazione di nNOS è un meccanismo che previene l'overproduzione di NO [29] [35] e, per questo, ipotizziamo che uno dei meccanismi mediante i quali HPTOPE sia in grado di preservare la vitalità cellulare consiste nella riduzione dell'influsso di Ca^{2+} regolando proprio l'attivazione della calpaina e di conseguenza la produzione di NO.

La calpaina presenta una serie di substrati e tra questi ritroviamo anche Hsp90. “Heat-shock protein 90” (Hsp90) è uno chaperon molecolare coinvolto in diversi processi biologici, tra i quali la maturazione di proteine come chinasi regolatorie, recettori per gli ormoni steroidei, e fattori di trascrizione. Hsp90 è maggiormente implicato nell'assemblaggio di complessi proteici, favorendo l'acquisizione del corretto folding di diverse proteine [36].

Il processo proteolitico di attivazione di nNOS con produzione della forma di 130 kDa vede un'implicazione di Hsp90 che non viene degradato, in quanto fa da “protettore” per la forma di 130 kDa [37]. Ciò significa che la presenza di Hsp90 è indice di una regolazione della calpaina per cui si ha una produzione fisiologica della forma di 130 kDa di nNOS, garantendo un controllo anche sulla produzione di NO.

Anche questo processo di digestione di Hsp90 mediato da calpaina è modulato dall'azione di HPTOPE, infatti abbiamo osservato che in caso di morte cellulare, si ha una degradazione di Hsp90 mentre, in caso di protezione dalla morte da parte di HPTOPE, Hsp90 è nuovamente presente nella cellula in quantità fisiologiche parallelamente ad un accumulo della forma nNOS di 130 kDa.

Quando l'attività della calpaina è incontrollata, viene degradato Hsp90 che non è quindi più in grado di proteggere la forma 130 kDa di nNOS, la quale infatti scompare. Questa è proprio la condizione che abbiamo osservato in seguito a trattamento dei neuroni con concentrazioni di NMDA tossiche, simulando una condizione di eccitotossicità.

In seguito alle analisi di spettrometria di massa abbiamo identificato le molecole responsabili dell'effetto protettivo di HPTOPE, le quali appartengono alla famiglia delle procianidine. È noto in letteratura [38] come queste molecole, presenti nell'oliva ma anche in cacao, mele e uva, possano giocare un ruolo attivo nella neuroprotezione, mediando effetti contro l'eccitotossicità indotta dal glutammato.

Dopo aver testato la procianidina B2 su neuroni corticali murini in condizioni di overattivazione di NMDAR, abbiamo visto che questa molecola è in grado di proteggere i neuroni con un effetto simile a quello esercitato da HPTOPE nelle medesime condizioni.

Abbiamo ipotizzato che le molecole derivate dalle procianidine, organizzate in dimeri/trimeri di catechine/epicatechine e/o gallocatechine/epigallocatechine, potessero essere tra le molecole principali responsabili dell'attività di HPTOPE. A sostegno di questa ipotesi, diversi studi [39] hanno dimostrato che il rilascio di procianidine dalla matrice vegetale è direttamente proporzionale ad un aumento della temperatura, la quale determina una diminuzione della viscosità e della tensione superficiale dei solventi, favorendo un aumento di velocità di trasferimento di particelle dalla matrice.

Un aumento della temperatura può portare ad una elevata solubilità di alcune molecole ma, d'altro canto, può essere causa di una minore solubilità di altri, a causa di cambiamenti della loro struttura [40].

Più nello specifico, studi recenti [41] dimostrano che il recupero delle procianidine è promosso con l'aumento della temperatura, soprattutto a temperature superiori a 100 °C.

Infatti, durante le nostre analisi, grazie all'ausilio del reattore ad alta temperatura e pressione, siamo riusciti ad estrarre una buona quota di molecole bioattive quindi l'elevata temperatura durante l'estrazione è sicuramente un ottimo approccio, qualora si voglia preservare l'integrità strutturale delle molecole. Tutte queste considerazioni evidenziano l'importanza dell'estrazione scelta per il nostro lavoro perché le condizioni utilizzate per estrarre HPTOPE sono fondamentali al fine di preservare le proprietà bioattive delle molecole presenti in esso. Questo dato è stato confermato anche dall'assenza dell'effetto protettivo per l'estratto ottenuto da sansa di oliva a temperatura ambiente (SLE).

A questo proposito, è anche fondamentale sottolineare che in HPTOPE, nonostante l'elevata temperatura di estrazione (180 °C), non sono state rilevate tracce di 5-(idrossimetil)furfurale da analisi HPLC-MS/MS. L'assenza di questo composto furanico, che generalmente si forma durante la reazione di Maillard, potrebbe indicare che non si sono verificate reazioni di degradazione durante il processo di estrazione. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di elevate concentrazioni di etanolo (50%) e all'assenza di ossigeno nell'estrattore [42].

In futuro seguiranno nuove analisi mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) per ottenere maggiori informazioni circa la struttura delle molecole presenti in HPTOPE in quanto il limite della spettrometria di massa è proprio quello di correlare i dati ottenuti a sequenze già note archiviate in database [43], senza però garantire nessuna informazione approfondita sulla struttura, considerando anche che le metodiche di estrazione potrebbero indurre modifiche strutturali non rilevabili.

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è una metodica che potrebbe fornire un grande aiuto nell'identificazione strutturale della molecola d'interesse in quanto è un potente strumento per accedere alla dinamica e alle interazioni delle macromolecole biologiche. Possono essere raccolte informazioni sull'interfaccia di legame ma anche sulle costanti cinetiche e termodinamiche [44].

In conclusione, i nostri risultati evidenziano che HPTOPE è in grado di preservare l'omeostasi di Ca^{2+} intracellulare, proteggendo i neuroni dagli effetti avversi indotti dall'overattivazione di NMDAR, inclusa l'attivazione aberrante della calpaina. Considerando l'effetto irreversibile che deriva dall'alterazione del Ca^{2+} e dall'attivazione patologica della calpaina, entrambi considerati tra i fattori neurodegenerativi più importanti [45] [46], attualmente lo sviluppo di approcci affidabili per prevenire questi eventi rappresenta un obiettivo cruciale per contrastare le malattie neurodegenerative.

Gli obiettivi futuri sono identificare nello specifico la struttura delle molecole presenti in HPTOPE, caratterizzare ogni elemento biologicamente attivo in termini di concentrazione, eventuali interazioni con altri elementi, possibili effetti collaterali negativi e la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica.

Date le importanti proprietà biochimiche e funzionali di HPTOPE su neuroni corticali murini e, come nelle nostre condizioni sperimentali, la possibilità di estrarlo facilmente senza produrre composti tossici per i neuroni, è possibile ipotizzare un suo eventuale utilizzo per nuovi interventi terapeutici in ambito di malattie neurodegenerative.

6. Bibliografia

- [1] Martini D. “Health Benefits of Mediterranean Diet”. *Nutrients*. 2019; 11, 1802.
- [2] Féart C, Samieri C, Allès B, Barberger-Gateau P. Potential benefits of adherence to the Mediterranean diet on cognitive health. *Proc Nutr Soc*. 2013 Feb;72(1):140-52. doi: 10.1017/S0029665112002959. Epub 2012 Dec 11. PMID: 23228285.
- [3] Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*. 2019 Aug 1;11(8):1776. doi: 10.3390/nu11081776. PMID: 31374907; PMCID: PMC6724211.
- [4] Tripoli Elisa, Giammanco Marco, Tabacchi Garden, Di Majo Danila, Giammanco Santo, Guardia Maurizio, 2005, “The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health”, *Vl. 18*, 10.1079/NRR200495, *Nutrition research reviews*
- [5] Cecchi L. et al.; A two-phase olive mill by-product (pate) as a convenient source of phenolic compounds: content, stability and anti-aging properties in cultured human fibroblasts (2018); *Journal of functional foods*; VOL. 40; 751-759.
- [6] Aliakbarian B., Casazza A.A., Perego P., “Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor”, *Food chemistry*, 128, 704-710, Apr 2011.

[7] Angeloni, C.; Malaguti, M.; Barbalace, M.C.; Hrelia, S. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2230.

[8] Kalogerakis N, Politi M, Foteinis S, Chatzisyneon E, Mantzavinos D. Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J Environ Manage.* 2013 Oct 15;128:749-58. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.06.027. Epub 2013 Jul 12. PMID: 23851320.

[9] Rubio-Senent F, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A, Fernández-Bolaños J. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities. *J Agric Food Chem.* 2012 Feb 8;60(5):1175-86. doi: 10.1021/jf204223w. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22225465.

[10] Morsi, Mohamed S., Samy Mohamed Galal and Obaidh Alabdulla. "Antioxidative Activity of Olive Pomace Polyphenols Obtained by Ultrasound Assisted Extraction." (2016)

[11] Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis AL, Mikros E, Tsaobopoulos A, Gikas E, Spanos I, Manios T. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2007 Apr 4;55(7):2671-6. doi: 10.1021/jf063091d. Epub 2007 Mar 10. PMID: 17348673.

[12] Cea Paze I, Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, Nuñez H, Robert P, Segura-Carretero A. Obtaining an Extract Rich in Phenolic Compounds from Olive Pomace by Pressurized Liquid Extraction. *Molecules.* 2019 Aug 27;24(17):3108. doi: 10.3390/molecules24173108. PMID: 31461900; PMCID: PMC6749438.

[13] Berridge MJ., Lipp P., Bootman MD.; The versatility and universality of calcium signaling (2000); *Nat Rev Mol Cell Biol*; VOL.1; 11–21.

[14] Ray SK., Banik NL.; Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration (2003); *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*; VOL.2; 173–189.

[15] Giacomello M., Oliveros JC., Naranjo JR., Carafoli E.; Neuronal Ca²⁺ dyshomeostasis in Huntington disease (2013); *Prion.*; VOL.7; 76–84.

[16] Marchetti C, Clericuzio M, Borghesi B, Cornara L, Ribulla S, Gosetti F, Marengo E, Burlando B. Oleuropein-Enriched Olive Leaf Extract Affects Calcium Dynamics and Impairs Viability of Malignant Mesothelioma Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:908493. doi: 10.1155/2015/908493. Epub 2015 Nov 26. PMID: 26693247; PMCID: PMC4674619.

[17] Traynelis, Stephen F et al. “Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function.” *Pharmacological reviews* vol. 62,3 (2010): 405-96

[18] V. Vyklicky et Al., Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels, *Physiol.Res.*63:S191-S203,2014

[19] Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol.* 2018;150(8):1081-1105

[20] Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1041-1048

[21] Vanderklish PW, Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(5):323-339.

[22] Hosseini M., Najmabadi H., Kahrizi K.; Calpains: Diverse functions but Enigmatic (2018); *Archives of Iranian Medicine (AIM)*; VOL. 21(4); 170-179.

[23] Ono Y., Sorimachi H.; Calpains-an elaborate proteolytic system (2012); *Biochim. Biophys. Acta.*; VOL. 1824; 224-236.

[24] Adachi Y, Ishida-Takahashi A, Takahashi C, Takano E, Murachi T, and Hatanaka M. Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells. *J Biol Chem* 266: 3968–3972, 1991

[25] Dainese E. et al., “Conformational Changes of Calpain from Human Erythrocytes in the Presence of Ca²⁺”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 43, no. 277, 296-301, 2002.

[26] Michetti M, Salamino F, Minafra R, Melloni E, Pontremoli S. Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem J*. 1997;325 (Pt 3)(Pt 3):721-726.

[27] Goll DE., Thompson VF., Li H., Wei W., Cong J.; The calpain System (2003); *Physiol Rev*; VOL. 83; 731-801.

[28] Gu, Yuanyuan, and Dongya Zhu. “nNOS-mediated protein-protein interactions: promising targets for treating neurological and neuropsychiatric disorders.” *Journal of biomedical research* vol. 35,1 (2020): 1-10

[29] Aversa, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Beccaria, F., Salamino, F., Pontremoli, S. and Melloni, E. (2009), Calpain-mediated activation of NO synthase in human neuroblastoma SK-N-BE cells. *Journal of Neurochemistry*, 110: 412-42

[30] Repetto G., Del Peso A., Zurita JL.; Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity (2008); *Nature protocols*; VOL. 3; 50, 1125-1131.

[31] Monica Aversa, Alessandro A. Casazza, Antonino Martines, Marco Pedrazzi, Alice Franchi, Roberta De Tullio, Patrizia Perego, Edon Melloni “Cell protection from Ca²⁺-overloading by bioactive molecules extracted from olive pomace” (2018), *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2017.1422181

[32] Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014 Apr; 115:157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24361499.

[33] Qiu, Li-Li et al. “Dysregulation of BDNF/TrkB signaling mediated by NMDAR/Ca²⁺/calpain might contribute to postoperative cognitive dysfunction in aging mice.” *Journal of neuroinflammation* vol. 17,1 23. 16 Jan. 2020, doi:10.1186/s12974-019-1695-x

[34] Gold M, Koczulla AR, Mengel D, Koepke J, Dodel R, Dontcheva G, Habib P, Bach JP. Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition. *J Neurol Sci.* 2015 Dec 15;359(1-2):356-62. doi: 10.1016/j.jns.2015.11.016. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26671142.

[35] Pedrazzi M, Averna M, Sparatore B, Patrone M, Salamino F, et al. , “Potentiation of NMDA Receptor-Dependent Cell Responses by Extracellular High Mobility Group Box 1 Protein” (2012) , *PLOS ONE* 7(8): e44518.

[36] Prodromou, Chrisostomos. “Mechanisms of Hsp90 regulation.” *The Biochemical journal* vol. 473,16 (2016): 2439-52. doi:10.1042/BCJ20160005

[37] Averna, Monica et al. “Proteolytic degradation of nitric oxide synthase isoforms by calpain is modulated by the expression levels of HSP90.” *The FEBS journal* vol. 274,23 (2007): 6116-27. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06133.x

[38] Sutcliffe, Taylor C et al. “Procyanidin B2 Protects Neurons from Oxidative, Nitrosative, and Excitotoxic Stress.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* vol. 6,4 77. 13 Oct. 2017, doi:10.3390/antiox6040077

[39] García-Marino, Matilde & Rivas-Gonzalo, Julián & Ibáñez, Elena & Concepción, Garcia Moreno. (2006). Recovery of catechine and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta.* 563. 44-50. 10.1016/j.aca.2005.10.054.

[40] Guimarães, Daniela & Gasparetto, Carlos. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*. 38. 77-80. 10.1016/j.lwt.2004.03.013.

[41] Vergara-Salinas, José R et al. "Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 61,28 (2013): 6929-36. doi:10.1021/jf4010143

[42] Huaman-Castilla, N.L.; Martínez-Cifuentes, M.; Camilo, C.; Pedreschi, F.; Mariotti-Celis, M.; Pérez-Correa, J.R. The Impact of Temperature and Ethanol Concentration on the Global Recovery of Specific Polyphenols in an Integrated HPLC/RP Process on Carménère Pomace Extracts. *Molecules* 2019, 24, 3145.

[43] Hale, Oliver J, and Helen J Cooper. "In situ mass spectrometry analysis of intact proteins and protein complexes from biological substrates." *Biochemical Society transactions* vol. 48,1 (2020): 317-326. doi:10.1042/BST20190793

[44] Marion, Dominique. "An introduction to biological NMR spectroscopy." *Molecular & cellular proteomics : MCP* vol. 12,11 (2013): 3006-25. doi:10.1074/mcp.O113.030239

[45] Yildiz-Unal, Aysegul et al. "Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration." *Neuropsychiatric disease and treatment* vol. 11 297-310. 5 Feb. 2015, doi:10.2147/NDT.S78226

[46] Hardingham, Giles E. "Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events." *Biochemical Society transactions* vol. 37,Pt 6 (2009): 1147-60. doi:10.1042/BST0371147