

*Alla mia famiglia, a mio nonno  
e a Peppe.*



## **INDICE**

<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>SOMMARIO</b> .....	2
<b>CAPITOLO 1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI</b> .....	3
<b>CAPITOLO 2. NUTRIZIONE E DISORDINI DELLO SPETTRO AUTISTICO</b> .....	6
2.1. COMUNICAZIONE TRA CERVELLO E INTESTINO .....	6
2.2. CARATTERISTICHE DEI DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO.....	7
2.3. LA DIETA NELL'AUTISMO.....	7
2.3.1. LA DIETA GLUTEIN-FREE/CASEIN-FREE.....	8
2.4. LE MICOTOSSINE.....	9
<b>CAPITOLO 3. RUOLO DEGLI ANTIOSSIDANTI NELLA SALUTE DELL'UOMO</b> .....	16
3.1. ANTIOSSIDANTI ESOGENI.....	17
<b>CAPITOLO 4. RISULTATI DELLO STUDIO SUL POSSIBILE RUOLO DELLE MICOTOSSINE NELL'AUTISMO</b> .....	26
4.1. SELEZIONE DI TARGETS PROTEICI PER LE MICOTOSSINE MEDIANTE UN APPROCCIO DI DOCKING INVERSO .....	26
4.2. RISULTATI DEL DOCKING MOLECOLARE TRA LE MICOTOSSINE E LE PROTEINE SELEZIONATE MEDIANTE DOCKING INVERSO .....	30
4.3. RISULTATI DELLE INTERAZIONI TESTATE <i>IN VITRO</i> .....	40
4.3.1. SAGGI DI DOT BLOT.....	40
4.3.2. SAGGI DI FLUORESCENZA STATICA.....	40
4.3.3. RISULTATI SAGGI DI FLUORESCENZA RISOLTA NEL TEMPO .....	47

4.3.4. RISULTATI DEI SAGGI DI TERMOFORESI SU MICROSCALA.....	50
4.4. CONCLUSIONI SUL POSSIBILE COINVOLGIMENTO DELLE MICOTOSSINE NELL'EZIOLOGIA DELL'AUTISMO .....	54
CAPITOLO 5. STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI A CUI PRENDONO PARTE GLI ANTIOSSIDANTI .....	56
5.1 RICERCA DI POSSIBILI TARGETS PROTEICI PER GLI ANTIOSSIDANTI MEDIANTE UN APPROCCIO DI DOCKING INVERSO .....	56
5.2. ANALISI DELLE INTERAZIONI PROTEINA-LIGANDO MEDIANTE DOCKING MOLECOLARE .....	58
5.2.1. RISULTATI DEL DOCKING MOLECOLARE SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA .....	58
5.2.2 DOCKING FOCALIZZATI SUL SITO DI LEGAME DELLE PROTEINE .....	67
5.2.3 DOCKING MOLECOLARE TRA TARGETS PROTEICI E COFATTORI.....	77
5.3. ANALISI FUNZIONALE DEI TARGETS PROTEICI SELEZIONATI PER GLI ANTIOSSIDANTI PRESENTI NEGLI ESTRATTI POLIFENOLICI DELLE MELE .....	79
5.4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE SULLE INTERAZIONI DEGLI ANTIOSSIDANTI CON TARGETS PROTEICI .....	83
CAPITOLO 6. CONCLUSIONI.....	85
CAPITOLO 7. MATERIALI E METODI .....	86
7.1. STRUMENTI BIOINFORMATICI .....	86
7.1.1 BANCHE DATI.....	86
7.1.2. WEB-SERVERS UTILIZZATI PER LA RICERCA DI TARGETS PROTEICI E PER L'ANALISI FUNZIONALE .....	87
7.1.3. AUTODOCK.....	89
7.2. METODICHE BIOINFORMATICHE .....	90
7.2.1. DOCKING INVERSO PER LE MICOTOSSINE E GLI ANTIOSSIDANTI.....	90
7.2.2. DOCKING MOLECOLARE .....	90

7.2.3 DOCKING MOLECOLARE CON LE MICOTOSSINE .....	91
7.2.4. DOCKING MOLECOLARE CON GLI ANTIOSSIDANTI.....	91
7.2.5. ANALISI FUNZIONALE MEDIANTE TOOLS BIOINFORMATICI.....	91
7.3. METODICHE SPERIMENTALI .....	92
7.3.1. REAGENTI UTILIZZATI.....	92
7.3.2. DOT BLOT .....	92
7.3.3. SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO.....	93
7.3.4. SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA .....	93
7.3.5. TERMOFORESI SU MICROSCALA.....	95
7.3.6. MISURA DI FLUORESCENZA DEI TRIPTOFANI RISOLTA NEL TEMPO E ANISOTROPIA .....	96
BIBLIOGRAFIA .....	100



**Abstract**

Lifestyle and food choices have an important role in the onset and in the prevention of some diseases. The assumption of some food-related molecules can have different effects on human health; for example, the antioxidants can lower the risk of some diseases, while the mycotoxins, contaminants of cereals and milk, could be involved in the rise of Autism Spectrum Disorders in genetically predisposed patients. The aim of this project was to identify possible protein targets for both mycotoxins and antioxidants, and to understand the mechanisms of actions underlying their effects. Protein targets were searched through a reverse docking approach using idTarget web-server. Subsequently, molecular docking using AutoDock 4.2 between the ligands (mycotoxins and antioxidants) and each of the selected protein targets was performed, in order to identify their binding sites. The interactions between mycotoxins and possible protein targets with good predicted energies were selected in order to validate them experimentally by means of techniques such as fluorescence techniques and MST. The interactions between antioxidants and possible protein targets with good predicted energies were selected to perform functional analysis via bioinformatics tools.

The fluorescence techniques confirm that some mycotoxins bind the Acetylcholinesterase and Neuroligin-4, X linked, which is involved in Autism disease. The functional analysis results about the protein targets of the antioxidants suggests that chemopreventive effects of antioxidants in human pathologies, in particular for colon cancer, may be related to the possible interference of these molecules with the activity of nucleotide metabolism and methylation enzymes, similarly to some classes of anticancer drugs.

## **Sommario**

Lo stile di vita e le scelte alimentari giocano un ruolo importante nell'insorgenza e nella prevenzione di numerose patologie. L'assunzione di alcune molecole associate agli alimenti può avere effetti diversi sulla salute dell'uomo; per esempio, gli antiossidanti possono ridurre il rischio di alcune malattie mentre le micotossine, che sono contaminanti di alcuni alimenti tra cui latte e cereali, potrebbero essere coinvolti nell'eziologia dell'autismo, in pazienti geneticamente predisposti. Lo scopo di questo progetto è stato di identificare targets proteici sia per gli antiossidanti che per le micotossine, per comprendere i meccanismi molecolari alla base dei loro effetti. I targets proteici sono stati identificati mediante un approccio di docking inverso, utilizzando idTarget. In seguito, per identificare i siti di legame occupati dai ligandi (micotossine e antiossidanti) sui targets proteici individuati è stato applicato un approccio di docking molecolare mediante l'utilizzo di AutoDock 4.2.

Le interazioni di alcune micotossine con alcuni targets proteici sono state verificate anche mediante saggi sperimentali, applicando metodiche che sfruttano le proprietà di fluorescenza dei triptofani nelle proteine. Per gli antiossidanti invece, sono state selezionate le migliori interazioni che sono diventate oggetto di un'analisi funzionale mediante l'utilizzo di tools bioinformatici.

I saggi sperimentali confermano che alcune micotossine si legano all'acetilcolinesterasi e alla neurologina 4X di cui è già noto un coinvolgimento nell'autismo.

L'analisi funzionale mostra che i targets proteici selezionati per gli antiossidanti sono coinvolti significativamente nell'adenocarcinoma al colon-retto. Essi prendono parte al metabolismo dei nucleotidi e ai processi metiltransferasici, associati allo sviluppo e alla progressione tumorale. I dati suggeriscono che gli antiossidanti potrebbero legare questi targets proteici e inibire i processi in cui sono coinvolti esercitando in questo modo il loro effetto chemiopreventivo.

## Capitolo 1. Introduzione e scopo della tesi

“Siamo ciò che mangiamo”, questo noto aforisma riassume il senso del collegamento che esiste tra sana alimentazione e concetto di benessere e salute [Quaderni del Ministero della Salute, 2015]. Una nutrizione corretta costituisce, assieme ad un'adeguata attività fisica e al controllo di altri fattori di rischio, come il fumo o l'alcol, un elemento fondamentale nella prevenzione di numerose condizioni patologiche [Corrêa-Lima and Gomes-da-Silva, 2005]. Dalla letteratura scientifica emerge che lo stile di vita e le scelte alimentari agiscono in modo incisivo nella possibilità di evitare lo sviluppo di malattie, di controllarne l'evoluzione o, al contrario, di provocarne l'insorgenza. Da questo punto di vista, dunque, l'alimentazione ha una duplice azione, perché da un lato una scorretta alimentazione può alzare il rischio di patologie, mentre dall'altro una sana alimentazione non solo lo abbassa, ma lo previene. La composizione di una dieta, i suoi rapporti con il fabbisogno energetico e con le necessità per l'accrescimento, lo sviluppo psicofisico, la risposta alle malattie, devono essere considerate le variabili più importanti nel condizionamento di un buono stato di salute [Vannozi, 2009]. Per alimentazione si intende la scelta, la preparazione e l'assunzione degli alimenti, quindi alimentarsi non significa nutrirsi. La nutrizione invece è l'insieme dei processi biologici che consentono all'uomo di assorbire ed utilizzare tutte le sostanze alimentari ingerite, necessarie alla sopravvivenza dell'organismo [Vannozi, 2009]. Nutriente è definito ogni singolo componente degli alimenti: le proteine sono per esempio il principio alimentare della carne, così come l'amido è il principio alimentare della pasta, del riso e del pane. I nutrienti sono composti da unità elementari più semplici: le proteine sono costituite da amminoacidi, i trigliceridi da glicerolo e acidi grassi, il lattosio da glucosio e galattosio [Vannozi, 2009]. L'uomo ingerisce quotidianamente con la dieta circa 500 g di composti chimici di cui la maggior parte sono componenti di piante o di vegetali in genere. Oltre le ben note proteine, grassi, carboidrati e i micronutrienti essenziali quali minerali e vitamine, il mondo vegetale fornisce fenoli, terpeni, terpenoidi, alcaloidi, purine, pirimidine, acidi nucleici, steroidi ed altre sostanze che esercitano potenti attività biologiche, quali l'attività antiossidante, la modulazione degli enzimi detossificanti, la stimolazione del sistema immunitario, la riduzione dell'aggregazione piastrinica, la modulazione del metabolismo ormonale, la riduzione della pressione sanguigna, l'attività antibatterica e antivirale [Carratù and Sanzini, 2005]. Di particolare interesse è anche l'evidenza sperimentale che estratti di alimenti particolarmente ricchi di antiossidanti possono avere effetti chemiopreventivi sul cancro al colon [Koch et al., 2014]. D'altra parte alcune molecole associate agli alimenti sono contaminanti che potrebbero avere un effetto negativo sulla salute umana. Esempi di queste molecole sono le micotossine, contaminanti presenti nei cereali (mais, frumento, riso, orzo, segale, ecc.), semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), frutta secca ed essiccata, legumi, spezie, caffè e cacao [Traar, 2013]. Gli antiossidanti e le micotossine hanno effetti opposti sulla salute umana: i primi sono riconosciuti avere effetti positivi poiché agiscono da *scavenger* direttamente sui radicali liberi oppure stimolano indirettamente l'aumento delle difese antiossidanti enzimatiche [Giovannini et al., 2006], mentre le micotossine esplicano azione nefrotossica, epatotossica, immunotossica, mutagena (aflatossine), teratogena e cancerogena [Martins, 2015]. Nonostante sia chiaro l'effetto di queste molecole sull'uomo, restano ancora in parte sconosciuti i meccanismi molecolari che ne regolano la loro attività.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato di approfondire le conoscenze sui meccanismi molecolari alla base degli effetti che antiossidanti e micotossine possono avere sulla salute umana.

Lo studio è diviso in due parti nettamente distinte. Da un lato ci si è concentrati sulla valutazione di un possibile coinvolgimento da parte delle micotossine nell'insorgenza dell'autismo, un disordine neurocomportamentale per la cui eziologia si ritiene che, in aggiunta alla componente genetica diretta, responsabile peraltro di una limitata percentuale di casi, esistano fattori epigenetici e ambientali. Questo studio si posiziona all'interno di un progetto ben più ampio a cui hanno preso parte sei unità operative e finanziato dal Ministero della Salute (Bando giovani ricercatori 2009-The relationship among food, mycotoxins, gastrointestinal disorders and autism: a multidisciplinary approach for the molecular investigation, GR-2009-1570206). Il lavoro presentato in questa tesi ha previsto l'approccio bioinformatico e successivamente anche sperimentale per identificare possibili targets proteici umani per alcune delle micotossine, contaminanti di latte e cereali, e per chiarire il ruolo che queste molecole potrebbero avere nell'insorgenza dell'autismo, come sarà discusso più avanti.

Dall'altro lato ci si è posti come scopo la ricerca di specifici targets proteici per diversi antiossidanti presenti negli alimenti, per risalire ai processi molecolari e reazioni chimiche a cui possono prendere parte all'interno della cellula.

Le conoscenze attuali sono limitate alla comprensione della funzione che queste molecole svolgono in rapporto solo a targets proteici chiave per specifiche patologie. Infatti, la ricerca è stata condotta su larga scala, individuando targets proteici tra tutti quelli espressi nei vari tessuti umani.

I due studi sono stati eseguiti in parallelo mediante l'utilizzo di strumenti bioinformatici.

Sia per le micotossine, sia per gli antiossidanti sono stati ricercati possibili targets proteici umani, mediante un approccio di docking inverso. Le interazioni proteina-ligando predette con il docking inverso sono state poi approfondite con un approccio di docking molecolare.

Successivamente, per gli antiossidanti si è proseguito con uno studio funzionale basato sui dati presenti in letteratura, che ha permesso di ricavare risultati in termini di livelli di espressione genica e di network di interazione delle proteine, inducendo ad ipotizzare i meccanismi molecolari alla base delle attività biologiche degli antiossidanti all'interno delle cellule; per le micotossine, invece, le interazioni studiate *in silico* sono state validate mediante approcci *in vitro*, che hanno previsto l'utilizzo di diverse metodiche quali: Dot-Blot, Spettroscopia di Fluorescenza, Termoforesi su Microscala, Fluorescenza risolta nel tempo e Anisotropia. L'integrazione di dati da diverse metodologie e su diversi aspetti delle funzioni molecolari e processi biologici coinvolti, orientando il lavoro verso un approccio di biologia dei sistemi, è stato indispensabile per ottenere dati significativi per la comprensione dei meccanismi molecolari mediante cui alcune molecole associate agli alimenti interferiscono con la salute umana.

I dati ottenuti suggeriscono che l'azione chemio-preventiva degli antiossidanti nel cancro al colon potrebbe essere dovuta all'interazione di queste molecole con le proteine coinvolte nel metabolismo dei nucleotidi e nei processi metiltransferasici. Per le micotossine invece i risultati mostrano che alcune di esse interagiscono con alcuni dei bersagli proteici selezionati; si può quindi ipotizzare che tali interazioni possano compromettere il funzionamento di queste proteine, che sono tutte espresse nel

cervello, e possano alterare i pathways in cui essi sono coinvolti, determinanti nello sviluppo neurocomportamentale.

## Capitolo 2. Nutrizione e Disordini dello Spettro Autistico

### 2.1. Comunicazione tra cervello e intestino

La considerazione che la dieta può incidere sulla salute e il benessere mentale, in particolare nei casi di sintomatologia psichiatrica e comportamentale, apre diverse strade per migliorare potenzialmente la qualità della vita [Whiteley, 2013].

Esistono patologie umane che sono associate a rari disordini metabolici che causano malattie nel tratto gastrointestinale e a livello neurologico, tanto da svilupparsi negli ultimi anni il concetto di “asse intestino-cervello” [Jones et al., 2006].

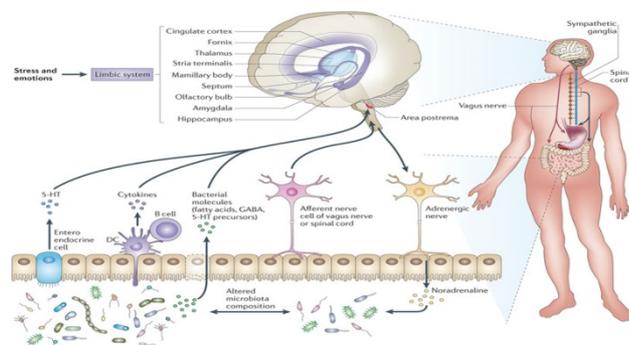
L'intestino e il cervello sono altamente integrati e comunicano in maniera bidirezionale, in gran parte attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e il sistema nervoso autonomo (SNA). La comunicazione tra il sistema nervoso centrale (SNC) e il sistema nervoso enterico (SNE) coinvolge pathways neurali così come meccanismi immunitari ed endocrini e include il sistema simpatico e parasimpatico [Jones et al., 2005]. Il ruolo del sistema nervoso simpatico nell'asse cervello-intestino è quello di regolare la mobilità, il flusso sanguigno, la barriera funzionale, e l'attivazione del sistema immunitario [Zhou and Foster, 2015].

Il sistema combinato dell'attività gastrointestinale e del SNC utilizza quattro principali carriers di informazione:

- messaggeri neurali che sono trasportati dai neuroni afferenti vagali e spinali;
- messaggeri immunitari trasportati da citochine;
- messaggeri endocrini trasportati da ormoni intestinali;
- fattori microbici che possono raggiungere direttamente il cervello attraverso il flusso sanguigno o interagire con altre vie di trasmissione [Holzer and Farzi, 2014].

Questi sistemi di comunicazione tra intestino e cervello non sono isolati l'uno dall'altro ma agiscono in maniera strettamente collegata tra loro (Fig. 1); inoltre, essi sono rilevanti per un certo numero di funzioni vitali:

- il cervello deve interagire con l'intestino per assimilare il cibo in modo da garantire i processi metabolici;
- l'intestino deve poter distinguere se i componenti degli alimenti sono utili o inutili e se sono pericolosi (patogeni o tossici) per poterli indirizzare ai vari distretti;
- l'intestino deve mantenere l'omeostasi con il microbioma che è importante per equilibrare il sistema e comunicare con gli altri organi compreso il cervello [Holzer and Farzi, 2014].



**Fig. 1:** Pathways neurali, immunologici, endocrini e metabolici mediante i quali l'intestino e il cervello comunicano [Collins et al., 2012].

## 2.2. Caratteristiche dei Disturbi dello Spettro Autistico

I disturbi dello spettro autistico (ASD) comprendono disordini neurologici che sono definiti da alterazioni comportamentali quali: disfunzioni nell'interazione sociale e nelle abilità comunicative, comportamenti stereotipati e ripetitivi, attività e interessi limitati, che sono generalmente evidenti intorno al terzo anno di età [Mezzelani et al., 2015]. In concomitanza con questi comportamenti isolativi, i bambini autistici manifestano aggressività e tendenze ad autolesionismo, irritabilità, iperattività e comportamenti eccentrici [Shaffer et al., 1994].

Le cause di questo disordine neurocomportamentale restano sconosciute, ma sia fattori genetici che ambientali sembrano giocare un ruolo nella sua insorgenza. Studi in America e Regno Unito hanno dimostrato che l'autismo è significativamente in crescita [Fombonne, 2009] e che questo disordine sta diventando un serio problema della salute pubblica. Alcuni autori attribuiscono questa crescita al cambiamento ambientale. Fattori ambientali che potrebbero contribuire all'eziologia dell'ASD includono: esposizione pre- e post-natale ad agenti chimici o farmaci, stress, infezioni materne e fattori dietetici [Louis, 2012]. Infatti, la salute dei bambini nei primi tre anni di vita è particolarmente vulnerabile in quanto a circa un anno si abbassa la protezione immunitaria materna mentre il sistema immunitario dei bambini non è ancora completamente competente [Mezzalani et al., 2015].

Si deve considerare che l'ASD coinvolge un gruppo di disordini con una grande eterogeneità tra i soggetti e potrebbe essere necessario investigare specifici sottogruppi per identificare i processi biologici sottostanti questa patologia.

## 2.3. La dieta nell'autismo

Nelle persone affette da ASD sono riportati comunemente disturbi gastrointestinali, che includono costipazione, perdita cronica di feci, dolori addominali e gonfiore. Alcuni autori riportano che i sintomi gastrointestinali sono fortemente correlati con la severità dell'autismo [Valicenti-McDermott et al., 2006]. Altri ricercatori hanno suggerito un'associazione tra l'autismo e l'infiammazione cronica dell'intestino, il reflusso esofageo, gastrite e malassorbimento dei disaccaridi e con la crescita eccessiva dei microbioti [Ibrahim et al., 2009].

Queste osservazioni hanno portato a ipotizzare che la disfunzione del tratto gastrointestinale (GI) derivante da un'enterocolite autismo-specifica sia alla base dei disordini neurocomportamentali osservati nei bambini autistici, poichè genera un'aumentata permeabilità intestinale che induce a processi autoimmuni o encefalopatici mediati dall'intestino [Ibrahim et al., 2009]. La presenza di un processo di infiammazione cronica e un'aumentata permeabilità intestinale è stata dimostrata mediante esami endoscopici e istologici del tratto gastrointestinale di alcuni pazienti autistici [Ibrahim et al., 2009]. In questo scenario, le biopsie intestinali di bambini autistici rivelano un significativo aumento di CD3+ e CD3+/CD8+ nell'epitelio, così come di CD3+ nella lamina propria rispetto a gruppi controllo [Ashwood et al., 2004]. Inoltre sono stati riportati in letteratura casi in cui si osserva una sovraespressione di citochine pro-infiammatorie nel plasma di bambini autistici con sintomi GI [Goines, 2013]. In aggiunta, livelli più alti di citochine sono associati con molti deficit comunicativi e comportamenti aberranti [Ashwood et al., 2004].

Molte testimonianze di genitori riportano un'incidenza significativa di allergie alimentari nei pazienti autistici. Lucarelli e collaboratori nel 1995 trovarono che l'assunzione orale di proteine contenute nel latte vaccino (lactoglobulina,  $\beta$ -lactoglobulina e caseina) portava ad un peggioramento di alcuni sintomi comportamentali nei bambini autistici, i quali esprimono livelli significativamente alti nel siero di IgA, IgG e IgM per la caseina e IgA per la lattoglobulina e  $\beta$ -lattoglobulina rispetto ai soggetti sani [Lucarelli et al., 1995]. L'ipotesi è che l'allergia alimentare sia un fattore centrale che provoca lesioni nell'ileo; tali lesioni consentirebbero l'entrata di antigeni alimentari attraverso l'infiammazione della mucosa del tenue e susciterebbero una risposta infiammatoria nel tratto GI [van De Sande et al. 2014].

Molte famiglie stanno cercando terapie alternative in grado di aiutare il loro bambini autistici e in molti casi stanno applicando diete restrittive associate ad altre terapie nutrizionali come la dieta "glutein-free/casein-free" (GFCF), secretina endovenosa, supplementi di minerali, vitamine e acidi grassi omega 3 [Ibrahim et al., 2009]. Molti genitori applicano questa dieta perché molti comportamenti autistici sono stati riconosciuti prematuramente durante il periodo dello svezzamento con latte vaccino e con cibi contenenti glutine [Ibrahim et al., 2008].

### **2.3.1. La dieta Glutein-Free/Casein-Free**

In letteratura si discute molto sui vantaggi che potrebbe portare una dieta priva di glutine e di caseina. Il glutine è una frazione proteica che si trova nei cereali, segale e orzo e la caseina è una famiglia di fosfoproteine trovata nel latte, particolarmente abbondante nel latte vaccino. I sostenitori dell'idea che il glutine e la caseina siano la causa delle disfunzioni dello sviluppo neuronale hanno avanzato varie teorie per proporre i meccanismi pato-fisiologici attraverso cui molecole xenobiotiche possono provocare malattie al SNC.

Una di queste teorie sostiene che, se il glutine e la caseina non sono digeriti adeguatamente, si formano molecole simili agli oppioidi. Gli oppioidi endogeni e i loro recettori sono importanti modulatori dello sviluppo neurale e influenzano la migrazione, la proliferazione e la differenziazione del SNC [Zagon, 1987]. È stato ipotizzato che un eccesso di oppioidi abbia un effetto dannoso sullo sviluppo cerebrale e alteri il comportamento sociale, e che l'autismo potrebbe essere dovuto a livelli o attività anormali degli oppioidi [Ashwood and van de Water, 2004]. Le

molecole simili agli oppioidi endogeni derivanti dal glutine, presente nel frumento e in altri cereali, e dalla caseina, presente nel latte vaccino e in altri prodotti caseari, includono l' $\alpha$ -gliadina, dermorfina, nuovi peptidi dell'autismo I e III, la beta-casomorfina [van De Sande et al., 2014]. I peptidi con attività oppioide derivanti dalla dieta, in particolare da alimenti che contengono glutine e caseina, passano attraverso la membrana intestinale che nei pazienti autistici presenta un'alterata permeabilità ed entrano nel SNC esercitando il loro effetto [Shattock and Whiteley, 2002].

Un secondo meccanismo proposto suggerisce che il glutine e la caseina causino infiammazione nell'intestino portando ad una malattia autoimmune o una reazione crociata con altri antigeni nel SNC [Genuis et al., 2014]. Infatti, alcuni studi hanno trovato che una percentuale significativa di pazienti autistici mostra un elevato numero di anticorpi anti-gliadina (componente del glutine) e anticorpi contro le proteine del latte come la caseina, che cross-reagiscono con i peptidi cerebrali [Vojdani, 2004].

Da queste osservazioni, è possibile ipotizzare che cereali e latte potrebbero essere in grado di indurre una risposta immunitaria, attraverso mediatori dell'infiammazione, nel corpo di pazienti geneticamente predisposti. Questi anticorpi possono attraversare la barriera ematoencefalica e combinarsi con antigeni di tessuti cerebrali, strutturalmente simili a quelli che hanno indotto la produzione di anticorpi, danneggiando il tessuto neuronale e causando l'insorgenza di ASD.

Alcuni soggetti autistici sottoposti a questo tipo di dieta mostrano un miglioramento significativo in molte aree specifiche dello spettro del disordine autistico quali: psicologiche e comportamentali, nella comunicazione verbale e non verbale, nell'attenzione e nella concentrazione, negli episodi di aggressività, nel movimento motorio, nel sonno, nell'ansia, nell'empatia e nella risposta all'apprendimento [van De Sande et al., 2014].

Tuttavia, in alcune persone, una reazione immunitaria potrebbe essere causata non dal glutine o caseina in sé, ma da molecole xenobiotiche come le micotossine che sono legate a diverse frazioni proteiche nel latte o di peptidi del glutine. Le micotossine possono incrementare la permeabilità intestinale: per esempio l'ocratossina A e la patulina alterano le funzioni e la barriera intestinali e il trasporto. L'alterata permeabilità intestinale causa una riduzione dei nutrienti: infatti, nei soggetti autistici che presentano disturbi GI si riscontra una carenza di rame, zinco e vitamina B6 [Mezzelani et al., 2015].

### 2.4. Le micotossine

Le micotossine rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche, tossiche per l'uomo e per gli animali, a basso peso molecolare, prodotte dal metabolismo secondario di funghi e muffe [Martins, 2015]. Nonostante le micotossine siano oggetto di numerosi studi, non è stato ancora del tutto chiarito il loro ruolo nel ciclo vitale fungino. Si ipotizza che siano coinvolte in meccanismi di competizione microbica, esercitando la loro azione antibiotica verso i microrganismi competitori, oppure rivolgano la loro azione attaccando direttamente i tessuti vegetali dell'ospite [Manners, 1993; Matta et al., 1996, Castoria et al., 2008].

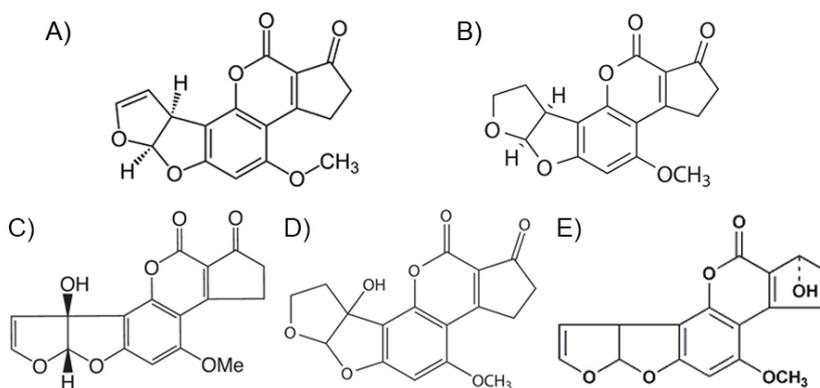
Le muffe del tipo *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sono le principali produttrici di micotossine. Queste molecole sono molto resistenti al calore e non vengono completamente distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti a cui vengono normalmente sottoposte le derrate durante i processi di preparazione

degli alimenti. La contaminazione degli alimenti da parte di queste sostanze dipende dalle condizioni climatiche e geografiche, dalle pratiche di coltivazione e di conservazione, e dal tipo di substrato interessato, dato che alcuni prodotti sono più suscettibili rispetto ad altri alla crescita fungina [Zain, 2011]. Le micotossine si sviluppano sia sulle piante prima del raccolto (contaminazione da campo) che nelle derrate vegetali dopo il raccolto stesso, durante i processi di conservazione (in magazzini, silos, ecc.), trasformazione e trasporto [Fung, 2004]. Gli alimenti più esposti alla contaminazione diretta sono soprattutto cereali (mais, frumento, riso, orzo, segale, ecc.), semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), frutta secca ed essiccata, legumi, spezie, caffè e cacao. Inoltre, le micotossine possono essere ritrovate come residui o metaboliti tossici nei prodotti alimentari che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati [Greco et al., 2014]. L'impatto delle micotossine sulla salute dipende dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla presenza di altre micotossine e da fattori dietetici.

I dati ottenuti da studi condotti su animali indicano che il consumo di alimenti contaminati da micotossine può produrre nell'uomo un'ampia varietà di quadri patologici sia acuti che cronici, di difficile diagnosi, che possono avere origine sin dai primi mesi di vita dei soggetti coinvolti [Zain, 2011].

Queste molecole rappresentano quindi un pericolo per la salute del consumatore a causa della loro azione lesiva sulle funzioni cellulari; infatti, possono avere, come già detto precedentemente, attività nefrotossica (ocratossine), epatotossica (aflatossine), immunotossica (aflatossine, ocratossine), mutagena (aflatossine), teratogena (ocratossine) e cancerogena (aflatossine, ocratossine, fumonisine) [Fung, 2003].

Le **aflatossine** sono prodotte esclusivamente da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e da quasi tutti i ceppi di *Aspergillus parasiticus* [Peraica et al., 1999]. Chimicamente sono dei derivati della cumarina e sono denominate con le sigle B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> (rispettivamente metossi-difuro-cumarone e metossi-difuro-cumaro-lattone), G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (loro diidroderivati), M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> (metaboliti idrossilati rispettivamente di B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> che si riscontrano nel latte di lattifere alimentate con mangimi contaminati da aflatossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) (Fig. 2). L'aflatossicolo è un metabolita dell'aflatossina B<sub>1</sub> [Peraica et al., 1999].



**Fig. 2:** Formule di struttura di alcune aflatossine: A) aflatossina B<sub>1</sub>; B) aflatossina B<sub>2</sub>; C) aflatossina M<sub>1</sub>; D) aflatossina M<sub>2</sub>, E) aflatossicolo.

Le lettere B e G (Blue o Green) corrispondono al tipo di fluorescenza che queste micotossine emettono a 425 nm e 450 nm rispettivamente, se eccitate con luce ultravioletta a lunghezza d'onda di 360 nm, mentre la lettera M è l'iniziale del prodotto idrossilato che viene ritrovato nel latte (dall'inglese Milk).

Sono molecole tossiche, immunosoppressive, mutagene, teratogene e cancerogene. Il principale organo bersaglio è il fegato [Peraica et al., 1999]. Tra di esse la più tossica è la B<sub>1</sub>. Le aflatoxine sono assorbite nel tratto gastrointestinale dove vengono o attivate metabolicamente o detossificate nella mucosa intestinale e nel fegato.

Gli **zearalenoni** sono prodotti da diverse specie di *Fusarium* e in particolare da *F. graminearum*, *F. gulmorum* e *F. equiseti* [Peraica et al., 1999]. Dei diversi metaboliti prodotti in coltura, solo lo zearalenone e gli zearalenoli, nello specifico gli isomeri alfa e beta, sono stati ritrovati negli alimenti di origine vegetale, come contaminanti naturali (Fig. 3). Lo zearalenone è un lattone dell'acido resorcilico non dotato di tossicità acuta, che a basse concentrazioni manifesta attività anabolica e uterotrofica, mentre a concentrazioni più alte determina attività di tipo estrogenico. A tal proposito, infatti, riesce a passare attraverso la membrana cellulare legato ad un recettore estrogenico ed attiva geni specifici coinvolti nella trascrizione delle proteine normalmente espresse nella risposta estrogenica, alterandone gli equilibri [De Santis, 2009].

Alcuni studi indicano un'attività cancerogena dello zearalenone, nonché un suo passaggio nel latte [Prelusky et al., 1989].

Inoltre lo zearalenone è capace di indurre stress ossidativo compromettendo l'attività fagocitica delle cellule del sangue.

I prodotti più soggetti alla colonizzazione di specie tossigene di *Fusarium* e all'accumulo di zearalenone sono essenzialmente i cereali e, in particolare, il mais, il frumento, l'orzo e l'avena.

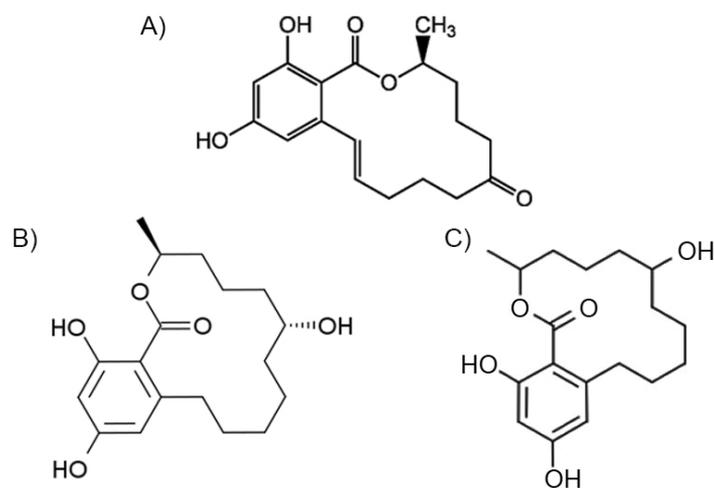


Fig. 3: Strutture chimiche di: A) α-zearalanolo; B) β-zearalanolo; C) zearalenone.

Le **ocratossine** sono un gruppo di metaboliti prodotti da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, in particolare da *A. ochraceus* e da *P. viridicatum*. Quelle attualmente conosciute sono l'ocratossina A e la B e delle due quella più tossica è la A [Lawely, 2013].

Dal punto di vista chimico l'ocratossina A è costituita da un derivato cumarinico legato alla fenilalanina (Fig. 4), mentre l'ocratossina B consiste nell'analogo senza un atomo di cloro.

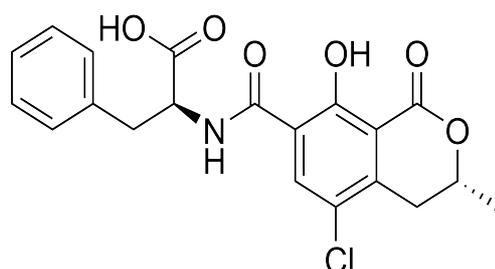


Fig. 4: Struttura chimica dell'ocratossina A.

Come le aflatossine, anche questa molecola è fluorescente; presenta un picco di assorbimento massimo a 350 nm ed emette a 465 nm [Schumidt-Heydt et al., 2012].

La biotrasformazione dell'ocratossina A è dipendente dal citocromo P450 sia nell'uomo sia negli animali e porta alla formazione di intermedi metabolicamente attivi, probabilmente responsabili dell'azione cancerogena e di altri effetti tossici. Il suo assorbimento avviene nel tratto gastrointestinale e, attraverso la circolazione entero-epatica, essa può essere escreta e riassorbita [Zepnik et al., 2000].

Nel sangue l'ocratossina A è legata alla frazione albuminica delle proteine e questa sembra essere la motivazione per cui questa micotossina permane per tempi lunghi nell'organismo animale [Il'ichev et al., 2002]. A livello cellulare inibisce il trasporto intramitocondriale del fosfato e la sintesi proteica mediante il blocco della fenilalanina RNA sintetasi.

Il principale organo bersaglio dell'ocratossina A è il rene, ma per dosi sufficientemente elevate si ha tossicità anche a livello epatico con infiltrazione grassa e accumulo di glicogeno negli epatociti (per blocco del sistema enzimatico delle fosforilasi).

Oltre all'azione nefrotossica, è riportata per questa tossina un'azione teratogena e immunosoppressiva [Reddy et al., 2010]. Tra i prodotti che con più frequenza vengono trovati contaminati vi sono l'orzo, il sorgo, il mais, diversi legumi, il caffè crudo in grani (la tostatura denatura le ocratossine) e vari prodotti da forno; ma più preoccupante è la presenza di ocratossina A nei mangimi [Astoreca et al., 2010].

L'EFSA (European Food Security Authority) ha stabilito nel 2006 una dose settimanale tollerabile pari a 120 ng/kg di peso corporeo [Ferrieri et al., 2011].

La **gliotossina** è un epipolittiodioxopiperazina, una classe di dipeptidi ciclici caratterizzati dalla presenza di un ponte disolfuro all'interno della struttura chimica, prodotta da diversi funghi tra cui *Aspergillus* (Fig. 5) [Gardiner and Howlett, 2005]. Questo composto presenta proprietà citotossiche, genotossiche e apoptotiche. Numerosi studi hanno evidenziato che l'esposizione a questa molecola genera effetti immunosoppressivi su differenti tipi di cellule; per esempio induce morte per apoptosi

nei neutrofili, macrofagi ed epatociti umani [Bok et al., 2006]. Presenta una tossicità selettiva per le cellule ematopoietiche, in particolare mostra un'attività antiproliferativa nei confronti delle cellule T e B e inibisce l'attività fagocitaria con notevole selettività verso le cellule del sistema immunitario [Bok et al., 2006]. Generalmente la tossicità della gliotossina può essere attribuita a due meccanismi:

- la produzione di specie reattive dell'ossigeno e formazione di disolfuro misto con gruppi tiolici liberi nella cellula;
- l'autossidazione a disolfuro che si verifica con la produzione di ioni superossido e perossido di ossigeno.

La tossicità della gliotossina sembra essere direttamente correlata alla presenza nella sua struttura di un anello disolfuro intatto o di un ditiolo ridotto [Gardiner and Howlett, 2005].

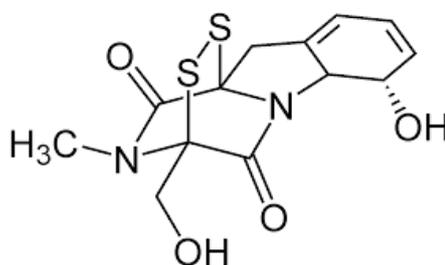


Fig. 5: Struttura chimica della gliotossina.

Il **deossinivalenolo**, anche detto vomitossina, appartiene alla famiglia dei tricoteceni che sono ampiamente diffusi nel frumento. I tricoteceni rappresentano una classe di micotossine prodotte da diversi generi di funghi non correlati dal punto di vista tassonomico come *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotryis* [Aureli et al., 2010]. Tali composti sono molecole con struttura sequiterpenoide la cui tossicità è dovuta alla presenza di un gruppo epossidico in C-12 e C-13 (Fig. 6) [Maresca, 2013]. Sono composti non volatili con basso peso molecolare che svolgono la loro azione tossica a livello delle cellule eucariotiche. Il deossinivalenolo è la micotossina più importante di questa classe sia in termini quantitativi che di diffusione.

I tricoteceni a bassi livelli di esposizione provocano una serie di effetti immunologici negli animali da laboratorio, causando una maggiore suscettibilità verso malattie di natura batterica, virale e fungina. Anche nelle piante questi metaboliti fungini esercitano un effetto dannoso alterando le membrane fino a danneggiarle e a provocarne lisi cellulare [Gunnaiyah and Kushalappa, 2014]. Analoga alterazione avviene nei globuli rossi degli animali in presenza di un livello di tossina circolante variabile a seconda della specie interessata. Alcuni fra i più evidenti effetti patologici del deossinivalenolo negli animali e nelle piante riguardano l'inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici, l'alterazione della struttura di membrana e della funzionalità dei mitocondri, l'apoptosi e l'attivazione delle citochine [Pestka, 2008]. Per il deossinivalenolo è stato stabilito il limite massimo di assunzione giornaliera pari a 1 µg/kg [Aureli et al., 2010].

Nel 1993, l'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato il deossinivalenolo nel Gruppo 3, cioè come "non classificabile come possibile agente cancerogeno per l'uomo".

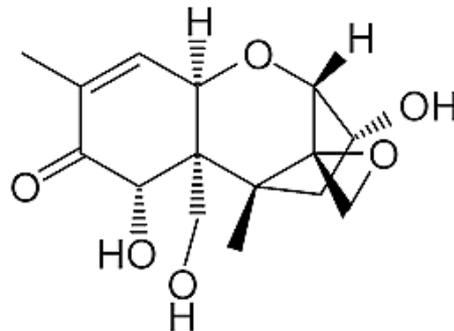


Fig. 6: Struttura chimica del deossinivalenolo.

La **patulina** è un lattone insaturo (tetrachetide, risultato dalla condensazione di due anelli eterociclici) (Fig. 7). La patulina è prodotta da diverse specie di funghi appartenenti principalmente ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys* ed è essenzialmente presente nella frutta e negli ortaggi.

La sua tossicità si manifesta in diversi sistemi biologici tra i quali microrganismi, animali e piante, e di conseguenza può interessare anche l'uomo. I fattori decisivi per la produzione della patulina sono la temperatura e l'attività dell'acqua (intesa come rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua nel cibo e la pressione di vapore dell'acqua pura). L'intossicazione acuta da patulina provoca, in animali da laboratorio, agitazione, convulsioni, dispnea, congestioni polmonari, edema, ulcerazioni, iperemia, emorragie intestinali, degenerazione delle cellule epiteliali, infiammazioni intestinali, vomito, danni al tratto gastrointestinale e ai reni [McKinley and Carlton, 1991]. L'intossicazione cronica determina effetti neurotossici, immunotossici e immunosoppressivi, genotossici, embriotossici e teratogeni [Ciegler et al., 1976].

Sull'uomo i sintomi derivati dall'intossicazione acuta sono vomito, nausea e disturbi gastrointestinali [Betina, 1984; McKinley and Carlton, 1991], mentre esposizioni prolungate portano a mal di testa, stanchezza e perdita dei sensi. Si possono anche verificare edemi cutanei ed eritema. Una considerazione particolare riguarda la presenza di patulina nei prodotti (in particolare, in succhi a base di mela) destinati soprattutto all'alimentazione dei bambini. L'esposizione della micotossina può essere più sfavorevole se assunta nella stessa quantità rispetto a un adulto.

A livello cellulare la patulina determina l'inibizione della sintesi proteica e della sintesi del DNA [Moake et al., 2005]; provoca l'inibizione di molti enzimi, tra cui l'ATPasi, la RNA polimerasi e l'aminoacil-tRNA sintetasi grazie alla sua alta affinità con gruppi sulfidrici [Moake et al., 2005; Puel et al., 2010]. Inoltre, altera la struttura e la funzione della membrana cellulare [Horvath et al., 2010]. Secondo la IARC non è da considerarsi una molecola cancerogena per l'uomo [Castoria, 2008].

Il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ha stabilito un livello massimo tollerabile provvisorio di assunzione giornaliero pari a 0.4 µg/kg per peso corporeo.

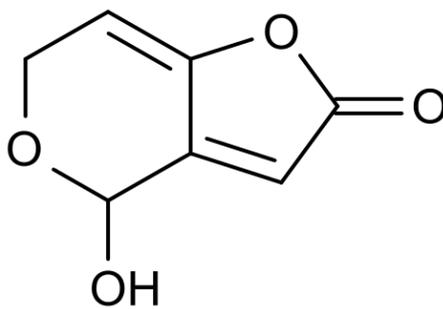


Fig. 7: Struttura chimica della patulina.

### Capitolo 3. Ruolo degli antiossidanti nella salute dell'uomo

I modelli alimentari e lo stile di vita nei paesi sviluppati sono la prova che esiste una correlazione tra la dieta e il rischio di alcune malattie, tra cui il cancro [Uauy and Solomons, 2005]. Nelle società occidentali, una rilevante parte della giornata è spesa nello stato post-prandiale che è caratterizzato da un incremento della biodisponibilità di substrati, come il glucosio, che inducono ad un incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) e di conseguenza inducono allo stress ossidativo.

L'associazione dei ROS con varie malattie come l'aterosclerosi, il diabete di tipo II o il cancro è nota da decenni e questo ha portato a credere che un'integrazione della dieta con molecole antiossidanti potrebbe avere benefici effetti [Görlac et al., 2015].

La prima definizione di antiossidante è stata proposta da Halliwell nel 1989 come "qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a substrati ossidabili (carboidrati, proteine e acidi nucleici), ritarda significativamente o inibisce l'ossidazione dei substrati riferiti". Altre definizioni di antiossidanti sono state proposte, come: "ogni sostanza che previene, ritarda o elimina il danno ossidativo di molecole targets", o: "qualsiasi sostanza che può eliminare le specie reattive dell'ossigeno direttamente o indirettamente, agendo come regolatore della difesa antiossidante o inibendo la produzione di quelle specie" [Mut-Salud et al., 2015]. Gli antiossidanti potrebbero essere interpretati come prodotti naturali con azioni farmacologiche nel corpo [Fraunberger et al., 2016].

Il bilancio tra antiossidanti e ossidanti è essenziale per il mantenimento della stabilità del microambiente cellulare. Lo sviluppo dello stress ossidativo è causato da un'alterazione nel bilancio tra la produzione di ROS e l'efficienza delle difese del sistema antiossidante cellulare [Fraunberger et al., 2016].

I ROS sono un gruppo di molecole prodotte da alcuni processi metabolici mediante l'azione di ossidasi nei mitocondri o in altri organelli cellulari. Queste molecole hanno un'alta reattività perché possiedono un elettrone spaiato; tale caratteristica chimica permette loro di interagire con DNA, lipidi e proteine causando danni e inducendo un'alterazione nelle funzioni cellulari [Mut-Salud et al., 2015].

Tuttavia i ROS possono giocare un duplice ruolo, agendo come fattori benefici o dannosi. Da un lato, come già detto, un loro incremento può indurre allo stress ossidativo che altera le strutture cellulari e influenza le espressioni dei geni relativi all'invecchiamento cellulare; dall'altro lato, a basse o medie concentrazioni, i ROS partecipano alle funzioni fisiologiche, come nella difesa contro le infezioni e nel mantenimento del bilancio redox [Mut-Salud et al., 2015]. Per esempio l' $H_2O_2$  è considerato un componente chiave nel mantenimento del ciclo cellulare e nel processo di invecchiamento.

Le cellule hanno diversi meccanismi per trasformare o eliminare i ROS ed evitare i loro effetti dannosi. Come implica il nome, gli antiossidanti sono composti che neutralizzano le specie reattive dell'ossigeno attraverso la riduzione della loro attività nel corpo [Fraunberger et al., 2016].

La naturale difesa antiossidante è composta da antiossidanti endogeni, che comprendono enzimi, vitamine e minerali, e da antiossidanti esogeni, che possono essere assunti con la dieta o tramite supplementi nutrizionali. Gli antiossidanti possono essere classificati in tre linee di difesa in accordo con il loro meccanismo d'azione.

La prima linea include antiossidanti che prevengono la formazione di nuovi radicali liberi. È un gruppo molto eterogeneo che include enzimi come superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi, proteine che legano metalli come la ferritina e la ceruloplasmina, e minerali come Selenio, Rame e Zinco. Il secondo gruppo di antiossidanti è responsabile di catturare radicali liberi, prevenendo la reazione della catena ossidativa. Questo gruppo è formato da glutatione, albumina, vitamine C ed E, carotenoidi e flavonoidi. La terza linea di difesa include enzimi antiossidanti, che riparano i danni causati da radicali liberi alle biomolecole come lipasi, proteasi, enzimi che riparano il DNA, transferasi, metionina-sulfossido reduttasi [Mut-Salud et al., 2015].

Gli antiossidanti esogeni agiscono sui radicali liberi mediante tre meccanismi di azione principali noti: trasferimento di un atomo di idrogeno (H), donazione di elettroni, e scavenging diretto di radicali liberi.

Nel trasferimento dell'atomo di H, un gruppo reattivo contenente un idrogeno subisce una fissione omolitica sul composto antiossidante generando un idrogeno radicale e un antiossidante radicale. In questo modo l'idrogeno radicale interagisce con un radicale libero originando una specie meno reattiva, mentre l'antiossidante radicale può legare un altro antiossidante radicale e formare un dimero non reattivo.

Nella donazione di elettroni gli antiossidanti contengono un sistema coniugato e donano un elettrone alla specie reattiva, formando un anione.

Nello scavenging diretto dei radicali liberi, l'antiossidante assorbe un radicale nella sua struttura generando una molecola meno reattiva che possiede una citossicità più riduttiva [Leopoldini et al., 2004].

### 3.1. Antiossidanti esogeni

Gli antiossidanti esogeni costituiscono un gruppo ampio ed eterogeneo di molecole sia in termini di strutture che di proprietà biologiche. Per semplicità gli antiossidanti esogeni possono essere suddivisi in: polifenoli, vitamine e derivati, e antiossidanti minerali.

Gli antiossidanti più abbondanti in natura sono i polifenoli, che si dividono a loro volta in due gruppi principali: flavonoidi e acidi fenolici. Al gruppo dei flavonoidi appartengono flavanoli, flavoni, flavanoni, catechine, antocianine e isoflavonoli [Mut-Salud et al., 2015].

I polifenoli sono metaboliti secondari coinvolti nelle difese contro le radiazioni UV e i patogeni [Quideau et al., 2011]; si trovano abbondantemente nei prodotti di piante come verdura, frutta, tè, vino e succhi di frutta contribuendo al loro colore, sapore, odore e stabilità ossidativa [Graf et al., 2005]. Gli effetti antitumorali di alcuni polifenoli come resveratrolo, quercetina e curcumina potrebbero essere dovuti alla capacità di ridurre la crescita tumorale attraverso vari meccanismi d'azione in diversi distretti come bocca, fegato, polmoni, duodeno, colon, ghiandole mammarie e pelle.

Nella famiglia delle vitamine abbiamo: vitamina C, E e K e carotenoidi.

I carotenoidi sono un gruppo di pigmenti presenti in molti frutti e vegetali. Ne esistono più di 600 tipi, ma solo pochi di essi hanno proprietà biologiche, tra questi c'è il  $\beta$ -carotene che è il più studiato come possibile molecola capace di esercitare il suo effetto nella prevenzione di patologie [Mut-Salud et al., 2015]. La vitamina A è un prodotto del catabolismo epatico del  $\beta$ -carotene ed ha effetti benefici sulla pelle,

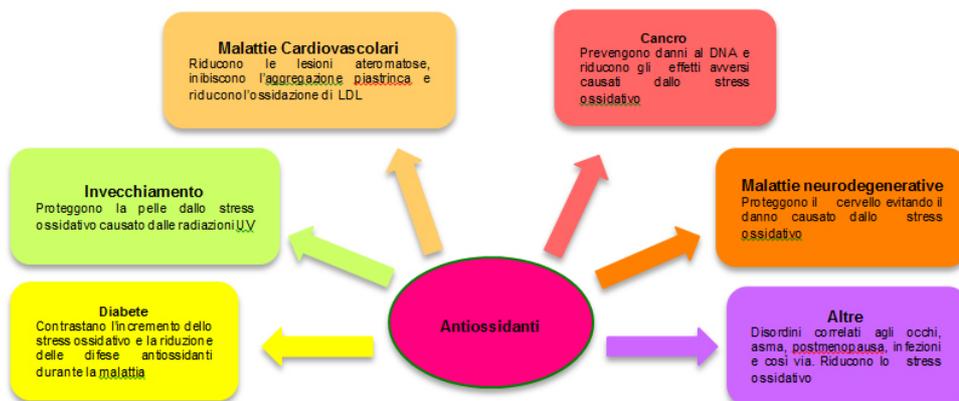
occhi e organi interni. Questa molecola ha la capacità di neutralizzare radicali perossidici prima che essi causino la perossidazione lipidica [Mut-Salud et al., 2015]. La famiglia della Vitamina E include tocotrienoli e tocoferoli. Sono molecole altamente lipofile ed esercitano la loro azione antiossidante grazie alla loro capacità di aderire alle membrane biologiche, stabilizzandole e proteggendole dalla perossidazione lipidica [Bennett et al., 2012].

Anche la vitamina K è lipofila ed è coinvolta nel processo di coagulazione del sangue; agisce inoltre rallentando la perossidazione del glutathione causata dallo stress ossidativo [Giammanco et al., 2012].

Le vitamine E e C e il  $\beta$ -carotene sono stati suggeriti per limitare i danni ossidativi nell'uomo; studi epidemiologici e studi clinici hanno esaminato la loro efficacia, sia singolarmente che in combinazione, e come questi influenzano l'esito delle malattie senza però conoscere i meccanismi di base [Fraunberger et al., 2016].

In letteratura esistono molteplici ricerche sugli effetti degli antiossidanti presenti negli alimenti, in particolare quelli di origine vegetale cercando di evidenziare il loro ruolo positivo.

Molti studi riportano effetti benefici di alimenti ricchi di antiossidanti [Görlac et al., 2015] (Fig. 8).



**Fig. 8:** Influenza degli antiossidanti sulla salute umana. Gli antiossidanti possono influenzare il diabete, l'invecchiamento, le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, il cancro e altre patologie, inducendo effetti benefici [Immagine adattata dall'originale pubblicato in Mut-Salud et al., 2015].

I meccanismi attraverso i quali gli antiossidanti esogeni esprimono queste proprietà benefiche sembrano coinvolgere la loro interazione con le vie di segnalazione cellulare che mediano la funzione delle cellule sia in condizioni normali che patologiche. Diversi studi dimostrano un coinvolgimento dei polifenoli nel pathway delle MAP chinasi (ERK, JNK, p38) e nel signaling di PI3 chinasi/Akt, influenzando i processi cellulari coinvolti nell'inizio e progressione del cancro e nella neurodegenerazione [Vauzour et al., 2010]. Purtroppo, ci sono pochi studi sulla comprensione del meccanismo che determina la reazione di un antiossidante specifico con una proteina bersaglio, che è essenziale per prevenire e trattare malattie associate al danno ossidativo. Gli studi che sono stati riportati in letteratura sono limitati alla comprensione del legame tra le molecole antiossidanti e bersagli proteici di una specifica malattia, ma non ci sono studi su larga scala.

Lo studio sui meccanismi molecolari in cui sono coinvolti gli antiossidanti si inserisce all'interno di un progetto il cui obiettivo è stato quello di identificare gli antiossidanti presenti all'interno della mela "Annurca". La mela è un frutto ampiamente consumato e rappresenta una delle principali fonti di polifenoli nella dieta occidentale [Boyer and Liu, 2004]. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* supportano l'ipotesi che gli estratti polifenolici delle mele posseggono un'attività antiproliferativa contro le cellule cancerose [Mari et al., 2010]. La mela "Annurca" è una varietà di mela tipica del sud Italia; è riportato che l'attività antiossidante della mela annurca è più forte rispetto alle altre varietà di mele [Napolitano et al., 2004]. In questo tipo di mela sono stati caratterizzati ventiquattro composti polifenolici che appartengono a sei gruppi principali: acido idrossicinammico (**acido clorogenico**); flavanoli (**(+)-catechine**, **(-)-epicatechine**); procianidine (catechine, epicatechine, procianidine B1, B2, trimeri, tetrameri e pentameri); flavonoli (**quercetina**, **quercetina-3-O-rutinoside**, **-3-O-galactoside**, **-3-O-glucoside**, **-3-O-xyloside**, **-3-O-arabinofuranoside**, **-3-O-arabinopiranoside**, **-3-O-ramnoside** e **-O-pentoside**); antocianine (**cianidin-3-O-galattoside**); diidrocalconi (floretilina, floretilina-3-O-xyloglucoside e **florizina**) [Mari et al., 2010].

In questo studio sono stati identificati possibili targets proteici per 14 antiossidanti (riportati in gassetto) presenti nella mela Annurca e a questi sono stati aggiunti il resveratrolo, il beta-carotene, il mioinositolo e il solforafano che sono molecole antiossidanti abbondantemente presenti nel mondo vegetale.

L'**acido clorogenico** è l'estere dell'acido caffeico con l'acido (L)-chinico (Fig. 9). È presente nelle piante ed è uno dei polifenoli più abbondanti nella dieta umana. Il caffè è la principale fonte alimentare di acido clorogenico [Olthof et al., 2001]. Questa molecola presenta proprietà antiossidanti dovute alla sua capacità di *scavenger* dei radicali liberi, come è stato dimostrato in numerosi test *in vitro*. *In vivo*, quando è ingerito con la dieta, l'acido clorogenico aumenta la capacità antiossidante del plasma, le concentrazioni di antiossidanti endogeni come la vitamina E e la resistenza *ex vivo* delle lipoproteine all'ossidazione. Presenta poi attività antinfiammatoria, antiobesità, antifungina, antivirale, antimicrobica, analgesica, antipiretica e ansiolitica [Hu et al., 2011].

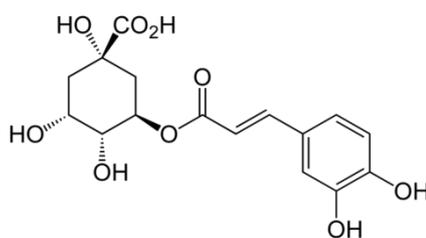


Fig. 9: Struttura chimica dell'acido clorogenico.

Il **β-carotene** è formato da otto unità isoprenoiche che sono ciclizzate alle estremità (Fig. 10). Il β-carotene e tutti i carotenoidi sono assorbiti a livello intestinale e sono trasportati attraverso il sistema linfatico, in associazione con le lipoproteine, al fegato, al surrene, ai testicoli e al tessuto adiposo dove sono convertiti in vitamina A. L'assorbimento dei carotenoidi avviene in modo relativamente non specifico; dipende dalla presenza di grassi e bile nel tratto intestinale e risulta notevolmente diminuito in presenza di steatorrea, diete ipocaloriche e diarrea cronica [Wang, 1994]. Il β-

carotene induce anche la differenziazione cellulare e l'apoptosi di alcuni tipi di cellule tumorali, in particolare nelle prime fasi di tumorigenesi, e migliora l'attività del sistema immunitario, stimolando il rilascio di cellule natural killer, linfociti e monociti [Lim, 2012]. Questa sostanza è un potente antiossidante nei tessuti in ipossia dove blocca direttamente l'ossigeno reattivo. Ad elevate concentrazioni di ossigeno, il  $\beta$ -carotene perde le capacità antiossidanti e sviluppa azione auto-catalitica (effetto pro-ossidante); inoltre, poiché la sua struttura è instabile per la presenza di doppi legami, risulta suscettibile all'ossidazione e quindi alla perdita di attività. Il  $\beta$ -carotene, oltre alle proprietà di antiossidante, ha un ruolo importante nella sfera riproduttiva di diverse specie animali (bovini, cavalli, conigli, suini), infatti, agisce come regolatore dell'ambiente uterino o della risposta ormonale.

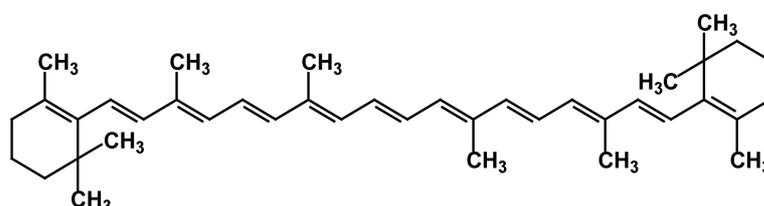


Fig. 10: Struttura chimica del  $\beta$ -Carotene.

**(+)-Catechina e (-)-Epicatechina** sono flavanoli nei quali l'anello C è saturato con un gruppo idrossile in posizione 3 (Fig. 11). Nelle piante si presentano come aglicani, come oligomeri o esterificati con l'acido gallico [de Pascual-Teresa et al., 2010]. I flavanoli sono in grado di regolare il signaling cellulare [Vauzour et al., 2010]. Tale proprietà è dovuta alla loro capacità di agire come antiossidanti e regolatori redox, di interagire con proteine coinvolte nel signaling e di interagire con le membrane. I flavanoli possono svolgere un'azione antiossidante diretta che è limitata all'organo/tessuto in cui sono presenti a concentrazioni elevate e un'azione antiossidante indiretta, in quanto o regolano gli enzimi che generano gli ossidanti, o impediscono il legame recettore-proteina che induce la produzione di ossidanti. Le catechine e le epicatechine sono i flavanoli più comuni; le prime si trovano nelle mele, nel tè, nel vino e nel cioccolato mentre le seconde si trovano principalmente nell'uva nera e nel vino [Heneman and Zidenberg-Cherr, 2008].

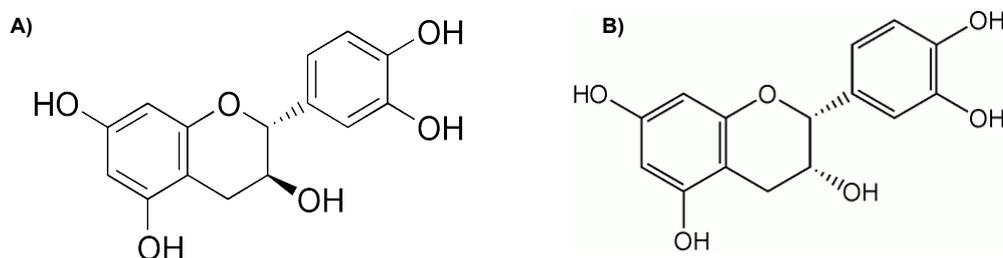


Fig. 11: Struttura chimica di: **A)** (+)-Catechina; **B)** (-)-Epicatechina.

La **Cianidina-3-O-galattoside** appartiene alla famiglia delle antocianine, che a loro volta appartengono al gruppo dei flavonoidi (Fig. 12). In frutta e verdure ci sono sei

differenti composti di antocianine. Le differenze tra i singoli antociani sono il numero di gruppi idrossilici nella molecola; il grado di metilazione di questi gruppi idrossilici, la natura, numero e posizione degli zuccheri collegati alla molecola e il numero e il tipo di acidi alifatici o aromatici attaccati agli zuccheri nella molecola.

Tutte queste variabili rappresentano il gran numero di composti appartenenti alla famiglia degli antociani [de Pascual-Teresa et al., 2010]. Le antocianine sono presenti, seppur in diverse quantità, in quasi tutte le piante superiori e si trovano specialmente nei frutti e nelle infiorescenze, ma si possono riscontrare anche nelle foglie e nelle radici, molto spesso insieme ad altri pigmenti come i carotenoidi. Insieme sono responsabili della colorazione delle foglie delle piante caducifere in autunno. Alimenti ricchi di antociani sono il ribes, le ciliegie, il cavolo rosso, la melanzana, l'uva, le fragole, il sambuco e le bacche in generale. Le antocianine sono antiossidanti grazie alla loro struttura chimica, poiché sono molto reattivi verso le specie reattive dell'ossigeno a causa della loro carenza di elettroni. La cianidina rappresenta uno dei principali gruppi di antociani presenti in natura [Galvano et al., 2007].

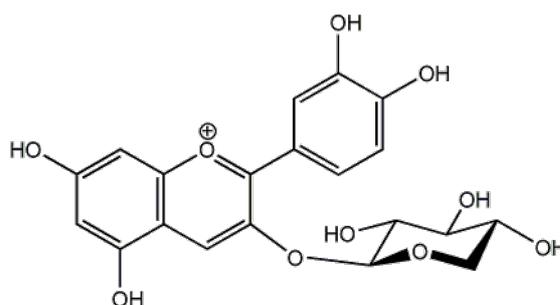


Fig. 12: Struttura chimica della cianidina-3-O-galattoside.

La **florizina** appartiene alla famiglia dei diidrocalconi, composti biciclici (Fig. 13). Essi sono definiti dalla presenza di due anelli aromatici legati da un ponte di tre carboni saturo.

L'azione principale della florizina è di indurre glicosuria renale e intestinale bloccando l'assorbimento di glucosio attraverso l'inibizione del simporto sodio-glucosio situato nel tubulo renale prossimale e nella mucosa dell'intestino tenue. Grazie a questa sua proprietà si pensa di usare la florizina come coadiuvante nel trattamento del diabete di tipo II, come agente per favorire la perdita di peso per l'obesità e come possibile trattamento di iperglicemia da stress associato con malattia cronica [Ehrenkranz et al., 2005].

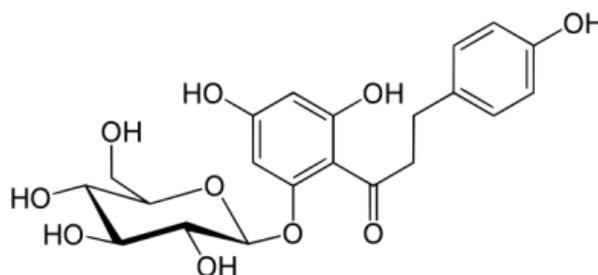


Fig. 13: Struttura chimica della florizina.

Il **Mioinositolo** è un isomero del glucosio appartenente alla famiglia degli inositoli di cui esistono molte isoforme (Fig. 14). Questi sono composti contenenti un cicloalcano con un gruppo ossidrilico su ciascuno dei tre o più atomi dell'anello. Gli inositoli sono sostanze appartenenti al complesso vitaminico B e sono normalmente presenti in natura, in particolare nelle noci, nei cereali, nei legumi e nella frutta, nei piselli, nella crusca di frumento e nel riso. Essi sono componenti fondamentali nell'organismo in quanto entrano nella composizione cellulare, infatti si trova nei fosfolipidi della membrana cellulare, nelle lipoproteine plasmatiche e nel nucleo con importanti proprietà chemiopreventive [Michell, 2008]. Il mioinositolo è un importante messaggero secondario del segnale di trasduzione dell'insulina, inoltre è coinvolto nel differenziamento cellulare [Hada et al., 2010].

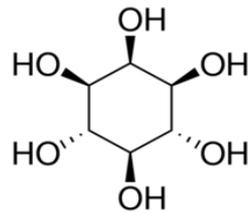


Fig. 14: Struttura chimica del mioinositolo.

La **Quercetina** e i suoi derivati glicosilati (**Rutina**, **Quercitrina**, **Isoquercitrina**, **Iperina**, **Reinourina**) appartengono al gruppo dei flavonoli (Fig. 15). Alimenti ricchi di flavonoli sono: l'uva rossa e il vino rosso, il capperi, la cipolla rossa, il tè verde, il mirtillo, la mela, la propoli e il sedano. Oltre al loro effetto antiossidante essi interferiscono con un elevato numero di pathways biochimici di segnalazione e pertanto sono coinvolti in diversi processi fisiologici e patologici. *In vitro* la quercetina e i flavonoli correlati esercitano effetti vasodilatatori endotelio-dipendenti, proteggono dagli effetti dell'ossido nitrico, hanno azione antiaggregante piastrinica, inibiscono l'ossidazione delle LDL, proteggono dal danno ossidativo neuronale e dal danno infiammatorio. Studi sull'uomo hanno inoltre confermato l'effetto antiipertensivo dei flavonoli [Perez-Vizcain and Duarte, 2010].

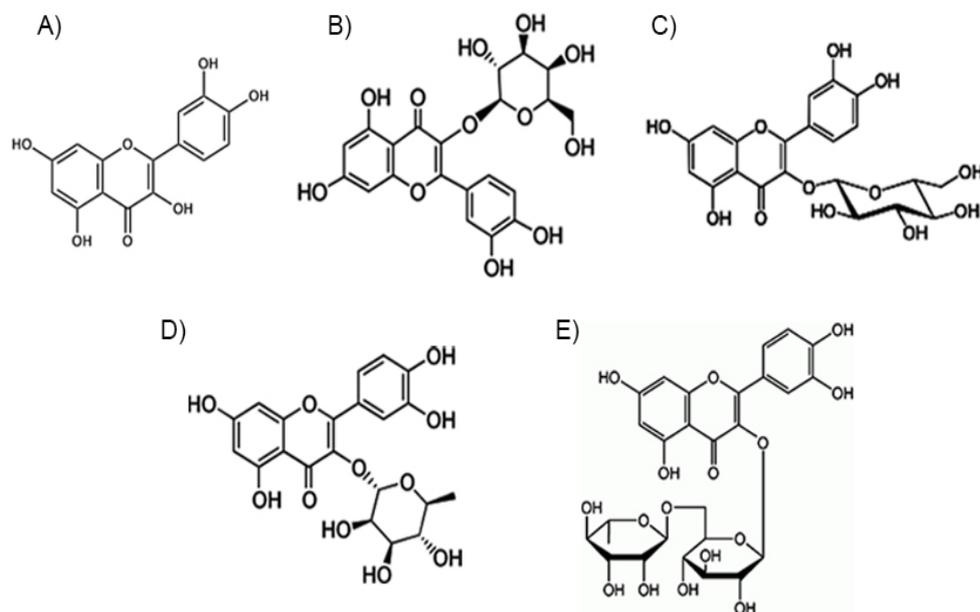


Fig. 15: Struttura chimica di: A) quercetina, B) iperina, C) isoquercitrina, D) quercitrina, E) rutina.

La **Procianidina B<sub>1</sub>** e la **Procianidina B<sub>2</sub>** sono unità polimeriche dei flavan-3-oli. La **procianidina B<sub>1</sub>** è formata da epicatechina-(4 $\beta$ →8)-catechina mentre la **procianidina B<sub>2</sub>** è data dal legame tra epicatechina-(4 $\beta$ →8)-epicatechina (Fig. 16) [Sica and Zollo, 2007]. Queste molecole presentano molte attività biologiche di tipo antiossidante, antimutageno, anticitotossico, antinfiammatorie e chemiopreventive. Inoltre le procianidine sono in grado di inibire la perossidazione lipidica e l'aggregazione piastrinica [Bak et al., 2012].

Le procianidine sono i polifenoli più abbondanti nella frutta, verdura, cereali, tè verde, noci, semi e corteccia.

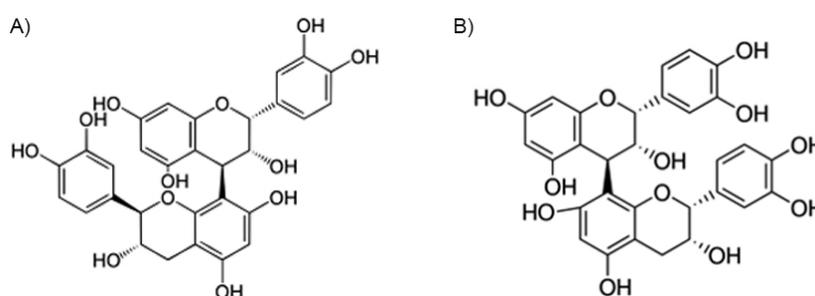


Fig. 16: Struttura chimica di: A) procianidina B<sub>1</sub>; B) procianidina B<sub>2</sub>.

Il **resveratrolo** è un composto polifenolico molto diffuso (trovato in 72 specie di piante) e principalmente presente nella vite, soprattutto nell'uva a buccia rossa, nelle arachidi, nei frutti di bosco e nei pini. È formato da due anelli aromatici uniti da un ponte etilenico su cui si innestano tre gruppi OH in posizione 3, 5, 4' [Abba et al., 2015] (Fig. 17). Il resveratrolo è prodotto dalle piante in risposta alle infezioni da

patogeni come il *Botrytis cinerea* e anche in condizioni di stress climatici, esposizione all'ozono, alla luce solare e ai metalli pesanti [Shoonbeek et al., 2001]. Questa molecola esiste in due forme isomeriche, una cis e una trans [Abba et al., 2015]. Quando si parla di resveratrolo non si può non citare il cosiddetto **paradosso francese**. Questo termine fu coniato in seguito a uno studio scientifico che aveva osservato come, nel sud della Francia, l'incidenza delle malattie cardiovascolari (e anche di quelle cerebrovascolari) fosse minore rispetto a quella verificatasi in altre popolazioni con simili abitudini alimentari, e cioè in comunità in cui si consumavano molti cibi contenenti grassi insaturi. Si attribuì questo paradosso al consumo di vino rosso in cui il resveratrolo è abbondante [Mochly-Rosen and Zakhari, 2010]. Molteplici studi indicano che il resveratrolo può modulare molteplici pathways coinvolti nella crescita cellulare, nell'apoptosi e nell'infiammazione [Abba et al., 2015]. Gli effetti chemiopreventivi di questa molecola sembrano strettamente associati con la sua attività antiossidante ed è stato dimostrato che essa inibisce le ciclossigenasi, l'idroperossidasi, la proteina chinasi C, Akt, NF-kB, la metalloproteasi di matrice 9 e i regolatori del ciclo cellulare. Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto benefico del resveratrolo in molte forme di neoplasie. Per esempio, inibisce la replicazione di *Helicobacter pylori*, il determinante eziologico primario della neoplasia gastrica. Le cellule gastriche neoplastiche rispondono al trattamento con resveratrolo con l'interruzione del ciclo cellulare e l'apoptosi che, in parte, è dovuta alla formazione dell'ossido nitrico, che interferisce con i radicali liberi prodotti endogenamente [Zulueta et al., 2015].

Comunque, dati i molteplici effetti del resveratrolo e le relative basse quantità di questo antiossidante presenti negli alimenti assunti con la dieta, si ipotizza che i benefici sulla salute siano dovuti alla sua combinazione sinergica con altri agenti. È stato dimostrato *in vitro* che il resveratrolo ha un effetto sinergico con la quercetina e l'acido ellagico per indurre l'apoptosi [Athar et al., 2007].

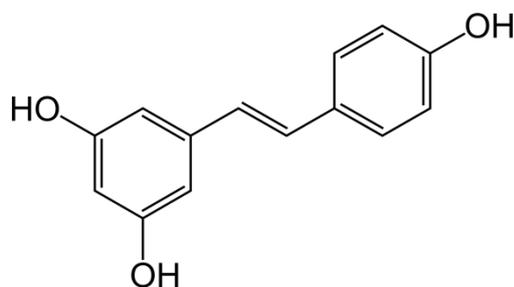
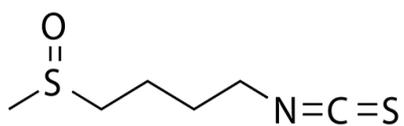


Fig. 17: Struttura chimica del resveratrolo.

Il **Solforafano** è un isotiocianato presente esclusivamente nelle crucifere e in particolare nei broccoli (Fig. 18). Tali vegetali contengono glucorafanina, un glucosinolato, che è il precursore del solforafano e che viene convertito in solforafano dalla tirosinasi, una glicosidasi presente sia nei vegetali che nei batteri che compongono la flora batterica nell'intestino umano.

Il solforafano ha azione antibatterica, antiossidante, antidiabetica, antimicrobica, soprattutto nelle infezioni gastriche da *Helicobacter pylori*, ed antineoplastica. È stato dimostrato che esso è capace di indurre gli enzimi detossificanti di fase due che promuovono l'escrezione di sostanze cancerose, di modulare più bersagli cellulari coinvolti nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi quali: Bcl-2, p53, caspasi e

chinasi-cicline dipendenti. Questa molecola è inoltre capace di sopprimere l'angiogenesi dovuta alla "down-regulation" del fattore di crescita dell'endotelio vascolare, di HIF-1 $\alpha$ , delle metalloproteasi di matrice 2 e 9 [Fimognari et al., 2012].

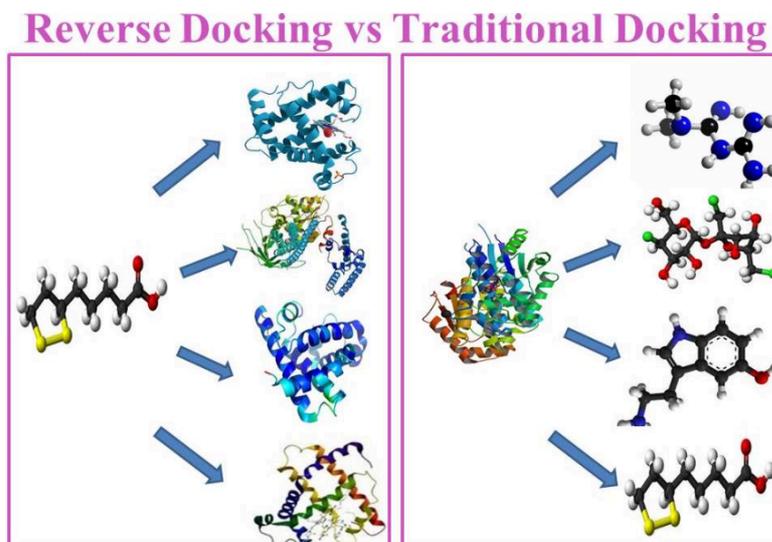


**Fig. 18:** Struttura chimica del solforafano.

## Capitolo 4. Risultati dello studio sul possibile ruolo delle micotossine nell'autismo

### 4.1. Selezione di targets proteici per le micotossine mediante un approccio di docking inverso

Per questo progetto sono state selezionate dalla letteratura 12 micotossine note per essere associate al latte e ai cereali. Le micotossine scelte sono: aflatoossina B<sub>1</sub>, aflatoossina B<sub>2</sub>, aflatoossina M<sub>1</sub>, aflatoossina M<sub>2</sub>, aflatoxicolo, zearalenone,  $\alpha$ -zearalanolo,  $\beta$ -zearalanolo, gliotossina, deossinivalenolo, patulina e ocratossina A di cui è stata considerata sia la struttura con il gruppo carbossilico protonato sia con il gruppo carbossilico deprotonato. Per ognuna di queste molecole, mediante un approccio di docking inverso, sono stati selezionati i loro possibili targets proteici. La procedura, di tipo computazionale, si basa sul rovesciamento delle strategie classiche di docking, nelle quali si parte dalla struttura nota di una proteina e si valuta la probabilità che ligandi (piccole molecole chimiche) possano legarsi a questa proteina, con una stima della probabilità di legame basata su valutazioni di tipo energetico e geometrico. Nel docking inverso, al contrario, data la struttura di un ligando, si ricerca all'interno di un database di strutture di proteine quali siano le strutture in grado di legarsi al ligando (Fig. 19).



**Fig. 19:** Rappresentazione schematica del docking inverso (sinistra) e del docking molecolare (destra) [Scafuri et al., 2015].

idTarget ha identificato migliaia di proteine a cui ogni micotossina potrebbe legarsi, ordinate per migliore energia di legame predetta; di queste sono state selezionate le migliori 100.

Per la selezione dei targets proteici delle micotossine è stato definito un protocollo per maneggiare un numero così elevato di possibili bersagli proteici [Scafuri et al., 2015].

I primi 100 targets di ogni molecola sono stati confrontati tra loro, individuandone 537 comuni a due o più micotossine. I targets proteici selezionati da idTarget comprendono sia targets umani che non umani. L'interesse di questo studio è rivolto alla ricerca di targets umani; quindi, dai 537 targets individuati sono state selezionate tutte le strutture proteiche umane, e anche quelle non umane che però erano comuni a cinque o più micotossine. Molte delle proteine espresse nell'uomo sono espresse anche in altri organismi ed hanno la stessa conformazione tridimensionale e la stessa funzione. Pertanto le strutture non umane comuni a più della metà delle micotossine sono state mantenute nella lista dei possibili targets proteici per essere certi di non aver eliminato a prescindere targets significativi. In questo modo il numero dei possibili targets proteici analizzati per le micotossine si è ridotto a 126. Di questi, per quelli non umani sono state ricercate le strutture omologhe umane e sono state sostituite laddove sono state trovate nella banca dati strutturale, controllando che la struttura proteica umana fosse nella stessa conformazione tridimensionale della struttura proteica non umana. La ricerca ha permesso di sostituire l'Aspartato aminotransferasi (codice PDB: 1AJS) di *Sus Scrofa* con l'omologa struttura proteica umana riportata in PDB con il codice 3II0, e l'Acetilcolinesterasi di *Torpedo californica* (codice PDB: 2CMF) con l'omologa struttura proteica umana riportata in PDB con il codice 1B41. Gli altri targets proteici, non avendo strutture omologhe umane a disposizione, sono stati definitivamente scartati. A questo punto sono rimasti 95 possibili targets proteici per le micotossine, e di questi sono stati studiati il tessuto di espressione, la funzione molecolare, i pathways e le patologie in cui sono coinvolti. Lo studio di queste caratteristiche ha permesso una selezione di targets proteici una cui alterazione potrebbe avere conseguenze sul SNC, in quanto lo scopo dello studio è quello di valutare l'effetto che le micotossine possono avere nell'eziologia dell'autismo, patologia che compromette proprio il SNC. Da queste informazioni è stato possibile individuare 18 possibili targets proteici per le micotossine che sono tutti espressi nel cervello e/o coinvolti, direttamente o indirettamente, in patologie cerebrali (Tab.1).

**Tabella 1:** targets proteici selezionati mediante docking inverso.

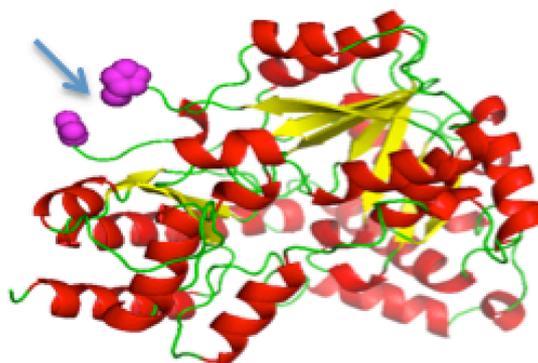
CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	ORGANO DI ESPRESSIONE/PATOLOGIA	LIGANDI
2BK3	Monoammino ossidasi B	Cervello	Ocratossina A, Gliotossina, $\beta$ -zearalanolo, Deossinivalenolo
2DU8	D-amminoacido ossidasi	Cervello	Gliotossina, Deossinivalenolo, Ocratossina A
1S1P	Membro C3 delle Aldochetoreduktasi della famiglia 1	Cervelli, reni, fegato, polmone, ghiandola mammaria, placenta, piccolo intestino, colon, milza, prostata e testicoli	Aflatossicolico, Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , $\alpha$ -zearalanolo, Gliotossina
1M9M	Ossido Nitrico sintasi, endoteliale	Alzheimer	Gliotossina
3II0	Aspartato aminotransferasi citosolica	Cervello	Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina M <sub>2</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , Aflatossina B <sub>1</sub> , Aflatossicolico

3MHJ	Tanchirasi 2	Placenta, muscolo scheletrico, fegato, cervello, reni, cuore, timo, polmoni, pancreas, milza, ovaio	Aflatossina B <sub>2</sub> , Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina M <sub>2</sub> , Aflatossicolo, Deossivalenolo
1B41	Acetilcolinesterasi	Cervello	Aflatossina B <sub>1</sub> , Gliotossina, Aflatossina B <sub>2</sub> , Ocratossina A, Aflatossicolo, Deossivalenolo
1XOQ	Fosfodiesterasi 4D specifica per cAMP-3'-5' ciclico	Acrodisostosi 2, con e senza ormone resistenza	Ocratossina A, Gliotossina
1FKN	β-secretasi	Cervello e pancreas/ Alzheimer	Ocratossina A, Gliotossina
1Z4M	5'(3')-deossiribonucleotidasi, mitocondriale	Cuore, cervello e muscolo scheletrico	Aflatossina M <sub>2</sub> , Aflatossina B <sub>1</sub> , α-zearalanolo
2C6C	Glutamato carbossipeptidasi 2	Reni, testicoli, ovaio, fegato, esofago, stomaco, piccolo intestino, colon, cervello	Ocratossina A, Gliotossina
2CG5	L-amminoadipato-semialdeide deidrogenasi fosfopentil transferasi	Cuore, muscolo scheletrico, cervello, reni	Ocratossina A, Gliotossina
1HKN	Fattore di crescita dei fibroblasti 1	Reni e cervello	Ocratossina A
2C6Q	GMP-reduttasi 2	Cuore, muscolo scheletrico, cervello, reni, fegato	Ocratossina A, Gliotossina
2IIP	Nicotinammide N-metiltransferasi	Alzheimer	Ocratossina A, α-zearalanolo, β-zearalanolo
1IMB	Inositolo monofosfatasi 1	Influenza l'effetto del litio in pazienti con disturbi psichiatrici	Ocratossina A, Gliotossina
1W7L	Chinurenina-oxoglutarato transaminasi 1	Produce metaboliti neurotossici	Ocratossina A, Gliotossina
1NM8	Carnitina O-acetiltransferasi	Muscolo scheletrico, cuore, fegato, pancreas, cervello/ Alzheimer	Ocratossina A, Gliotossina

Le strutture selezionate da idTarget dalla banca dati PDB non sono tutte integre. L'integrità e un'alta risoluzione sono indispensabili per lo studio delle interazioni tra due molecole, pertanto per ognuna delle 18 strutture selezionate mediante il docking inverso sono state valutate l'integrità, la presenza di mutazione e la risoluzione. Le strutture che presentavano un'ambiguità in uno di questi tre parametri sono state sostituite con strutture corrette, quando disponibili.

Le strutture rimpiazzate da strutture equivalenti della stessa proteina sono state:

- 2C6C (Glutamato carbossipeptidasi 2), che manca della porzione N-terminale, ha tre gap centrali e manca di molti atomi, è stata sostituita con 3D7F;
- 1W7L (Chinurenina-ossoglutarato transaminasi 1), che manca di tre amminoacidi nella porzione N-terminale ed ha un gap centrale (Fig. 20), è stata sostituita con 3FVS.



**Fig. 20:** Struttura tridimensionale di chinurenina oxoglutarato transaminasi 1 riportata in PDB con il codice 1W7L.

Anche per l'enzima 5'(3')-deossiribonucleotidasi mitocondriale, di cui idTarget ha selezionato la struttura con il codice 1Z4M, che reca la mutazione D41N che produce effetti sull'attività catalitica del sito attivo, è stata effettuata una sostituzione con la struttura wild-type riportata in PDB con il codice 1Q92.

Le strutture eliminate in assenza di analoghi equivalenti strutturali integri sono state:

- 3I10 (Aspartato aminotransferasi, citosolica), che ha una bassa risoluzione e in cui mancano gli amminoacidi delle regioni N-terminale e C-terminale;
- 1M9M (Ossido nitrico sintasi, endoteliale) che ha un gap centrale e atomi mancanti.

Infine, tra i targets identificati da idTarget c'è l'acetilcolinesterasi (cod. PDB: 1B41), un enzima fondamentale nella trasmissione nervosa poiché termina la trasduzione del segnale a livello della giunzione neuromuscolare, idrolizzando rapidamente l'acetilcolina rilasciata nello spazio sinaptico [Soreq, 1990]. Dalla letteratura è emerso che alla famiglia strutturale delle acetilcolinesterasi appartiene la Neuroligina 4X, di cui è noto un suo possibile coinvolgimento nell'eziologia dell'autismo [Chen et al., 2014]. Le neuroligine sono proteine sinaptiche la cui attività sembra essere collegata a fenomeni di plasticità neuronale che si instaurano nei primi mesi di vita, compatibili con i tempi di insorgenza dell'autismo. Esistono diverse proteine della famiglia delle neuroligine, e in particolare la neuroligina 3 e la 4X sembrano essere interessanti in quanto sono note in letteratura mutazioni di queste proteine associate all'autismo [Singh et Eroglu, 2013]. Nella banca dati PDB è presente una struttura cristallografica di neuroligina 4X (NLGN4X) wild type, integra e con un'alta risoluzione, il cui codice PDB corrispondente è 3BE8. Di conseguenza anche questo target è stato inserito alla lista delle proteine che potrebbero interagire con le micotossine, sebbene idTarget non l'abbia identificato tra le prime 100 strutture selezionate per ogni micotossina, ed è stato testato il legame di questa proteina con le micotossine che legano presumibilmente anche l'acetilcolinesterasi.

Alla fine di questa complessa procedura di selezione sono stati quindi identificati 16 possibili targets proteici per le micotossine, selezionati in via definitiva per le successive valutazioni (Tab. 2).

**Tabella 2:** targets proteici definitivi selezionati per le micotossine.

NOME DELLA PROTEINA	CODICE PDB SELEZIONATO DA idTarget	CODICE PDB SELEZIONATO SOSTITUITO	LIGANDO
Monoammino ossidasi B	2BK3	2BK3	Ocratossina A, Gliotossina, $\beta$ -Zearalanolo, Deossivalenolo
D-amminoacido ossidasi	2DU8	2DU8	Gliotossina, Deossinivalenolo, Ocratossina A
Membro C3 delle Aldo-chetoreduccasi della famiglia 1	1S1P	1S1P	Aflatossicolo, Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , Aflatossicolo, $\alpha$ -Zearalanolo, Gliotossina
Tanchirasi 2	3MHJ	3MHJ	Aflatossina B <sub>2</sub> , Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina M <sub>2</sub> , Aflatossicolo, Deossinivalenolo
Acetilcolinesterasi	1B41	1B41	Aflatossina B <sub>1</sub> , Gliotossina, Aflatossina B <sub>2</sub> , Ocratossina A, Aflatossicolo, Deossinivalenolo
Fosfodiesterasi 4D specifica per cAMP-3'-5' ciclico	1XOQ	1XOQ	Ocratossina A, Gliotossina
$\beta$ -secretasi	1FKN	1FKN	Ocratossina A, Gliotossina
5'(3')-deossiribonucleotidasi, mitocondriale	1Z4M	1Q92	Aflatossina B <sub>1</sub> , Aflatossina M <sub>2</sub> , $\alpha$ -Zearalanolo
Glutamato carbossipeptidasi 2	2C6C	3D7F	Ocratossina A, Gliotossina
Fattore di crescita dei fibroblasti 1	1HKN	1HKN	Ocratossina A
GMP-reduttasi 2	2C6Q	2C6Q	Ocratossina A, Gliotossina
Inositolo monofosfatasi 1	1IMB	1IMB	Ocratossina A, Gliotossina,
Nicotinammide N-metiltransferasi	2IIP	2IIP	Ocratossina A, $\alpha$ -Zearalanolo, $\beta$ -Zearalanolo
Chinurenina-oxoglutarato transaminasi 1	1W7L	3FVS	Ocratossina A, Gliotossina
Carnitina O-acetiltransferasi	1NM8	1NM8	Ocratossina A, Gliotossina
Neurologina 4X	<i>Non individuato da idTarget</i>	2BE8	Ocratossina A, Gliotossina, Aflatossina B <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , Deossinivalenolo

## 4.2 Risultati del docking molecolare tra le micotossine e le proteine selezionate mediante docking inverso

Per studiare l'interazione delle micotossine con i targets proteici selezionati è stato applicato un approccio di docking molecolare. Per verificare il legame e comprendere il sito di legame che il ligando occupa sulla proteina sono stati eseguiti docking in cui la griglia che determina lo spazio di interazione è stata settata sull'intera superficie proteica. In questo modo il ligando ha potuto esplorare l'intera superficie della proteina, potendosi disporre anche in siti di legame differenti da quello "canonico" della proteina. Con il docking sull'intera superficie proteica si è andato a definire se il

legame predetto con il docking inverso fosse confermato anche con il docking molecolare.

I risultati di docking sull'intera superficie proteica mostrano che le interazioni esaminate hanno valori di energia predetta compresi tra -11,04 kcal/mol e -4,77 kcal/mol e la migliore interazione è tra la Tanchirasi-2 e l'aflatossina M<sub>1</sub> (Tab. 3).

**Tabella 3:** risultati di docking tra le micotossine e i bersagli proteici predetti.

Proteina: Monoammino-ossidasi B (codice PDB: 2BK3)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 95 Energia di legame: -10,43 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 3 Sito di legame: SI
β-Zearalenolo	Conformazione: 96 Energia di legame: -7,39 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO
Deossinivalenolo	Conformazione: 55 Energia di legame: -6,99 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 32 Sito di legame: NO
Gliotossina	Conformazione: 12 Energia di legame: -7,08 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 38 Sito di legame: NO

Proteina: D-amminoacido ossidasi (codice PDB: 2DU8)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 46 Energia di legame: -8,05 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 7 Sito di legame: NO
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 62 Energia di legame: -8,44 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO
Deossinivalenolo	Conformazione: 75 Energia di legame: -5,28 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 5 Sito di legame: NO
Gliotossina	Conformazione: 45 Energia di legame: -5,83 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 5 Sito di legame: NO

Proteina: Membro C3 delle Aldo-chetoreduccasi della famiglia 1 (codice PDB: 1S1P)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Aflatossina M <sub>1</sub>	Conformazione: 13 Energia di legame: -8,03 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 48 Sito di legame: NO
Gliotossina	Conformazione: 64 Energia di legame: -7,20 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 31 Sito di legame: NO
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 92 Energia di legame: -8,09 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 44 Sito di legame: SI
Aflatossicolo	Conformazione: 57 Energia di legame: -7,95 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 42 Sito di legame: SI
α-Zearalanolo	Conformazione: 54 Energia di legame: -7,80 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 2 Sito di legame: SI

Proteina: Tanchirasi 2 (codice PDB: 3MHJ)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Aflatossina M <sub>1</sub>	Conformazione: 50 Energia di legame: -8,03 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 48 Sito di legame: NO
Deossinivalenolo	Conformazione: 65 Energia di legame: -7,47 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 3 Sito di legame: NO
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 72 Energia di legame: -11,04 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 32 Sito di legame: SI
Aflatossicolo	Conformazione: 29 Energia di legame: -10,41 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 25 Sito di legame: SI
Aflatossina M <sub>2</sub>	Conformazione: 72 Energia di legame: -10,77 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 38 Sito di legame: SI

Proteina: Acetilcolinesterasi (codice PDB: 1B41)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Aflatossina B <sub>1</sub>	Conformazione: 38 Energia di legame: -8,37 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 58 Sito di legame: SI
Gliotossina	Conformazione: 46 Energia di legame: -7,45 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 71 Sito di legame: NO
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 80 Energia di legame: -8,95 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 56 Sito di legame: NO
Aflatossicolo	Conformazione: 29 Energia di legame: -8,82 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 8 Sito di legame: NO
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 50 Energia di legame: -8,33 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 2 Sito di legame: NO
Deossinivalenolo	Conformazione: 79 Energia di legame: -5,79 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 10 Sito di legame: NO

Proteina: fosfodiesterasi 4D specifica per cAMP-3'-5' ciclico (codice PDB: 1XOQ)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 94 Energia di legame: -7,62 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 3 Sito di legame: SI
Gliotossina	Conformazione: 92 Energia di legame: -6,78 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 23 Sito di legame: SI

Proteina:  $\beta$ -secretasi (codice PDB: 1FKN)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 52 Energia di legame: -9,40 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 19 Sito di legame: SI
Gliotossina	Conformazione: 5 Energia di legame: -6,44 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 39 Sito di legame: SI

Proteina: 5'(3')-deossiribonucleotidasi, mitocondriale (codice PDB: 1Q92)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Aflatossina B <sub>1</sub>	Conformazione: 30 Energia di legame: -8,70 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 24 Sito di legame: SI
α-Zearalanolo	Conformazione: 83 Energia di legame: -8,76kcal/mol Numero di pose nel cluster: 17 Sito di legame: SI
Aflatossina M <sub>2</sub>	Conformazione: 86 Energia di legame: -8,51 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 23 Sito di legame: SI

Proteina: Glutammato carbossipeptidasi 2 (codice PDB: 3D7F)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 21 Energia di legame: -9,27 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 2 Sito di legame: NO
Gliotossina	Conformazione: 78 Energia di legame: -5,34 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 12 Sito di legame: NO

Proteina: Fattore di crescita dei fibroblasti 1 (codice PDB: 1HKN)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 96 Energia di legame: -9,88 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 25 Sito di legame: SI

Proteina: GMP-reduttasi 2 (codice PDB: 2C6Q)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Gliotossina	Conformazione: 61 Energia di legame: -6,83 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 16 Sito di legame: SI
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 96 Energia di legame: - 7,10kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: SI

Proteina: Inositolo monofosfatasi 1 (codice PDB: 1IMB)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Gliotossina	Conformazione: 65 Energia di legame: -6,58 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 27 Sito di legame: NO
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 6 Energia di legame: -6,51 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 10 Sito di legame: SI (parzialmente)

Proteina: Nicotinammide N-metiltransferasi (codice PDB:2IIP)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 63 Energia di legame: -8,92 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO
$\alpha$ -Zearalanolo	Conformazione: 37 Energia di legame: -7,16 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 37 Sito di legame: NO
$\beta$ -Zearalanolo	Conformazione: 7 Energia di legame: -6,73 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 36 Sito di legame: NO

Proteina: Chinurenina-oxoglutarato transaminasi 1 (codice PDB: 3FVS)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Gliotossina	Conformazione: 81 Energia di legame: -5,90 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 3 Sito di legame: SI
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 78 Energia di legame: -5,56 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 8 Sito di legame: SI

Proteina: Carnitina O-acetiltransferasi (codice PDB:1NM8)

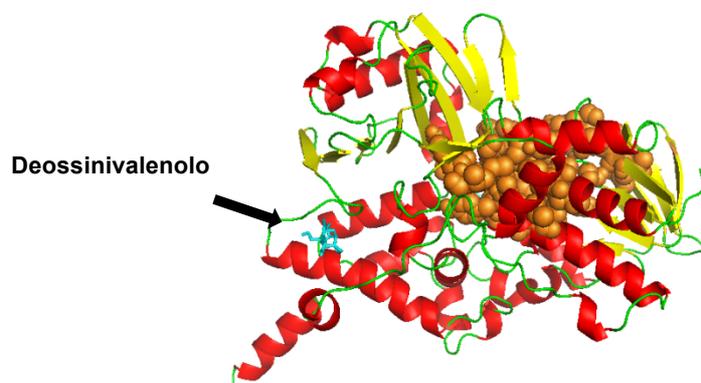
LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Gliotossina	Conformazione: 81 Energia di legame: -6,30 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 11 Sito di legame: NO
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 41 Energia di legame: -7,91 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 8 Sito di legame: NO

Proteina: Neurologina 4X (codice PDB: 3BE8)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
Aflatossina B <sub>1</sub>	Conformazione: 85 Energia di legame: -7,17 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 27 Sito di legame: NO
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 59 Energia di legame: -6,94 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 36 Sito di legame: NO
Gliotossina	Conformazione: 13 Energia di legame: -6,13 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 5 Sito di legame: NO
Deossivalenolo	Conformazione: 62 Energia di legame: -4,77 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 7 Sito di legame: NO
Ocratossina A	Conformazione: 13 Energia di legame: -6,99 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 19 Sito di legame: NO
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 99 Energia di legame: -7,49 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 10 Sito di legame: NO

In generale i risultati mostrano che alcune micotossine si legano con una buona energia di legame predetta ad alcuni dei targets proteici individuati. Le interazioni che prevedono un'energia di legame minore di -8 kcal/mol sono: Monoammino ossidasi B (cod. PDB: 2BK3) con ocratossina A (carica) (-10,23 kcal/mol); D-amminoacido ossidasi (cod. PDB: 2DU8) con ocratossina A (carica) (-8,05 kcal/mol) e ocratossina A (neutra) (-8,44 kcal/mol); la proteina membro C3 delle aldolchetoreductasi della famiglia 1 (cod. PDB: 1S1P) con aflatossina M<sub>1</sub> (-8,03 kcal/mol) e con aflatossina B<sub>2</sub> (-8,09 kcal/mol); tanchirasi 2 (cod. PDB: 3MHJ) con aflatossina M<sub>1</sub> (-8,03 kcal/mol), con aflatossina B<sub>2</sub> (-11,04 kcal/mol) con aflatossicolo (-10,41 kcal/mol) e con aflatossina M<sub>2</sub> (-10,77 kcal/mol); l'acetilcolinesterasi (cod. PDB: 1B41) con aflatossina B<sub>1</sub> (-8,37 kcal/mol), con aflatossina B<sub>2</sub> (-8,95 kcal/mol), aflatossicolo (-8,82 kcal/mol) e con ocratossina A (neutra) (-8,33 kcal/mol), la  $\beta$ -secretasi (cod. PDB: 1FKN) con ocratossina A (carica) (-9,40 kcal/mol); 5'(3')-deossiribonucleotidasi, mitocondriale (cod. PDB: 1Q92) con aflatossina B<sub>1</sub> (-8,70 kcal/mol), con  $\alpha$ -zearalanolo (-8,76 kcal/mol) e con aflatossina M<sub>2</sub> (-8,51 kcal/mol); glutammato carbossipeptidasi 2 (cod. PDB: 3D7F) con ocratossina A (neutra) (-9,27 kcal/mol); nicotinammide N-metiltransferasi (cod. PDB: 2IIP) con ocratossina A (carica) (-8,92 kcal/mol).

Alcune interazioni mostrano che le micotossine si legano in un sito di legame non "canonico" della proteina, con una buona energia di legame predetta, come ad esempio nel caso dell'interazione tra la monoammino-ossidasi B e il deossivalenolo (Fig. 21), oppure nell'interazione tra tanchirasi 2 e aflatossina M<sub>1</sub> e tra acetilcolinesterasi e gliotossina.



**Fig. 21:** Interazione tra monoammino-ossidasi B e deossinivalenolo legante il sito “non canonico” della proteina.

Dai risultati ottenuti dal docking sull’intera superficie proteica sono state selezionate le migliori interazioni sulla base dei valori di energia di legame predetti e il numero di pose nel cluster (Tab. 4).

**Tabella 4:** interazioni proteina-ligando selezionati sulla base della migliore energia di legame e del numero di pose nel cluster.

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	LIGANDO
2BK3	Monoammino ossidasi B	Deossinivalenolo, Gliotossina
1S1P	Membro C3 delle Aldo-chetoreduccasi della famiglia 1	Aflatossina B <sub>2</sub> , Aflatossicolo
3MHJ	Tanchirasi 2	Aflatossina M <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub>
1FKN	β-secretasi	Gliotossina
2IIP	Nicotinammide N-metiltransferasi	α-Zearalanolo, β-Zearalanolo
1B41	Acetilcolinesterasi	Aflatossina B <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , Gliotossina
3BE8	Neurologina 4X	Aflatossina B <sub>1</sub> , Aflatossina B <sub>2</sub> , Gliotossina, Ocratossina A, Deossinivalenolo

Tra le migliori interazioni selezionate rientrano tutte quelle studiate tra le micotossine con la NLGN4X e le interazioni tra l’acetilcolinesterasi con aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub> e gliotossina, sostenendo ulteriormente l’ipotesi che le micotossine potrebbero interferire con vie di segnalazione cerebrali.

Per ottenere informazioni più attendibili dell’energia di legame delle interazioni tra proteine e micotossine che si legano al sito di legame “canonico”, e per confermare che alcune micotossine prediligono il legame lontano dal sito “canonico”, sono stati eseguiti docking focalizzati sul sito di legame delle proteine per le interazioni selezionate. In questo modo è stato ridotto lo spazio d’interazione del ligando sulla proteina, riuscendo a individuare esattamente le micotossine che hanno un’affinità di legame per un sito lontano da quello canonico. I risultati sono riportati nella Tab. 5.

**Tabella 5:** risultati dei docking eseguiti focalizzando la griglia sul sito di legame delle proteine.

Proteina: Monoammino-ossidasi B (codice PDB: 2BK3)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Gliotossina	Conformazione: 47 Energia di legame: -4,54kcal/mol Numero di pose nel cluster: 6
Deossivalenolo	Conformazione: 98 Energia di legame: -4,06 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 78

Proteina: Membro C3 delle Aldo-chetoreduktasi della famiglia 1 (codice PDB: 1S1P)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 67 Energia di legame: -8,10 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 100
Aflatossicolo	Conformazione: 72 Energia di legame: -8 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 31 Sito di legame: NO

Proteina: Tanchirasi 2 (codice PDB: 3MHJ)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Aflatossina M <sub>1</sub>	Conformazione: 46 Energia di legame: -9,89 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 40 Conformazione: 37 Energia di legame: -9,77 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 60
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 16 Energia di legame: -9,83 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 78

Proteina:  $\beta$ -secretasi (codice PDB: 1FKN)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Gliotossina	Conformazione: 75 Energia di legame: -6,51 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 100

Proteina: Nicotinammide N-metiltransferasi (codice PDB:2IIP)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
$\alpha$ -Zearalanolo	Conformazione: 2 Energia di legame: -9,97 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 100
$\beta$ -Zearalanolo	Conformazione: 99 Energia di legame: -9,79 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 100

Proteina: Acetilcolinesterasi (codice PDB: 1B41)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Aflatossina B <sub>1</sub>	Conformazione: 94 Energia di legame: -4,61 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 100
Gliotossina	Conformazione: 12 Energia di legame: -4,31 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 40  Conformazione: 83 Energia di legame: -4,02kcal/mol Numero di pose nel cluster: 59
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 13 Energia di legame: -4,10 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 83

Proteina: Neuroligina 4X (codice PDB: 3BE8)

LIGANDO	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME DELLA PROTEINA
Aflatossina B <sub>1</sub>	Conformazione: 51 Energia di legame: -7,06 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 51
Aflatossina B <sub>2</sub>	Conformazione: 75 Energia di legame: -6,49 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 62
Gliotossina	Conformazione: 66 Energia di legame: - 6,77 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 74
Deossinivalenolo	Conformazione: 91 Energia di legame: -6,58 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 89
Ocratossina A (neutra)	Conformazione: 16 Energia di legame: -7,19 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 16
Ocratossina A (carica)	Conformazione: 70 Energia di legame: -7,43 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 42

Le interazioni tra la proteina Membro C3 delle aldo-chetoreduccasi della famiglia 1 e aflatossina B<sub>2</sub> e aflatossinolo e tra tanchirasi 2 e aflatossina M<sub>1</sub> e aflatossina B<sub>2</sub> confermano che il sito di legame è quello "canonico". I docking tra monoammino ossidasi B e gliotossina e deossinivalenolo e i docking tra  $\beta$ -secretasi e aflatossina B<sub>2</sub> e gliotossina confermano che i ligandi si posizionano in un sito di legame "non canonico" della proteina. Infatti, le interazioni tra monoammino ossidasi B con gliotossina e con deossinivalenolo hanno nel sito di legame non canonico un'energia di legame predetta rispettivamente di -7,08 kcal/mol e -6,99 kcal/mol mentre nel sito di legame "canonico" hanno valori di energia di legame predetta di -4,54 kcal/mol e -4,06 kcal/mol. Nell'interazione tra  $\beta$ -secretasi e aflatossina B<sub>1</sub> la micotossina non ha una buona energia di legame nel sito "canonico", quindi in questo caso non si conferma la sua interazione in quel sito. Infine l'energia di legame predetta nell'interazione tra nicotinammide N-metiltransferasi e  $\alpha$ -zearalanolo e in quella con  $\beta$ -zearalanolo migliora quando le micotossine passano dal sito di legame "non canonico" a quello "canonico". I due ligandi nel docking sull'intera superficie proteica

hanno un'energia di legame predetta per la proteina in un sito di legame non canonico pari a -7,16 kcal/mol e -6,73 kcal/mol rispettivamente e hanno un'energia di legame predetta di -9,97 kcal/mol e -9,79 kcal/mol, rispettivamente, nell'interazione nel sito di legame canonico.

### 4.3 Risultati delle interazioni testate *in vitro*

Alcune interazioni studiate *in silico* sono state verificate mediante saggi *in vitro*. Non è stato possibile applicare i saggi per validare tutte le interazioni poiché non tutte le proteine selezionate sono disponibili commercialmente nella forma necessaria per applicare i tipi di saggi eseguiti. I saggi *in vitro* sono stati applicati per valutare le interazioni tra NLGN4X e aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub>, ocratossina A, deossinivalenolo e gliotossina; tra acetilcolinesterasi (AChE) e aflatossina B<sub>1</sub>; tra  $\beta$ -secretasi (BACE 1) e aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub> e gliotossina. Inoltre si è provato anche ad eseguire saggi in fluorescenza statica per valutare l'interazione tra le micotossine e la monoammino ossidasi (MAO) B; purtroppo la proteina commercialmente è disponibile solo nella forma microsomiale e non è utilizzabile per i saggi applicati. I dettagli sperimentali sono descritti nel capitolo Materiali e Metodi.

#### 4.3.1. Saggi di Dot Blot

I saggi di Dot Blot sono stati applicati per valutare l'interazione tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub> e aflatossina B<sub>2</sub>, che sono fluorescenti intrinsecamente. Tuttavia, si sono riscontrate diverse problematiche nella messa a punto del saggio, in particolar modo nella rilevazione del segnale di fluorescenza che hanno indotto a sospendere l'applicazione della metodica.

#### 4.3.2. Saggi di fluorescenza statica

Come riportato nel Capitolo 7, sono stati eseguiti numerosi saggi di fluorescenza statica per valutare le interazioni tra le proteine selezionate e alcune delle 12 micotossine. I saggi sono effettuati titolando la proteina d'interesse con concentrazioni crescenti di micotossine.

La maggior parte dei saggi sono stati effettuati sulla NLGN4X, in quanto sia AChE che BACE 1 sono difficilmente reperibili commercialmente in una forma stabile per le misure di fluorescenza. Di seguito sono riportati i migliori dati ottenuti.

Lo spettro di fluorescenza nella Fig. 22 mostra la variazione della fluorescenza triptofanilica come conseguenza dell'aggiunta di concentrazioni crescenti di l'aflatossina B<sub>2</sub> in un range di concentrazione tra 10 nM e 500 nM. L'aggiunta della micotossina provoca una variazione dell'emissione di fluorescenza a 340 nm, in particolare si registra una diminuzione dell'emissione di fluorescenza dell'11%, suggerendo l'interazione tra NLGN4X e l'aflatossina B<sub>2</sub>.

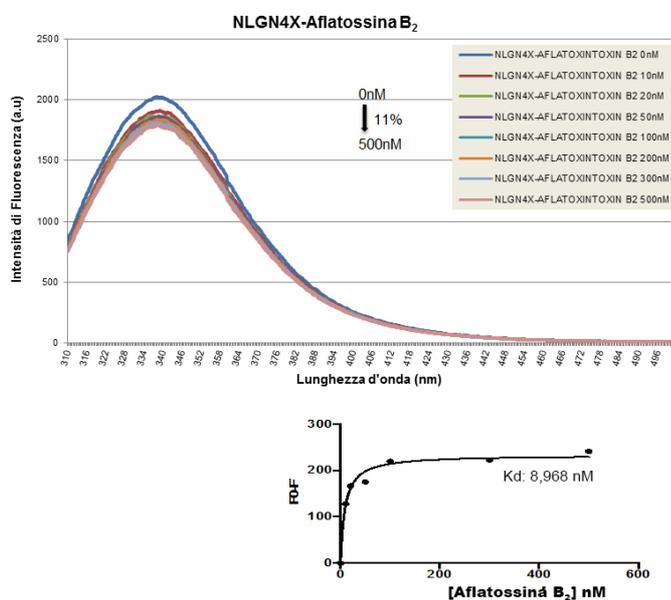


Fig. 22: Spettro di fluorescenza tra NLGN4X e aflatossina B<sub>2</sub>.

Mediante esperimenti di fluorescenza statica è stata valutata l'interazione tra NLGN4X e deossinivalenolo a concentrazioni di micotossina in un range compreso nell'ordine tra il nanomolare e il micromolare (0  $\mu$ M-20  $\mu$ M) (Fig. 23). Come conseguenza dell'aggiunta del deossinivalenolo si registra una variazione dell'intensità di fluorescenza dei triptofani del 17%. A 20  $\mu$ M si comincia ad osservare un effetto di saturazione.

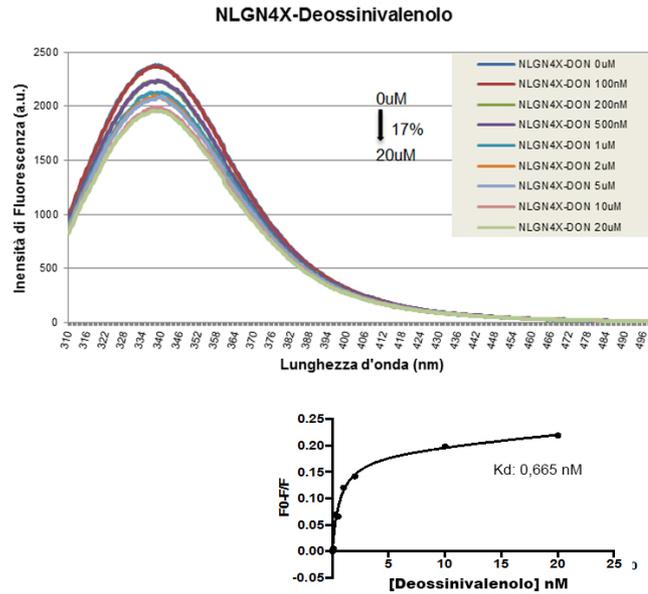


Fig. 23: Spettro di fluorescenza tra NLGN4X e deossivalenolo.

Lo spettro di fluorescenza tra la NLGN4X e la gliotossina valida l'interazione (Fig. 24). Già a concentrazione di micotossina pari a 100 nM si osserva una variazione dell'intensità di fluorescenza dei triptofani della proteina. Dalla curva di legame ottenuta riportando la variazione della fluorescenza in funzione della concentrazione della micotossina si ottiene un valore di  $K_d = 0,2673 \mu\text{M}$ .

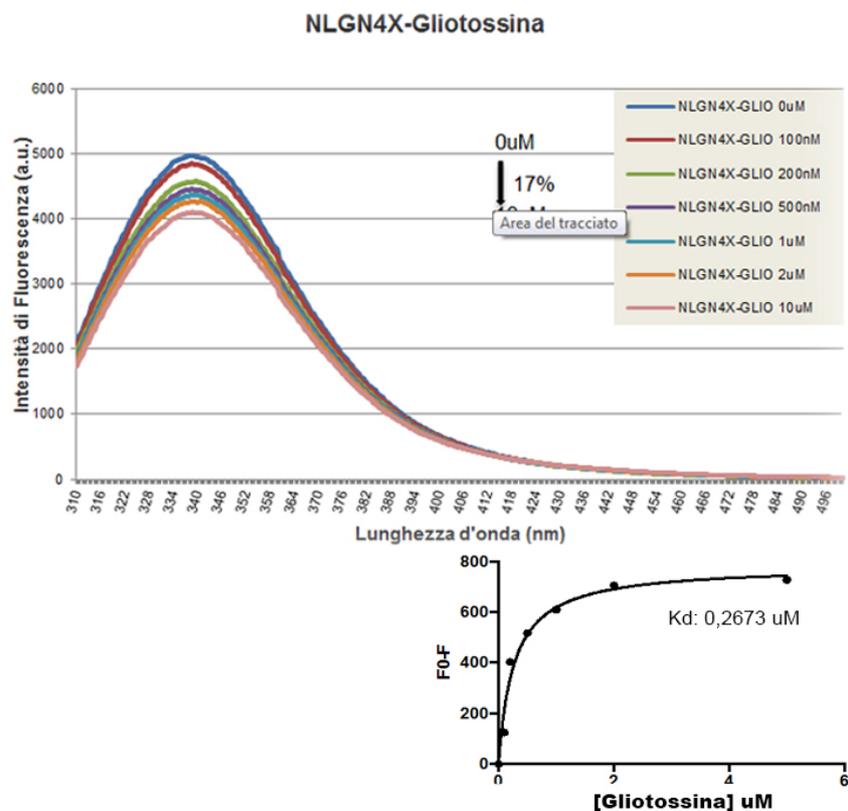


Fig. 24: Spettro di fluorescenza tra NLGN4X e gliotossina.

Lo spettro di fluorescenza tra NLGN4X e ocratossina A suggerisce l'interazione proteina-ligando e mostra un trasferimento di energia tra i residui di triptofano e l'ocratossina A, che presenta una sua fluorescenza intrinseca, tale fenomeno prende il nome di FRET (Trasferimento di Energia per Risonanza) (Fig. 25). Il fenomeno FRET si osserva in quanto all'aumentare della quantità di ocratossina A si registra un aumento del picco di fluorescenza a 448 nm. Allo scopo di confermare la presenza del fenomeno FRET come conseguenza dell'interazione tra proteina e micotossina, sono stati applicati saggi di fluorescenza risolta nel tempo riportati nei prossimi paragrafi.

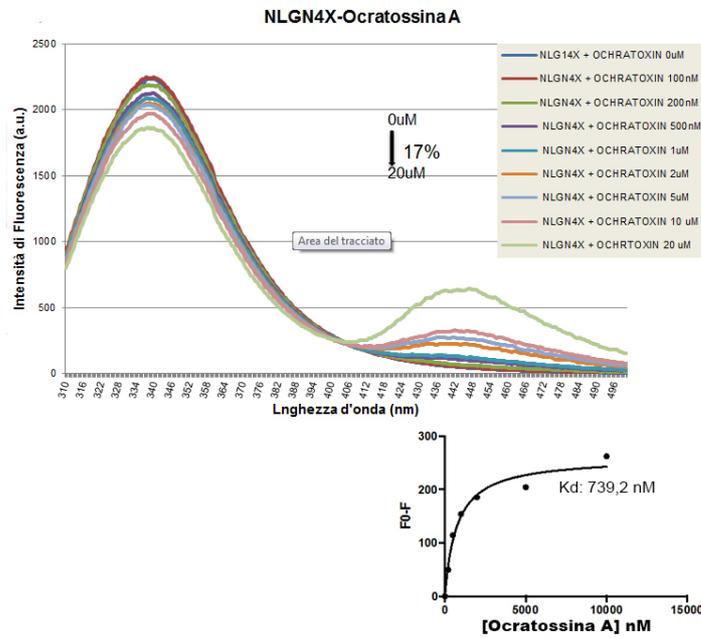
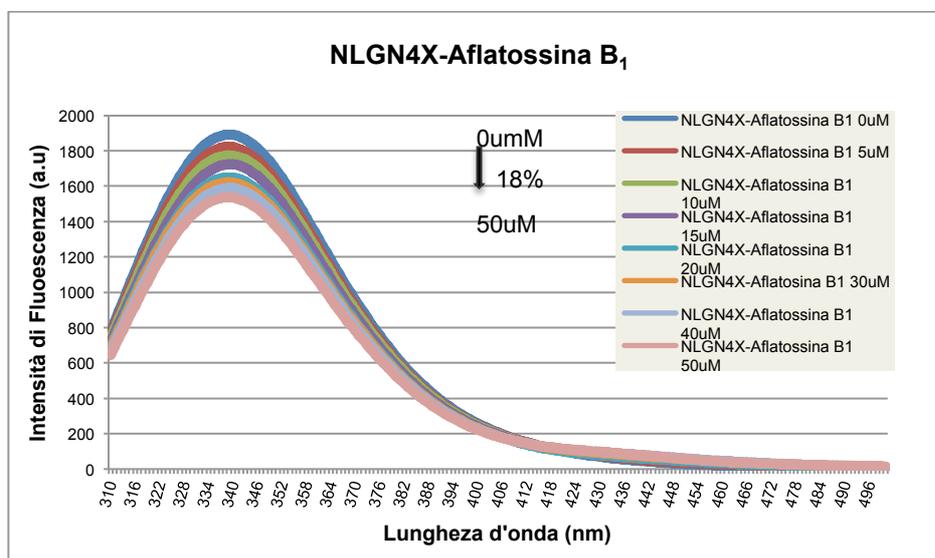
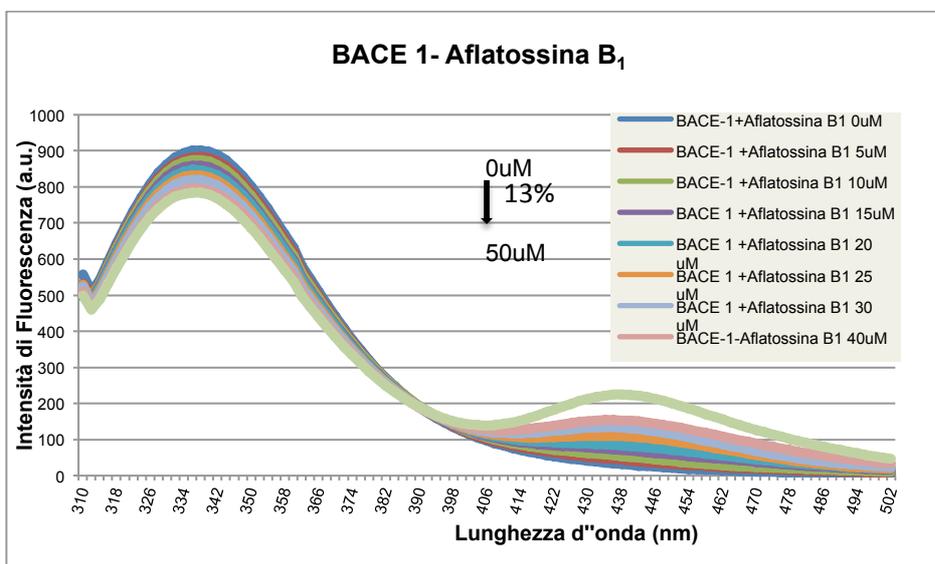


Fig. 25: Spettro di fluorescenza tra NLGN4X e ocratoxina A

L'interazione tra NLGN4X e aflatoxina B<sub>1</sub> non è stata confermata mediante il saggio di fluorescenza statica (Fig. 26). Il saggio è stato condotto titolando la NLGN4X a concentrazioni (nell'ordine dei micromolare) crescenti di aflatoxina B<sub>1</sub>, e il risultato mostra una riduzione del 18% del segnale di fluorescenza, paragonabile alla variazione associata alla titolazione della proteina con la stessa quantità di DMSO (dimetilsolfossido) utilizzato per la solubilizzazione della micotossina.



**Fig. 26:** Spettro di fluorescenza tra NLGN4X e aflatossina B<sub>1</sub>.  
 Nello spettro di fluorescenza tra BACE 1 e aflatossina B<sub>1</sub> si osserva una piccola variazione della curva di fluorescenza dei triptofani di BACE 1, che non indica l'esistenza del legame tra ligando e proteina (Fig. 27). Poiché la proteina non è stata più disponibile commercialmente, non è stato possibile ripetere i saggi modificando le condizioni sperimentali, pertanto non possiamo affermare con certezza che l'interazione non si verifichi.



**Fig. 27:** Spettro di fluorescenza tra BACE 1 e aflatossina B<sub>1</sub>.

Lo spettro d'interazione tra BACE 1 e aflatossina B<sub>2</sub> non conferma l'interazione tra proteina e ligando. Si osserva una variazione dell'intensità di fluorescenza

dell'afatossina B<sub>2</sub>, che presenta fluorescenza intrinseca, all'aumentare della sua concentrazione. Viceversa l'intensità di fluorescenza dei triptofani della proteina resta invariata (Fig. 28).

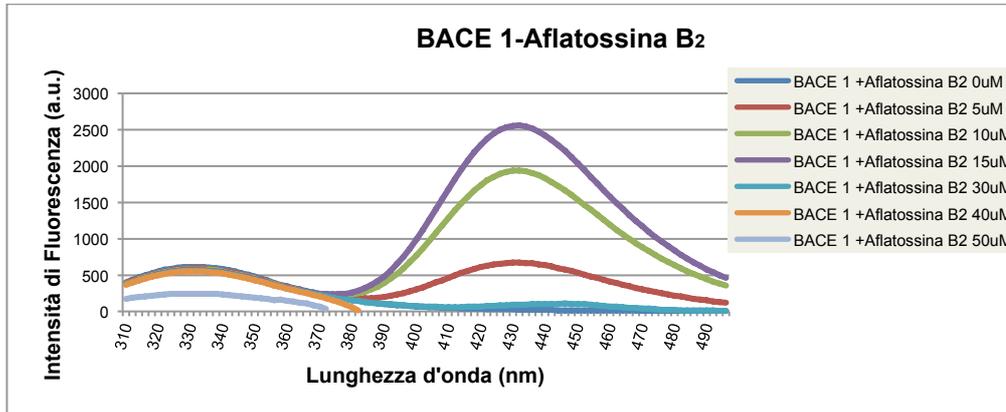


Fig. 28: Spettro di fluorescenza tra BACE 1 e aflatossina B<sub>2</sub>.

La Fig. 29 mostra lo spettro tra emissione di fluorescenza di BACE 1 e aggiunte graduali di gliotossina. Il risultato mostra che non c'è nessuna variazione del segnale di fluorescenza triptofanilica, nemmeno a concentrazioni alte della micotossina. Il risultato suggerisce pertanto che non c'è interazione tra proteina e ligando.

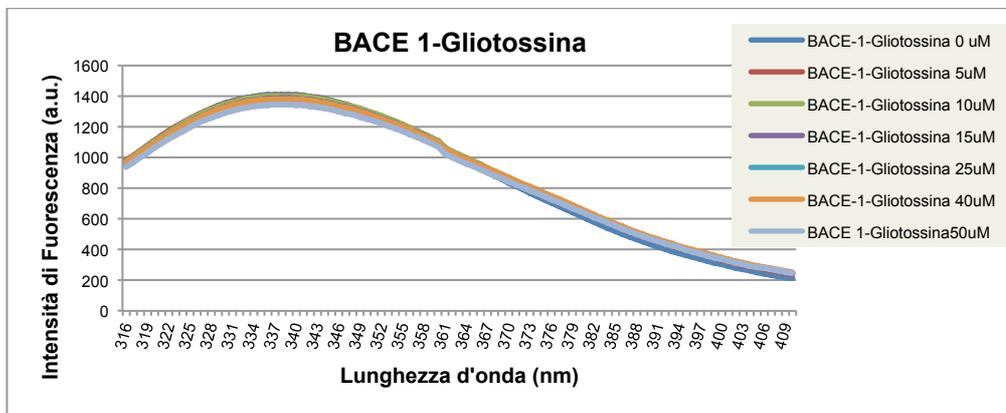


Fig. 29: Spettro di fluorescenza tra BACE 1 e gliotossina.

Dallo spettro di fluorescenza tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub> non si evince l'interazione tra proteina e ligando (Fig. 30). Il risultato induce a pensare a una precipitazione della proteina già quando si titola con 3  $\mu$ M di aflatossina B<sub>1</sub>. Poiché la proteina non è stata più disponibile commercialmente nella forma utile per i saggi, non è stato possibile effettuarne altri in differenti condizioni sperimentali. Pertanto il legame non è del tutto escluso.

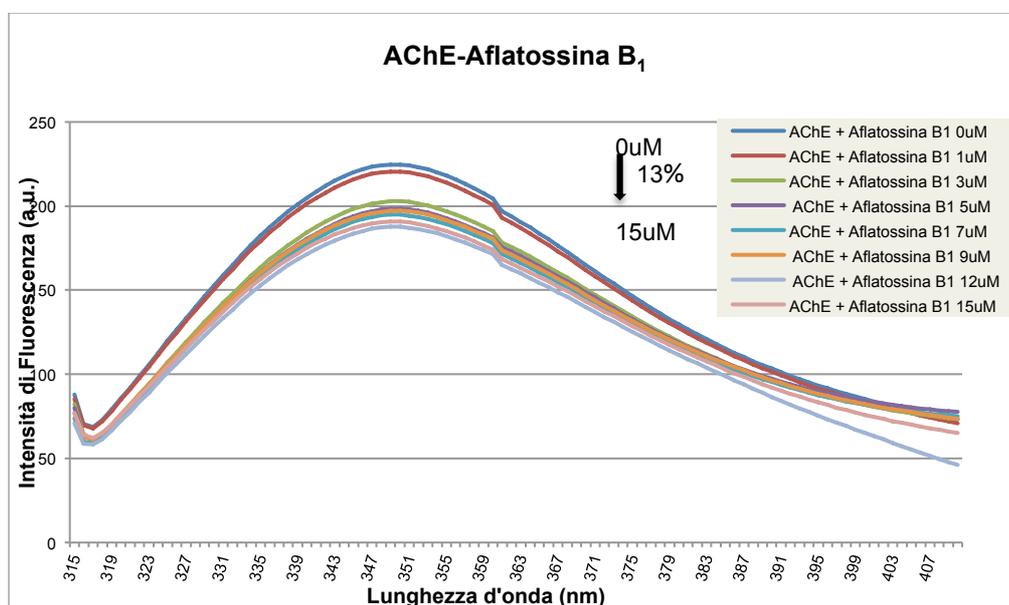


Fig. 30: Spettro di fluorescenza tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub>.

Quindi, tramite saggi di fluorescenza statica, sono state validate le interazioni proteina-ligando tra NLGN4X e aflatossina B<sub>2</sub>, deossinivalenolo, gliotossina e ocratossina A, mentre non si verifica l'interazione tra NLGN4X e aflatossina B<sub>1</sub>, tra BACE 1 e gliotossina, aflatossina B<sub>2</sub> e aflatossina B<sub>1</sub> e tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub>. Nella Tab. 6, sono riportati i valori di K<sub>d</sub> delle interazioni che sono state validate mediante questi saggi.

Tabella 6. K<sub>d</sub> delle interazioni tra Neuroligina 4X e micotossine.

INTERAZIONE PROTEINA-LIGANDO	K <sub>d</sub>
NLGN4X- Aflatossina B <sub>2</sub>	8,968 nM
NLGN4X- Deossinivalenolo	665 nM
NLGN4X- Gliotossina	267,3 nM
NLGN4X- Ocratossina A	739,2 nM

#### 4.3.3. Risultati saggi di fluorescenza risolta nel tempo

Il saggio di fluorescenza statica condotto tra NLGN4X e ocratossina A suggerisce che tra triptofani della proteina e il ligando, fluorescente, ci possa essere un fenomeno di FRET. Per verificare la presenza di questo fenomeno in questa interazione sono stati applicati saggi di fluorescenza risolta nel tempo. La presenza di un fenomeno di FRET permette di ottenere informazioni più dettagliate sul sito di legame della proteina poichè esso si manifesta solo se nel legame è coinvolto un triptofano a una

distanza dal ligando compresa tra 10 Å e 50 Å. I protocolli applicati sono riportati nel capitolo Materiali e metodi e i risultati ottenuti sono mostrati negli spettri che seguono. Lo spettro nella Fig. 31 riporta il segnale di fluorescenza dei triptofani (inteso come numero di fotoni emessi) di NLGN4X in funzione del tempo, misurata titolando la soluzione proteica a concentrazioni differenti di ocratossina A. Il fenomeno di FRET si evince quando vi è un cambiamento nel tempo di emissione di fluorescenza. In questo caso, ad ogni titolazione il numero di fotoni emessi resta stabile nel tempo e graficamente si osservano le curve sovrapposte. La pendenza della curva ci permette di confermare che, pur non avvenendo un fenomeno di FRET, l'interazione avviene. Pertanto ciò che osserviamo nei saggi di fluorescenza statica potrebbe essere nient'altro che l'aumento del segnale di fluorescenza intrinseca del ligando all'aumentare della sua concentrazione.

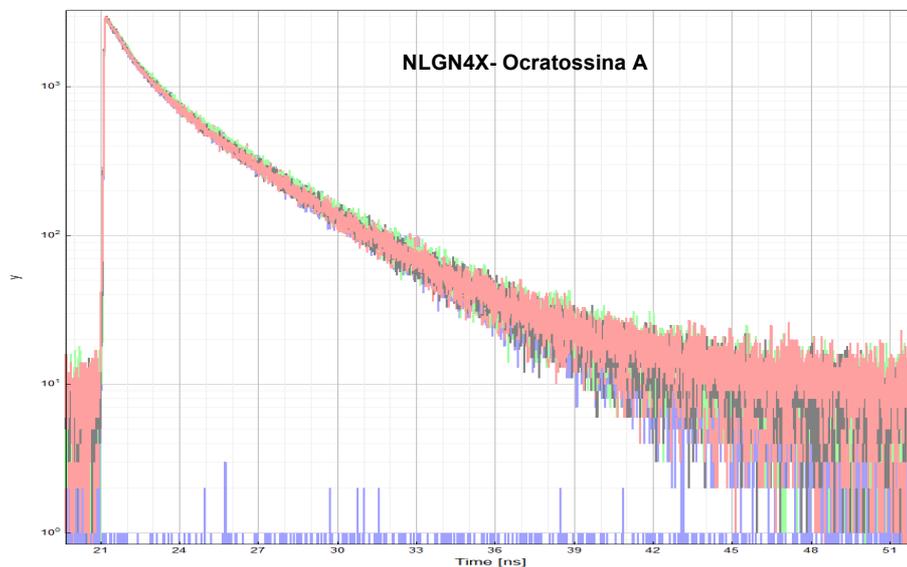


Fig. 31: Spettro di fluorescenza risolto nel tempo tra NLGN4X e ocratossina A.

La Fig. 32 mostra lo spettro di fluorescenza risolto nel tempo tra NLGN4X e aflatoxina B<sub>2</sub>. Anche in questo caso le curve di fluorescenza si sovrappongono al variare della concentrazione, pertanto si conferma l'interazione, ma non si osserva nessun fenomeno di trasferimento di energia.

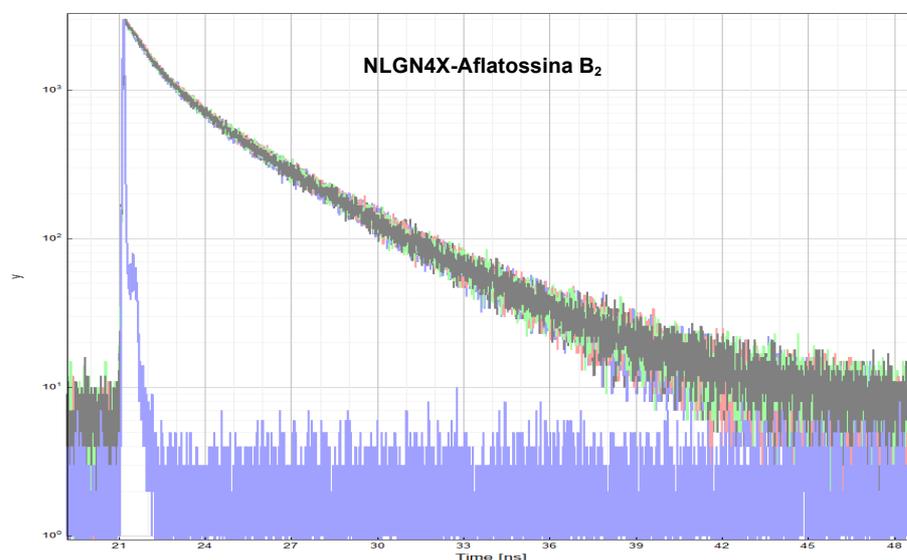


Fig. 32: Spettro di fluorescenza risolta nel tempo tra NLGN4X e aflatoxina B<sub>2</sub>.

Il saggio di fluorescenza risolta nel tempo applicato tra NLGN4X e deossinivalenolo è stato applicato per verificare l'interazione tra proteina e ligando e per individuare un possibile cambiamento conformazionale nella proteina. Non ci si aspetta un fenomeno di FRET in questo caso perché il ligando non è fluorescente. La pendenza della curva conferma l'interazione, ma non è possibile delineare nessun cambiamento conformazionale dopo che il legame è avvenuto (Fig. 33).

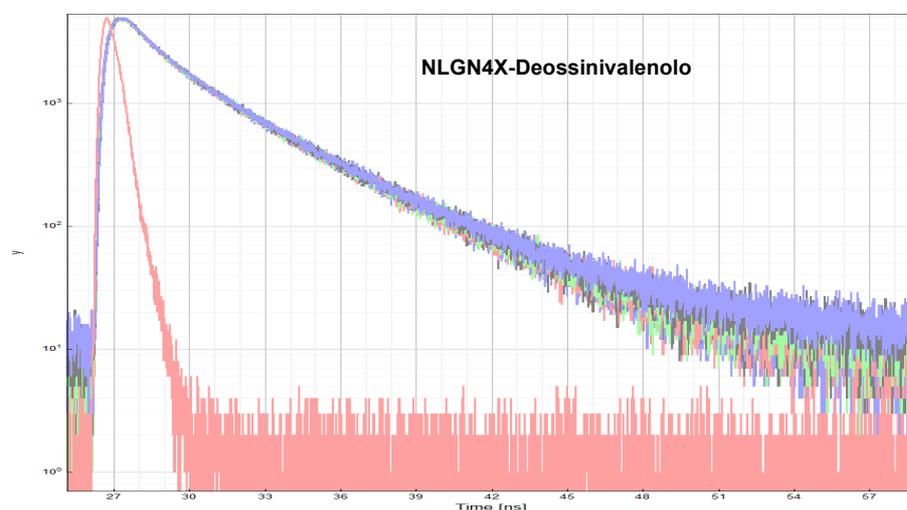


Fig. 33 Spettro di fluorescenza risolta nel tempo tra NLGN4X e deossinivalenolo.

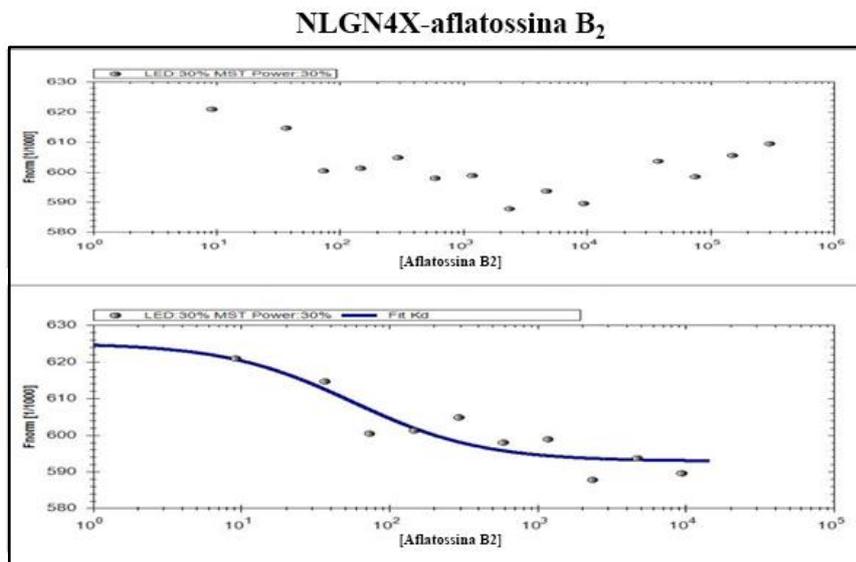
Infine i saggi di anisotropia condotti parallelamente, come descritto nel capitolo 7, non hanno dato risultati significativi. Questo è dovuto a problemi riscontrati nella messa a punto del saggio.

#### 4.3.4. Risultati dei saggi di Termoforesi su Microscala

Un'ulteriore verifica dell'interazione tra proteine e ligandi selezionati è stata fatta applicando saggi di Termoforesi su Microscala di cui nel capitolo di Materiali e metodi sono riportati i dettagli del protocollo. I saggi sono stati eseguiti in presenza di un tecnico esperto della NanoTemper che ha messo a disposizione lo strumento utilizzato (Monolith NT, LabelFree). Ogni saggio è stato replicato, ma purtroppo per i saggi con risultati dubbi non sono state effettuate ulteriori repliche per la mancanza di ulteriore disponibilità dello strumento.

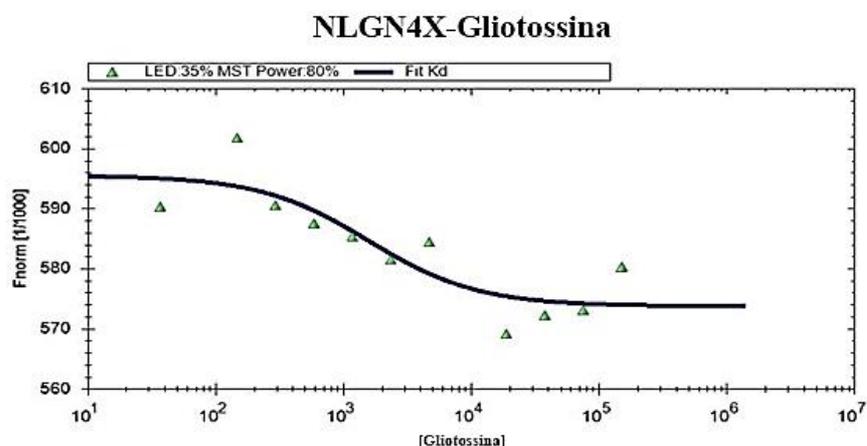
Con il software utilizzato durante la misura vengono messi in correlazione, in un grafico, l'intensità di fluorescenza con la concentrazione del ligando. Riportando i valori di fluorescenza in funzione della concentrazione si ottiene una curva di legame dalla quale è possibile calcolare la costante di dissociazione. Di seguito sono riportati e discussi tutti i risultati ottenuti dai saggi di Termoforesi su Microscala.

La Fig. 34 riporta la curva di legame ottenuta mettendo in correlazione l'intensità di fluorescenza dei triptofani di NLGN4X con concentrazioni crescenti di aflatossina B<sub>2</sub>; l'andamento bifasico suggerisce la presenza di due siti di legame per il ligando sulla proteina. Pertanto si hanno due costanti d'inibizione, uno nell'ordine del micromolare e l'altro nell'ordine del nanomolare. La K<sub>d</sub> calcolata risulta essere pari a **56.6 ± 7.38 nM**.



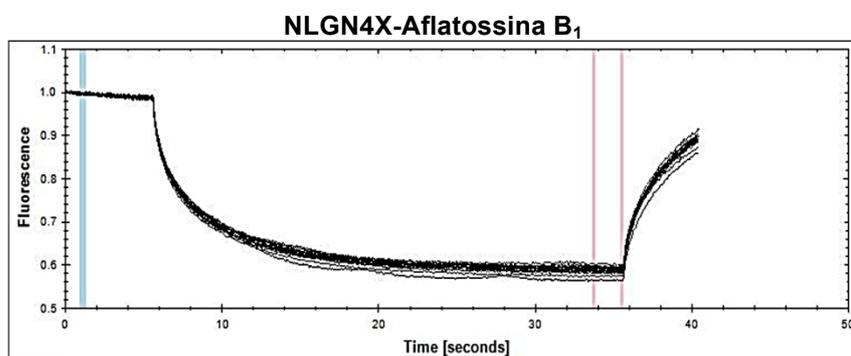
**Fig. 34:** Curva di legame ottenuta nel saggio di MST per verificare l'interazione tra NLGN4X e aflatossina B<sub>2</sub>. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione del ligando in scala logaritmica; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata (fluorescenza con lampada IR accesa/ fluorescenza con lampada IR spenta)

L'interazione tra NLGN4X con la gliotossina si conferma anche con il saggio di MST (Fig. 35). La K<sub>d</sub> calcolata è di **1.52 ± 0,254 μM**.



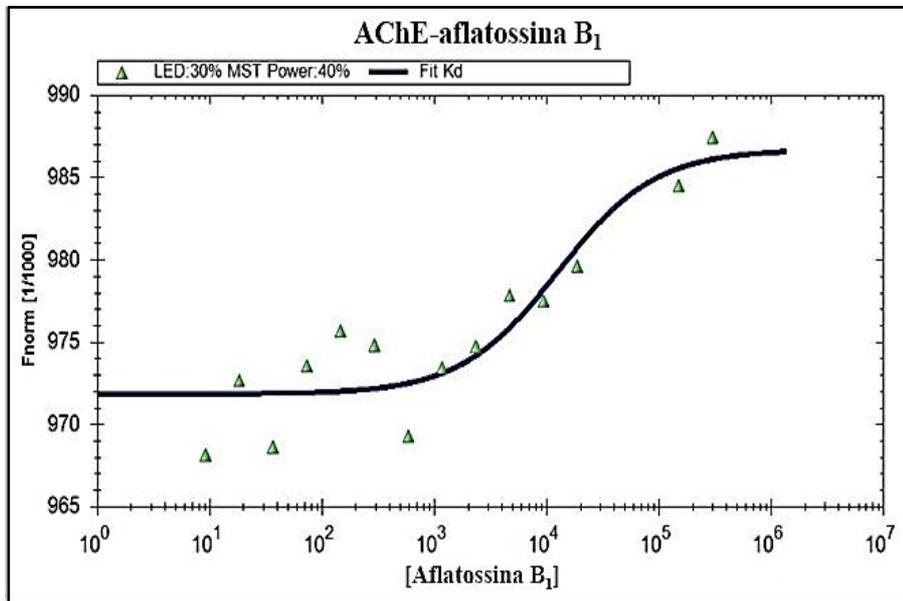
**Fig. 35:** Curva di legame ottenuta nel saggio di MST per verificare l'interazione tra NLGN4X e gliotossina. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione del ligando in scala logaritmica; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata (fluorescenza con lampada IR accesa/ fluorescenza con lampada IR spenta).

Dal saggio di MST per verificare il legame tra NLGN4X e aflatossina B<sub>1</sub> è stato ottenuto un grafico che mostra la variazione di fluorescenza dei triptofani di NLGN4X in funzione del tempo, al variare della concentrazione dell'aflatossina B<sub>1</sub> (Fig. 36). Le curve di termoforesi mostrano dei segnali inconsueti, tali che non è stato possibile ottenere la curva di legame e di conseguenza la K<sub>d</sub> non è stata calcolata. Come riportato precedentemente nemmeno con i saggi di fluorescenza statica è stato possibile validare tale interazione.



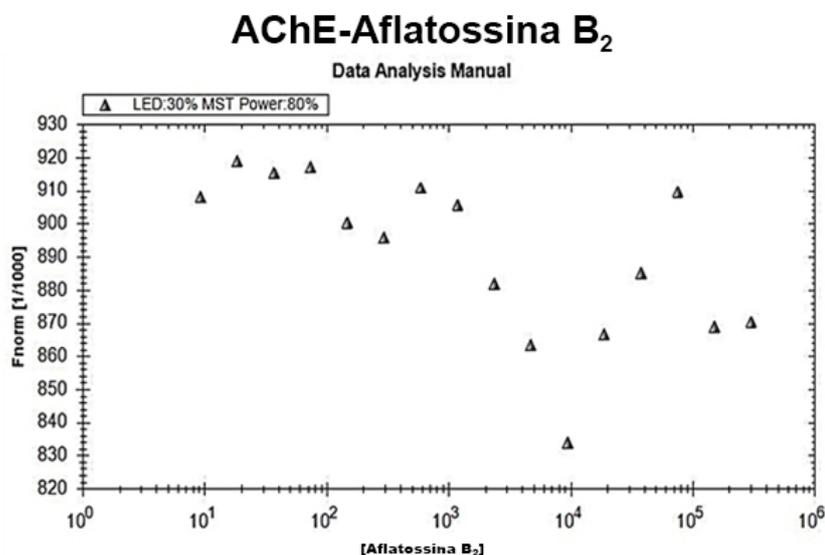
**Fig. 36:** Variazione della fluorescenza dei triptofani della NLGN4X nel tempo in presenza di aflatossina B<sub>1</sub>. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo in secondi; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza.

La curva di legame tracciata tra i punti di correlazione tra Fluorescenza dei Triptofani dell'AChE e la micotossina permette di calcolare la K<sub>d</sub> che risulta  $8.4 \pm 0,694 \mu\text{M}$  (Fig. 37). Il legame tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub> è validato in questo saggio.



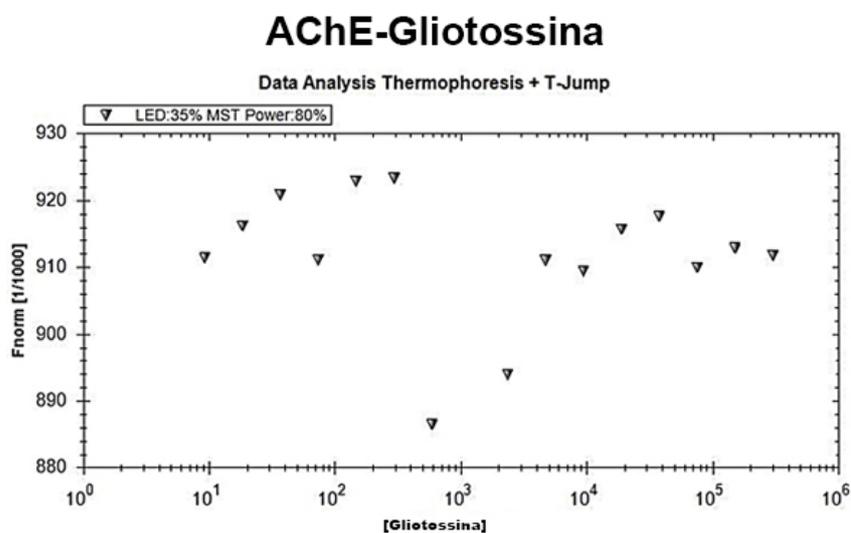
**Fig. 37:** Curva di legame ottenuta nel saggio di MST per verificare l'interazione tra AChE e aflatossina B<sub>2</sub>. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione del ligando in scala logaritmica; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata (fluorescenza con lampada IR accesa/ fluorescenza con lampada IR spenta).

Per l'interazione tra AChE e aflatossina B<sub>2</sub>, le condizioni sperimentali non hanno permesso di estrapolare delle curve di legame (Fig. 38). Pertanto tale interazione non è stata validata, ma non si può nemmeno escludere dal momento che si mostra comunque una variazione di segnale superiore all'errore sperimentale.



**Fig. 38:** Plot dei valori di fluorescenza dei triptofani di AChE in funzione della concentrazione della aflatossina B<sub>2</sub>. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione del ligando in scala logaritmica; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata (fluorescenza con lampada IR accesa/ fluorescenza con lampada IR spenta).

Analogamente, anche i dati ottenuti tra l'AChE e la gliotossina non rivelano nessuna interazione, anche se non è possibile escluderla del tutto (Fig. 39).



**Fig. 39:** Plot dei valori di fluorescenza dei triptofani di AChE in funzione della concentrazione della gliotossina. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione del ligando in scala logaritmica; sull'asse delle ordinate è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata (fluorescenza con lampada IR accesa/ fluorescenza con lampada IR spenta).

Tutti i risultati sono riassunti nella Tab. 7, riportata di seguito.

**Tabella 7:** Riassunto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di Termoforesi su Microscala.

MOLECOLA FLUORESCENTE	FLUOROFORO	LIGANDO	KD MISURATA
NLGN4X	Triptofano	Aflatossina B <sub>1</sub>	Il legame non avviene
NLGN4X	Triptofano	Aflatossina B <sub>2</sub>	56,6 nM ± 7,38 nM
NLGN4X	Triptofano	Gliotossina	152 μM ± 0,254 μM
AChE	Triptofano	Aflatossina B <sub>1</sub>	8,4 μM ± 0,694 μM
AChE	Triptofano	Aflatossina B <sub>2</sub>	Il legame non è confermato
AChE	Triptofano	Gliotossina	Il legame non è confermato

#### 4.4. Conclusioni sul possibile coinvolgimento delle micotossine nell'eziologia dell'autismo

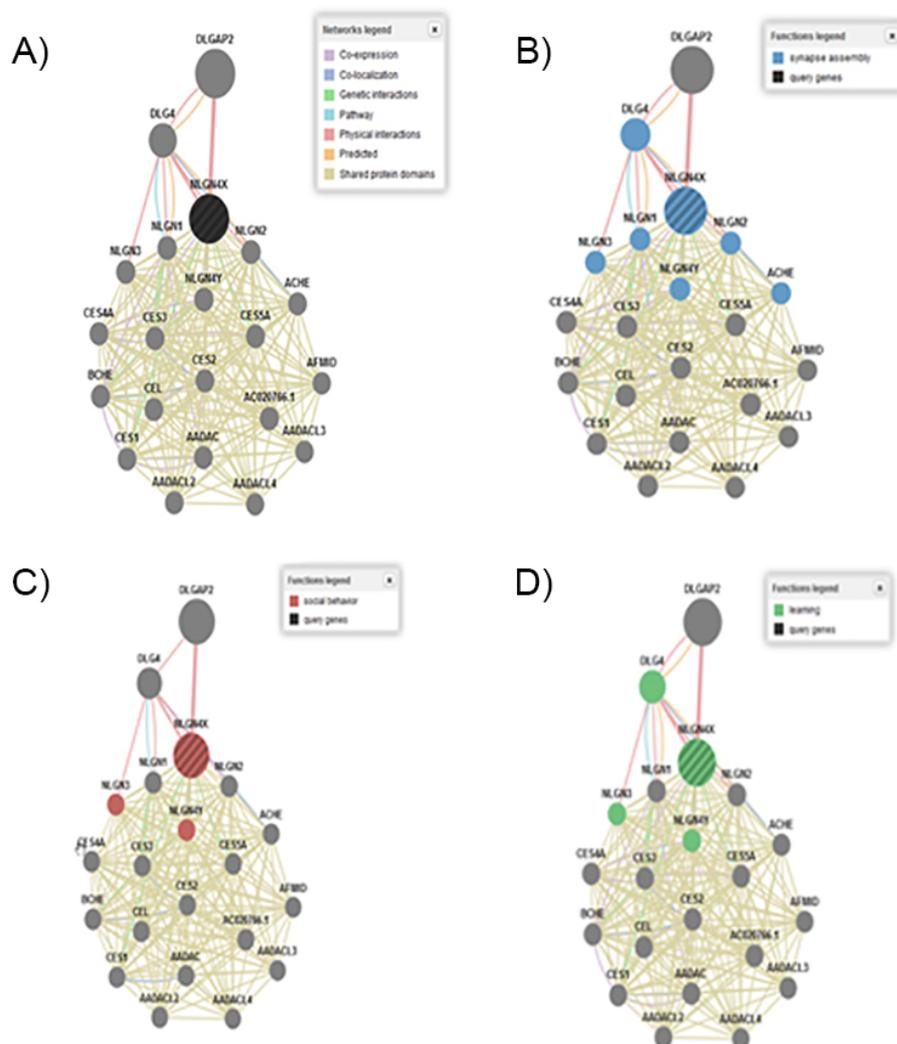
L'autismo è una patologia dall'eziologia ancora incerta e si ritiene che, oltre ad una componente genetica, anche i fattori ambientali potrebbero giocare un ruolo nella sua insorgenza. I disturbi GI associati ai bambini autistici hanno portato ad avanzare ipotesi che attribuiscono un ruolo dell'apparato GI all'eziogenesi dell'autismo, ritenendo che in molti pazienti vi sia un'alterata permeabilità intestinale che permette l'ingresso di xenobiotici, che potrebbero colpire il SNC e promuovere lo sviluppo della patologia.

Le micotossine sono contaminanti alimentari presenti ubiquitariamente e il consumo di svariati alimenti, in particolare quelli derivanti da cereali e latte, espone le persone all'assunzione di micotossine in quantità basse ma costanti, con potenziali effetti di accumulo nell'organismo. Per identificare possibili targets proteici umani per le micotossine che sono già espressi nel cervello o coinvolti in patologie cerebrali, è stato applicato un approccio multidisciplinare. Mediante il docking inverso sono stati selezionati 16 possibili targets proteici e le interazioni sono state studiate prima mediante un approccio di docking molecolare e poi mediante saggi *in vitro*. Gli studi di docking molecolare hanno confermato alcune interazioni previste nel docking inverso e hanno permesso di ipotizzare il possibile sito di legame che le micotossine hanno sui bersagli proteici selezionati.

Le interazioni che mostrano una buona energia di legame e un elevato numero di pose nel cluster sono: monoammino ossidasi B con deossinivalenolo e gliotossina; membro C3 delle Aldochetoreduttasi della famiglia 1 con aflatossina B<sub>2</sub> e aflatossicololo; tanchirasi 2 e aflatossina M<sub>1</sub>, e aflatossina B<sub>2</sub>; β-secretasi con gliotossina; nicotinammide N-metiltransferasi con α-zeraralanolo e β-zeraralanolo; acetilcolinesterasi con aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub> e gliotossina; neurologina 4X con aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub>, gliotossina, ocratossina A e deossinivalenolo.

Le interazioni tra acetilcolinesterasi e aflatossina B<sub>1</sub>, gliotossina e aflatossina B<sub>2</sub>, tra β-secretasi e aflatossina B<sub>1</sub>, gliotossina e aflatossina B<sub>2</sub> e tra neurologina 4X con aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub>, gliotossina, ocratossina A e deossinivalenolo sono state testate mediante saggi *in vitro*. I risultati ottenuti confermano in tutti i saggi il legame tra le micotossine e la neurologina 4X di cui è già noto un possibile

coinvolgimento nell'eziologia dell'autismo e il saggio di MST valida l'interazione tra acetilcolinesterasi e aflatoossina B<sub>1</sub>. Questi risultati andranno ulteriormente approfonditi per valutare l'effetto che le micotossine hanno su tali bersagli proteici. Si può ipotizzare che l'interazione tra micotossine e NLGN4X potrebbe alterare il corretto funzionamento della proteina e alterare le vie di segnalazione in cui essa è coinvolta, che comprendono tra le altre l'interazione sociale e lo sviluppo del linguaggio (Fig. 40), riconosciute come alterate nei soggetti autistici.



**Fig. 40:** Pathways di interazione della NLGN4X ottenuti da GeneMANIA. A) rappresentazione del network di interazione della NLGN4X, in cui è presente anche AChE; B) in blu sono evidenziate le proteine coinvolte nel pathway di assemblaggio delle sinapsi; C) in rosso sono evidenziate le proteine coinvolte nel pathway di sviluppo delle interazioni sociali; D) in verde sono evidenziate le proteine coinvolte nel pathway dello sviluppo dell'apprendimento.

## Capitolo 5. Studio dei meccanismi molecolari a cui prendono parte gli antiossidanti

### 5.1 Ricerca di possibili targets proteici per gli antiossidanti mediante un approccio di docking inverso

Nel terzo capitolo sono state descritte le molecole antiossidanti selezionate per il presente progetto. Tutte queste molecole sono presenti nelle mele, in particolare sono quelli presenti negli estratti polifenolici della mela "Annurca" [Mari et al., 210] tranne il  $\beta$ -carotene, il resveratrolo, il solforafano e il mioinositolo che sono stati aggiunti perché sono abbondanti nei vegetali e in letteratura esistono numerosi studi sul loro effetto sulla salute umana.

Gli antiossidanti su cui ci si è concentrati sono in totale 18 e per ognuno di essi sono stati identificati possibili targets proteici mediante un approccio di docking inverso. idTarget ha restituito per ogni antiossidante migliaia di possibili bersagli proteici tra tutte le strutture proteiche presenti nella banca dati PDB (<http://www.rcsb.org>) e di queste, come descritto nei metodi, solo le prime 20 sono state selezionate sulla base della migliore energia di legame. Lo scopo dello studio è stato quello di individuare targets proteici umani per comprendere i meccanismi molecolari mediante cui queste molecole esercitano il loro effetto benefico sulla salute umana e pertanto è stato stilato un protocollo per la selezione di soli bersagli proteici umani, analogamente a quanto fatto per la selezione dei targets delle micotossine descritto nel Capitolo 3 [Scafuri et al., 2015].

Dai 20 targets sono stati selezionati tutti quelli umani, mentre per quelli non umani sono state ricercate strutture omologhe umane e quando disponibili sono state sostituite.

Le strutture non umane sostituite sono:

- 2ZRU (Isopentenil-difosfato delta-isomerasi) di *Sulfolobus shibatae*, selezionato per la cianidina-3-O-galattoside, sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 2ICK);
- 3KVG (Proteina Heat shock 70KDa 1A/1B) di *Cryptosporidium parvum Iowa II* individuato come target per il mioinositolo, sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 3ATV);
- 1XCL (Guanidinacetato N-metiltransferasi) di *Rattus norvegicus*, target di florizina, iperina e isoquercitrina, sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 3ORH);
- 1HQT (Aldeide reduttasi) di *Sus Scrofa*, selezionato per la quercetina e il resveratrolo, sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 4LB4);
- 2YVK (Metiltioribosio-1-fosfato-isomerasi) di *Bacillus subtilis*, anch'essa selezionata per il resveratrolo, che è stata sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 4LDQ);
- 2ZB3 (Prostaglandina 2) di *Mus Musculus*, un target individuato per la quercetina, sostituita con la struttura omologa umana (codice PDB: 2ZB4).

Anche le seguenti strutture proteiche mutate sono state sostituite con strutture wild type:

- 4OBE (GTPasi KRas) sostituisce 3GFT (target individuato per la catechina e la cianidina 3-O-galattoside), che ha una mutazione Q61H coinvolta nel carcinoma polmonare [Kalnine et al., 2003];
- 2MMC (Proteina Ran nucleare legante GTP) sostituisce 3EA5 (target per la cianidina-3-O-galattoside), che ha una mutazione A181C [Forwood et al., 2008].
- 3BUV (Aldo-chetoreduccasi famiglia 1 membro D1) sostituisce 3BUR (target per la Procianidina B<sub>2</sub>), che ha due mutazioni: Y58F e I120A che possono avere effetti sulla catalisi enzimatica [Di Costanzo et al., 2008].

Per tutte le strutture umane selezionate dopo la ricerca di omologhe e di wild type è stato fatto un controllo della loro integrità e risoluzione come riportato dettagliatamente nei Metodi.

Alla fine della selezione abbiamo ottenuto almeno due possibili targets proteici umani per ogni antiossidante, come riportato nella Tab. 8.

**Tabella 8:** Targets proteici selezionati per 18 molecole antiossidanti.

ANTIOSSIDANTE	NOME DELLA PROTEINA	CODICE PDB
Acido clorogenico	Proteina Rho GTPasi attivante le proteine	1GRN
	GTPasi HRas	3K8Y
	D-amminoacido ossidasi	3ZNN
	GTPasi KRas	4OBE
Avicularina	Ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi	1BZY
	Uridina 5'-monosfato sintasi	2QCG
Beta-Carotene	D-amminoacido ossidasi	3ZNN
	Monoammino-ossidasi B	2BK3
[+]-Catechina	Proteina Rap 1A correlata a Ras	1C1Y
	Proteina nucleare Ran legante GTP	2MMC
	GTPasi HRas	3K8Y
	GTPasi KRas	4OBE
Cianidina-3-O-galattoside	Proteina Rap 1A correlata a Ras	1C1Y
	ARL8A	1ZD9
	Isopentil-difosfato delta isomerasi	2ICK
	Proteina nucleare Ran legante GTP	2MMC
	Idrossiacido ossidasi 1	2RDU
	GTPasi KRas	4OBE
[-]-Epicatechina	Metalloproteinasi di matrice 16	1RM8
	GMP reductasi 2	2C6Q
	Uridina 5'-monofosfato sintasi- dominio orotidina 5'-monofosfato decarbossilasi	2QCG
	Membro 1 della famiglia 1B delle Sulfotransferasi citosoliche	2Z5F
Iperina	Istone demetilasi 1 lisina specifico	2IW5
	Ornitina amminotransferasi	2OAT
	Guanidinacetato N-metiltransferasi	3ORH
Isoquercitina	Ornitina amminotransferasi	2OAT
	Guanidinacetato N-metiltransferasi	3ORH
Florizina	Eparan-solfato glucosammina 3-O-sulfotransferasi1	1ZRH
	Dinamina 1	2X2E
	Proteina Heat Shock 70kDa 1A	3ATV
	L-Xilulosio reductasi	3D3W
	Guanidinacetato N-metiltransferasi	3ORH

Mioinositolo	Proteina Heat shock 70kDa 1A	3ATV
	Istone demetilasi 1 lisina specifico	2IW5
Procianidina B <sub>1</sub>	Renina	2G1Y
	Catena leggera del Fattore X	3KL6
Procianidina B <sub>2</sub>	3-oxo-5-beta-steroido-4-deidrogenasi	3BUV
	Leucotriene A-4-idrolasi	3FUN
Quercetina	Proteina chinasi 14 mitogeno attivata	1WBS
	Uridina 5'-monofosfato sintasi- dominio orotidina 5'-monofosfato decarbossilasi	2QCG
	Aldeide riduttasi	4LB4
Quercitrina	Ipxantina-guanina fosforibosiltransferasi	1BZY
	Prostaglandina riduttasi 2	2ZB4
Reinourtrina	Ornitina amminotransferasi	2OAT
	Prostaglandina riduttasi 2	2ZB4
Resveratrolo	Aldeide riduttasi	4LB4
	Membro 1 della famiglia 1 B delle Sulfotransferasi citosoliche	2Z5F
	Metil-rbosio 1 fosfato isomerasi	4LDQ
	Dinamina 1	2X2E
Rutina	Monoammino ossidasi B	2BK3
	Arginina N-metiltransferasi 3	2FYT
	Istone demetilasi 1 lisina specifico	2IW5
	Ornitina amminotransferasi	2OAT
	Prostaglandina riduttasi 2	2ZB4
	Guanidinacetato N-metiltransferasi	3ORH
Solforafano	Tanchirasi 2	3MHK
	Istone N-metiltransferasi; H3 lisina 9 specifico 5	2RFI

Dalla lista emerge che questi antiossidanti, pur avendo tra loro una struttura chimica differente, hanno molti targets comuni, come avviene ad esempio per l'isoquercitrina e la florizina, i cui bersagli proteici individuati sono l'ornitina amminotransferasi e la guanidinacetato N-metiltransferasi. Si nota inoltre che, per la [+]-Catechina, tutti i targets individuati sono proteine Ras-correlate.

## 5.2. Analisi delle interazioni proteina-ligando mediante docking molecolare

### 5.2.1. Risultati del docking molecolare sull'intera superficie proteica

Per l'interazione tra gli antiossidanti e i targets proteici selezionati è stato applicato un approccio di docking molecolare, settando la griglia sia sull'intera superficie proteica, sia solo sul sito di legame in presenza del cofattore/ioni (quando presenti) e senza il cofattore/ioni. Il docking applicato sull'intera superficie proteica ha permesso di individuare tasche di legame per gli antiossidanti lontane dai siti canonici di legame e questo ha consentito di non escludere a priori le interazioni che avvengono con una buona energia di legame predetta in siti di legame "non canonici" della proteina.

Tutti i risultati dei docking sull'intera superficie proteica sono riportati nella Tab. 9.

**Tabella 9:** Risultati delle simulazioni di interazione tra antiossidanti e i loro targets proteici selezionati mediante docking inverso.

**Ligando: Acido Clorogenico**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
1GRN	Proteina Rho GTPasi attivante le proteine	<b>Conformazione:</b> 94 <b>Energia di legame:</b> -6,09 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> Parzialmente  <b>Conformazione:</b> 100 <b>Energia di legame:</b> -4,83 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 5 <b>Sito di legame:</b> NO
3K8Y	GTPasi HRas	<b>Conformazione:</b> 16 <b>Energia di legame:</b> -11,65 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 5 <b>Sito di legame:</b> NO  <b>Conformazione:</b> 59 <b>Energia di legame:</b> -9,72 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 9 <b>Sito di legame:</b> Parzialmente
3ZZN (Catena A)	D-amminoacido ossidasi	<b>Conformazione:</b> 23 <b>Energia di legame:</b> -8,16 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> SI
4OBE (Catena B)	GTPasi KRas	<b>Conformazione:</b> 35 <b>Energia di legame:</b> -6,10 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando: Avicularina**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
1BZY (Catena A)	Ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi	<b>Conformazione:</b> 59 <b>Energia di legame:</b> -6,55 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> SI
2QCG	Uridina 5'-monofosfato sintasi-dominio orotidina 5'-monofosfato decarbossilasi	<b>Conformazione:</b> 56 <b>Energia di legame:</b> -6,65 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 10 <b>Sito di legame:</b> NO  <b>Conformazione:</b> 64 <b>Energia di legame:</b> -6,57 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 11 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando:  $\beta$ -Carotene**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2BK3 (Catena A)	Monoammino-ossidasi B	<b>Conformazione: 30</b> <b>Energia di legame: -10,06 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 8</b> <b>Sito di legame: NO</b>
		<b>Conformazione: 31</b> <b>Energia di legame: -8,31 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 12</b> <b>Sito di legame: NO</b>
3ZNN	D-amminoacido ossidasi	<b>Conformazione: 48</b> <b>Energia di legame: -9,25 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 6</b> <b>Sito di legame: NO</b>
		<b>Conformazione: 9</b> <b>Energia di legame: -8,75 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 17</b> <b>Sito di legame: NO</b>

**Ligando: [+]-Catechina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
1C1Y (Conf.A)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	<b>Conformazione: 85</b> <b>Energia di legame: -6,84 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 5</b> <b>Sito di legame: SI</b>
		<b>Conformazione: 51</b> <b>Energia di legame: -5,90 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 15</b> <b>Sito di legame: NO</b>
1C1Y (Conf.B)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	<b>Conformazione: 62</b> <b>Energia di legame: -6,78 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 2</b> <b>Sito di legame: NO</b>
		<b>Conformazione: 6</b> <b>Energia di legame: -5,54 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 13</b> <b>Sito di legame: NO</b>
2MMC (Modello 1)	Proteina nucleare Ran legante GTP	<b>Conformazione: 66</b> <b>Energia di legame: -7,82 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 13</b> <b>Sito di legame: NO</b>
		<b>Conformazione: 59</b> <b>Energia di legame: -6,26 kcal/mol</b> <b>Numero di pose nel cluster: 17</b> <b>Sito di legame: NO</b>

3K8Y	GTPasi HRas	<b>Conformazione:</b> 30 <b>Energia di legame:</b> -6,75 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 4 <b>Sito di legame:</b> NO  <b>Conformazione:</b> 76 <b>Energia di legame:</b> -6,17 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 28 <b>Sito di legame:</b> NO
4OBE	GTPasi KRas	<b>Conformazione:</b> 70 <b>Energia di legame:</b> -7,42 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 20 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando: Cianidina 3-O-galattoside**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
1C1Y (Conf. A)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	<b>Conformazione:</b> 93 <b>Energia di legame:</b> -5,53 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> NO
1C1Y (Conf. B)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	<b>Conformazione:</b> 47 <b>Energia di legame:</b> -7,80 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 3 <b>Sito di legame:</b> NO
1ZD9	ARL8A	<b>Conformazione:</b> 8 <b>Energia di legame:</b> -5,48 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> NO
2ICK	Isopentil-difosfato isomerasi delta	<b>Conformazione:</b> 92 <b>Energia di legame:</b> -6,18 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
2MMC (Modello 1)	Proteina nucleare Ran legante GTP	<b>Conformazione:</b> 97 <b>Energia di legame:</b> -7,47 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 4 <b>Sito di legame:</b> NO
2RDU	Idrossiacido ossidasi 1	<b>Conformazione:</b> 6 <b>Energia di legame:</b> -5,52 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> NO
4OBE	GTPasi KRas	<b>Conformazione:</b> 2 <b>Energia di legame:</b> -6,58 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 3 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando: [-]-Epicatechina**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
1RM8	Metalloproteinasi di matrice 16	<b>Conformazione:</b> 32 <b>Energia di legame:</b> -10,37 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 36 <b>Sito di legame:</b> SI
2C6Q (Catena A)	GMP reductasi 2	<b>Conformazione:</b> 97 <b>Energia di legame:</b> -7,97 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 3 <b>Sito di legame:</b> SI  <b>Conformazione:</b> 37 <b>Energia di legame:</b> -7,55 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 6 <b>Sito di legame:</b> SI
2QCG (Catena A)	Uridina 5'-monofosfato sintasi-dominio orotidina 5'-monofosfato decarbossilasi	<b>Conformazione:</b> 5 <b>Energia di legame:</b> -8,15 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 9 <b>Sito di legame:</b> SI  <b>Conformazione:</b> 11 <b>Energia di legame:</b> -7,01 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 17 <b>Sito di legame:</b> NO
2Z5F	Membro 1 della famiglia 1B delle Sulfotransferasi citosoliche	<b>Conformazione:</b> 5 <b>Energia di legame:</b> -6,77 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 7 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando: Florizina**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
1ZRH	Eparan-solfato glucosammina 3-O-sulfotransferasi1	<b>Conformazione:</b> 57 <b>Energia di legame:</b> -4,81 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
2X2E	Dinamina 1	<b>Conformazione:</b> 93 <b>Energia di legame:</b> -4,00 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
3ATV	Proteina Heat Shock 70kDa 1A	<b>Conformazione:</b> 21 <b>Energia di legame:</b> -4,79 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 2 <b>Sito di legame:</b> NO
3D3W	L-Xilulosio reductasi	<b>Conformazione:</b> 69 <b>Energia di legame:</b> -5,69 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<b>Conformazione:</b> 73 <b>Energia di legame:</b> -7,48 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> SI

**Ligando: Iperina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	Conformazione: 92 Energia di legame: -2,11 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO
2OAT (Catena A)	Ornitina amminotransferasi	Conformazione: 21 Energia di legame: -5,91 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	Conformazione: 56 Energia di legame: -5,52 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO

**Ligando: Isoquercitrina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2OAT (Catena A)	Ornitina amminotransferasi	Conformazione: 21 Energia di legame: -7,62 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: Parzialmente
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	Conformazione: 3 Energia di legame: -6,07 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO

**Ligando: Mioinositolo**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	Conformazione: 98 Energia di legame: -3,35 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 4 Sito di legame: SI
3ATV	Proteina Heat shock 70kDa 1A	Conformazione: 69 Energia di legame: -2,56 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 10 Sito di legame: NO

**Ligando: Procianidina B<sub>1</sub>**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2G1Y	Renina	Conformazione: 30 Energia di legame: -8,15 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: SI
3KL6	Catena leggera del Fattore X	Conformazione: 30 Energia di legame: -7,27 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 1 Sito di legame: NO

**Ligando: Procianidina B<sub>2</sub>**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
3BUV	3-oxo-5-beta-steroido-4-deidrogenasi	Conformazione: 84 Energia di legame: -6,89 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 13 Sito di legame: NO
3KL6	Leucotriene A-4-idrolasi	Conformazione: 79 Energia di legame: -4,51 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 2 Sito di legame: NO

**Ligando: Quercetina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
11WBS	Proteina chinasi 14 mitogeno attivata	Conformazione: 26 Energia di legame: -6,56 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 4 Sito di legame: SI
2QCG (Catena A)	Uridina 5'-monosfato sintasi	Conformazione: 40 Energia di legame: -9,64 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 9 Sito di legame: SI  Conformazione: 83 Energia di legame: -690 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 28 Sito di legame: NO
4LB4	Aldeide reduttasi	Conformazione: 2 Energia di legame: -7,76 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 45 Sito di legame: SI

**Ligando: Quercitrina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
1BZY (Catena A)	Ipxantina-guanina fosforibosiltransferasi	Conformazione: 77 Energia di legame: -6,44 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 8 Sito di legame: NO
2ZB4 (Catena A)	Prostaglandina reduttasi 2	Conformazione: 58 Energia di legame: -6,82 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 6 Sito di legame: NO

**Ligando: Reinoutrina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2OAT (Catena A)	Ornitina amminotransferasi	Conformazione: 53 Energia di legame: -7,48 kcal/mol Numero di pose nel cluster: 2 Sito di legame: SI

2ZB4 (Catena A)	Prostaglandina reduttasi 2	<b>Conformazione:</b> 76 <b>Energia di legame:</b> -7,67 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> SI
--------------------	----------------------------	---

**Ligando: Resveratrolo**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2Z5F	Membro 1 della famiglia 1 B delle Sulfotransferasi citosoliche	<b>Conformazione:</b> 85 <b>Energia di legame:</b> -6,51 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 15 <b>Sito di legame:</b> NO
2X2E	Dinamina 1	<b>Conformazione:</b> 1 <b>Energia di legame:</b> -8,03 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 13 <b>Sito di legame:</b> Parzialmente  <b>Conformazione:</b> 19 <b>Energia di legame:</b> -6,70 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 13 <b>Sito di legame:</b> Parzialmente
4LB4	Aldeide reduttasi	<b>Conformazione:</b> 91 <b>Energia di legame:</b> -7,42 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 9 <b>Sito di legame:</b> NO  <b>Conformazione:</b> 45 <b>Energia di legame:</b> -7,30 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 58 <b>Sito di legame:</b> SI
4LDQ	Metil-rbosio 1 fosfato isomerasi	<b>Conformazione:</b> 10 <b>Energia di legame:</b> -5,60 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 9 <b>Sito di legame:</b> NO

**Ligando: Rutina**

CODICE PDB	NOME DELLA PROTEINA	RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA
2BK3 (Catena A)	Monoammino ossidasi B	<b>Conformazione:</b> 48 <b>Energia di legame:</b> -4,88 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
2FYT	Arginina N-metiltransferasi 3	<b>Conformazione:</b> 44 <b>Energia di legame:</b> -4,60 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	<b>Conformazione:</b> 65 <b>Energia di legame:</b> -2,41 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO

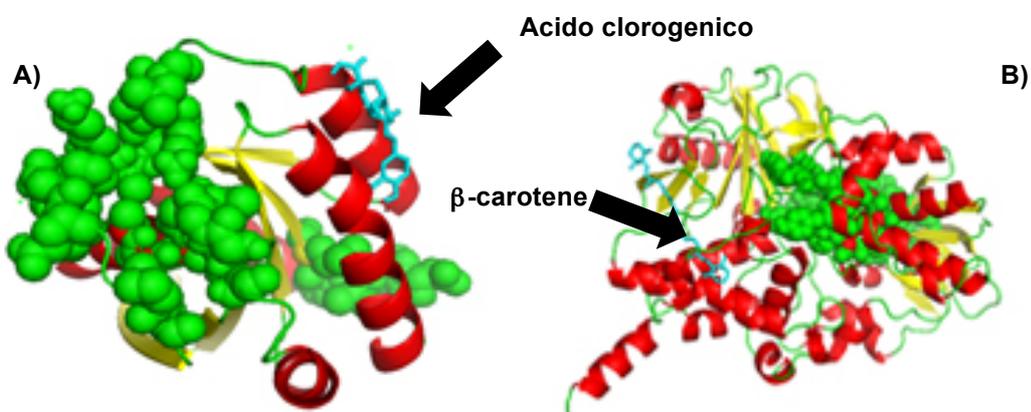
2OAT (Catena A)	Ornitina amminotransferasi	<b>Conformazione:</b> 69 <b>Energia di legame:</b> -5,16 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> NO
2ZB4 (Catena A)	Prostaglandina reduttasi 2	<b>Conformazione:</b> 63 <b>Energia di legame:</b> -7,32 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> SI
3ORH (Catena A)	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<b>Conformazione:</b> 94 <b>Energia di legame:</b> -5,19 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 1 <b>Sito di legame:</b> SI

**Ligando: Solforafano**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME DELLA PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SULL'INTERA SUPERFICIE PROTEICA</b>
2RFI	Istone N-metiltransferasi; H3 lisina 9 specifico 5	<b>Conformazione:</b> 31 <b>Energia di legame:</b> -5,69 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 32 <b>Sito di legame:</b> SI
3MHK	Tanchirasi 2	<b>Conformazione:</b> 44 <b>Energia di legame:</b> -5,68 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 7 <b>Sito di legame:</b> SI  <b>Conformazione:</b> 30 <b>Energia di legame:</b> -5,62 kcal/mol <b>Numero di pose nel cluster:</b> 29 <b>Sito di legame:</b> SI

Questi dati suggeriscono che gli antiossidanti hanno una buona energia di legame predetta con i targets selezionati e taluni mostrano una buona energia di legame quando si legano anche in siti di legame differenti rispetto al sito di legame "canonico".

Alcuni esempi sono l'acido clorogenico e il  $\beta$ -carotene che si legano, il primo alla GTPasi HRas (codice PDB: 3K8Y) con un'energia di legame predetta pari a -11,65 Kcal/mol e Ki predetta uguale a 2,88 nM; il secondo alla Monoammino ossidasi B (codice PDB 2BK3) con un'energia predetta di legame di -10,06 Kcal/mol e Ki predetta pari a 42,44 nM (Fig. 41).



**Fig. 41:** A) interazione tra acido clorogenico e GTPasi HRas; B) interazione tra  $\beta$ -carotene e Monoammino ossidasi B.

In moltri casi, gli antiossidanti selezionati legano cavità differenti dal sito attivo, a volte anche con una notevole energia di legame predetta. Per esempio l'acido clorogenico lega la GTPasi KRas (cod. PDB: 3K8Y) in una cavità diversa dal sito attivo, con un'energia di legame predetta di -11,65 kcal/mol, con una costante di inibizione predetta nell'ordine dei nanomolare.

In generale, comunque, i risultati di docking sull'intera superficie proteica mostrano che la maggior parte degli antiossidanti si legano con una buona energia di legame predetta, al sito di legame canonico della proteina.

### 5.2.2 Docking focalizzati sul sito di legame delle proteine

Come detto in precedenza, il docking sul solo sito di legame è stato fatto sia in assenza che in presenza del cofattore e/o di ioni, quando presenti nella struttura proteica, per valutare l'affinità delle molecole antiossidanti con le proteine targets in entrambe le condizioni. I risultati sono riportati nella Tab. 10.

**Tabella 10:** Risultati dei docking eseguiti focalizzando la griglia sul sito di legame della proteina, sia in presenza che in assenza di cofattori e/o ioni.

**Ligando: Acido clorogenico**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME, IN PRESENZA DI COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME IN ASSENZA DI COFATTORE/IONE
1GRN	Proteina Rho GTPasi attivante le proteine	Conformazione: 66 En. di legame: -7,33 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 7	Conformazione: 68 En. di legame: -8,49 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 37
3K8Y	GTPasi HRas	Conformazione: 64 En. di legame: -6,36 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 23	Conformazione: 66 En. di legame: -10,56 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 18

3ZNN (catena A)	D-amminoacido ossidasi	<b>Conformazione:</b> 95 <b>En. di legame:</b> -9,23 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 11	<b>Conformazione:</b> 60 <b>En. di legame:</b> -7,11 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2  <b>Conformazione:</b> 91 <b>En. di legame:</b> -6,86 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 24
4OBE 4OBE (catena B)	GTPasi KRas	<b>Conformazione:</b> 93 <b>En. di legame:</b> -7,65 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 27	<b>Conformazione:</b> 93 <b>En. di legame:</b> -14,77 Kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 84

**Ligando: Avicularina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1BZY (catena A)	Ipxantina-guanina fosforibosiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 87 <b>En. di legame:</b> -11,06 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 88
2QCG (Catena A)	Uridina 5'-monofosfato sintasi- dominio orotidina 5'- monofosfato decarbossilasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 53 <b>En. di legame:</b> -7,17 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 27  <b>Conformazione:</b> 16 <b>En. di legame:</b> -6,17 Kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 28

**Ligando:  $\beta$ -Carotene**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2BK3 (catena A)	Monoammino- ossidasi B	<b>Conformazione:</b> 23 <b>En. di legame:</b> -5,51 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 36	<b>Conformazione:</b> 72 <b>En. di legame:</b> -13,67 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 98
3ZNN (Catena A)	D-amminoacido ossidasi	<b>Conformazione:</b> 96 <b>En. di legame:</b> -4,95 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 35	<b>Conformazione:</b> 56 <b>En. di legame:</b> -16,18 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 100

**Ligando: [+]-Catechina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1C1Y (conformazione A)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	<b>Conformazione:</b> 55 <b>En. di legame:</b> -6,33 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 26  <b>Conformazione:</b> 12 <b>En. di legame:</b> -5,74 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 29	<b>Conformazione:</b> 47 <b>En. di legame:</b> -8,49 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 20  <b>Conformazione:</b> 78 <b>En. di legame:</b> -8,12 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 58

1C1Y (conformazione B)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	Conformazione: 73 En. di legame: -6,48 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 38	Conformazione: 66 En. di legame: -8,48 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 23  Conformazione: 89 En. di legame: -8,12 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 55
2MMC (Modello1)	Proteina nucleare Ran Legante GTP	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	Conformazione: 63 En. di legame: -5,49 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 19  Conformazione: 58 En. di legame: -5,41 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 40
3K8Y	GTPasi HRas	Conformazione: 40 En. di legame: -5,75 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 93	Conformazione: 39 En. di legame: -8,87 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 23  Conformazione: 90 En. di legame: -8,65 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 75
1C1Y (catena B)	GTPasi KRas	Conformazione: 12 En. di legame: -5,13 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 23  Conformazione: 40 En. di legame: -4,96 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 24	Conformazione: 95 En. di legame: -7,72 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 97

**Ligando: Cianidina-3-galattoside**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1C1Y (conformazione A)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	Conformazione: 16 En. di legame: -5,89 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 2  Conformazione: 55 En. di legame: -4,76 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 34	Conformazione: 64 En. di legame: -8,81 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 70
1C1Y (conformazione B)	Proteina Rap 1A correlata a Ras	Conformazione: 53 En. di legame: -5,83 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 3  Conformazione: 61 En. di legame: -4,68 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 27	Conformazione: 98 En. di legame: -9,09 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 72
1ZD9	ARL8A	Conformazione: 22 En. di legame: -5,88 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 8  Conformazione: 90 En. di legame: -4,90 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 14	Conformazione: 35 En. di legame: -9,21 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 4  Conformazione: 41 En. di legame: -7,81 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 62
2ICK	Isopentinitil-difosfato delta isomerasi	Conformazione: 88 En. di legame: -4,90 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 49	Conformazione: 17 En. di legame: -4,96 kcal/mol Num. di pose nel cluster: 40

2MMC (Modello 1)	Proteina nucleare Ran legante GTP	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 96 <b>En. di legame:</b> -5,26 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2  <b>Conformazione:</b> 76 <b>En. di legame:</b> -4,99 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 36
2RDU	Idrossiacido ossidasi 1	<b>Conformazione:</b> 90 <b>En. di legame:</b> -7,05 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 9  <b>Conformazione:</b> 66 <b>En. di legame:</b> -4,49 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 12	<b>Conformazione:</b> 34 <b>En. di legame:</b> -9,07 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 28
4OBE (Catena B)	GTPasi KRas	<b>Conformazione:</b> 35 <b>En. di legame:</b> -3,25 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 8	<b>Conformazione:</b> 96 <b>En. di legame:</b> -3,31 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 4  <b>Conformazione:</b> 68 <b>En. di legame:</b> -3,12 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 13

**Ligando: [-]-Epicatechina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1RM8	Metalloproteinasi di matrice 16	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 36 <b>En. di legame:</b> -10,58 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 73
2C6Q (Catena A)	GMP reductasi 2	<b>Conformazione:</b> 30 <b>En. di legame:</b> -8,35 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 63	<b>Conformazione:</b> 90 <b>En. di legame:</b> -7,99 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 50
2QCG (Catena A)	Uridina 5'-monosfato sintasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 1 <b>En. di legame:</b> -8,54 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 57
2Z5F	Membro 1 della famiglia 1B delle Sulfotransferasi citosoliche	<b>Conformazione:</b> 15 <b>En. di legame:</b> -5,53 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2  <b>Conformazione:</b> 21 <b>En. di legame:</b> -5,23 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 48	<b>Conformazione:</b> 13 <b>En. di legame:</b> -10,19 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 78

**Ligando: Florizina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1ZRH	Eparan-solfato glucosammina 3-O-sulfotransferasi1	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 22 <b>En. di legame:</b> -10,27 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 9
2X2E (Catena A)	Dinamina 1	<b>Conformazione:</b> 56 <b>En. di legame:</b> -6,52 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 4	<b>Conformazione:</b> 9 <b>En. di legame:</b> -9,62 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 4  <b>Conformazione:</b> 18 <b>En. di legame:</b> -7,17 Kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 16

3ATV	Proteina Heat Shock 70kDa 1A	<b>Conformazione:</b> 37 <b>En. di legame:</b> -4,88 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 11	<b>Conformazione:</b> 70 <b>En. di legame:</b> -6,99 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 3
3D3W	L-Xilulosio reductasi	<b>Conformazione:</b> 37 <b>En. di legame:</b> -6,79 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2  <b>Conformazione:</b> 25 <b>En. di legame:</b> -5,65 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 10	<b>Conformazione:</b> 78 <b>En. di legame:</b> -9,56 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 1
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 71 <b>En. di legame:</b> -10,01 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 13

**Ligando: Iperina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	<b>Conformazione:</b> 77 <b>En. di legame:</b> -6,01 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 9	<b>Conformazione:</b> 46 <b>En. di legame:</b> -9,06 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 3
2OAT (Catena A)	Ornitina amminottransferasi	<b>Conformazione:</b> 50 <b>En. di legame:</b> -6,84 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 19	<b>Conformazione:</b> 28 <b>En. di legame:</b> -7,39 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 39
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 15 <b>En. di legame:</b> -10,30 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 46

**Ligando: Isoquercitina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2OAT (Catena A)	Ornitina amminottransferasi	<b>Conformazione:</b> 58 <b>En. di legame:</b> -6,97 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 15  <b>Conformazione:</b> 69 <b>En. di legame:</b> -5,65 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 19	<b>Conformazione:</b> 68 <b>En. di legame:</b> -7,68 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 7  <b>Conformazione:</b> 78 <b>En. di legame:</b> -7,41 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 14
3ORH	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 86 <b>En. di legame:</b> -10,88 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 44

**Ligando: Mioinositolo**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	<b>Conformazione:</b> 20 <b>En. di legame:</b> -4,59 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 51	<b>Conformazione:</b> 45 <b>En. di legame:</b> -5,62 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 43

3ATV	Proteina Heat shock 70kDa 1A	<b>Conformazione: 83</b> <b>En. di legame: -4,25 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 5</b>  <b>Conformazione: 91</b> <b>En. di legame: -4,11 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 75</b>	<b>Conformazione: 76</b> <b>En. di legame: -6,40 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 97</b>
------	---------------------------------	---	---

**Ligando: Procianidina B<sub>1</sub>**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2G1Y	Renina	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione: 90</b> <b>En. di legame: -9,96 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 18</b>  <b>Conformazione: 100</b> <b>En. di legame: -9,49 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 29</b>
3KI6	Catena leggera del Fattore X	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione: 56</b> <b>En. di legame: -3,08 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 28</b>

**Ligando: Procianidina B<sub>2</sub>**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
3BUV	3-oxo-5-beta-steroid-4-deidrogenasi	<b>Conformazione: 49</b> <b>En. di legame: -5,64 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 51</b>	<b>Conformazione: 8</b> <b>En. di legame: -11,75 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 48</b>
3KI6	Leucotriene A-4-idrolasi	<b>Conformazione: 10</b> <b>En. di legame: -5,91 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 4</b>  <b>Conformazione: 42</b> <b>En. di legame: -5,91 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 14</b>	<b>Conformazione: 36</b> <b>En. di legame: -8,70 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 6</b>

**Ligando: Quercetina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1WBS	Proteina chinasi 14 mitogeno attivata	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione: 56</b> <b>En. di legame: -7,15 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 12</b>  <b>Conformazione: 86</b> <b>En. di legame: -7,15 kcal/mol</b> <b>Num. di pose nel cluster: 26</b>

2QCG (catena A)	Uridina 5'-monosfato sintasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 59 <b>En. di legame:</b> -9,75 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 100
4LB4	Aldeide reductasi	<b>Conformazione:</b> 10 <b>En. di legame:</b> -7,90 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 100	<b>Conformazione:</b> 4 <b>En. di legame:</b> -8,91 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 14  <b>Conformazione:</b> 14 <b>En. di legame:</b> -7,71 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 65

**Ligando: Quercitrina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
1BZY (Catena A)	Ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 40 <b>En. di legame:</b> -11,22 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 70
4LB4	Prostaglandina reductasi 2	<b>Conformazione:</b> 56 <b>En. di legame:</b> -7,29 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 22	<b>Conformazione:</b> 89 <b>En. di legame:</b> -10,46 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 6  <b>Conformazione:</b> 71 <b>En. di legame:</b> -7,51 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 19

**Ligando: Reinoutrina**

CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
2OAT (Catena A)	Ornitina amminotransferasi	<b>Conformazione:</b> 48 <b>En. di legame:</b> -6,74 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 30  <b>Conformazione:</b> 75 <b>En. di legame:</b> -6,70 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 40	<b>Conformazione:</b> 34 <b>En. di legame:</b> -7,95 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 70
2ZB4 (Catena A)	Prostaglandina reductasi 2	<b>Conformazione:</b> 100 <b>En. di legame:</b> -7,37 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 15  <b>Conformazione:</b> 44 <b>En. di legame:</b> -7,03 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 32	<b>Conformazione:</b> 51 <b>En. di legame:</b> -9,80 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 10

**Ligando: Resveratrolo**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE</b>	<b>RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE</b>
2Z5F	Membro 1 della famiglia 1 B delle Sulfotransferasi citosoliche	<b>Conformazione:</b> 84 <b>En. di legame:</b> -5,72 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 50	<b>Conformazione:</b> 56 <b>En. di legame:</b> -7,15 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 12
2X2E	Dinamina 1	<b>Conformazione:</b> 6 <b>En. di legame:</b> -5,48 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 49	<b>Conformazione:</b> 59 <b>En. di legame:</b> -9,75 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 100
4LB4	Aldeide reductasi	<b>Conformazione:</b> 67 <b>En. di legame:</b> -7,41 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 100	<b>Conformazione:</b> 4 <b>En. di legame:</b> -8,91 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 14
4LDQ	Metil-rbosio 1 fosfato isomerasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 86 <b>En. di legame:</b> -7,15 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 26

**Ligando: Rutina**

<b>CODICE PDB</b>	<b>NOME PROTEINA</b>	<b>RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE</b>	<b>RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE</b>
2BK3 (Catena A)	Monoammino ossidasi B	<b>Conformazione:</b> 19 <b>En. di legame:</b> -6,47 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 3	<b>Conformazione:</b> 16 <b>En. di legame:</b> -8,38 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2
2FYT	Arginina N-metiltransferasi 3	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 84 <b>En. di legame:</b> -7,91 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2  <b>Conformazione:</b> 33 <b>En. di legame:</b> -7,38 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 9
2IW5	Istone demetilasi 1 lisina specifico	<b>Conformazione:</b> 78 <b>En. di legame:</b> -6,29 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2	<b>Conformazione:</b> 69 <b>En. di legame:</b> -5,91 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 3
2OAT (Catena A)	Oritina aminotransferasi	<b>Conformazione:</b> 48 <b>En. di legame:</b> -4,84 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 3  <b>Conformazione:</b> 33 <b>En. di legame:</b> -4,83 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 15	<b>Conformazione:</b> 14 <b>En. di legame:</b> -8,81 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 31
2ZB4 (Catena A)	Prostaglandina reductasi 2	<b>Conformazione:</b> 24 <b>En. di legame:</b> -8,83 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 7  <b>Conformazione:</b> 15 <b>En. di legame:</b> -7,97 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 16	<b>Conformazione:</b> 27 <b>En. di legame:</b> -9,81 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 2
3ORH (Catena A)	Guanidinacetato N-metiltransferasi	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 88 <b>En. di legame:</b> -11,03 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 63

**Ligando: Solforafano**

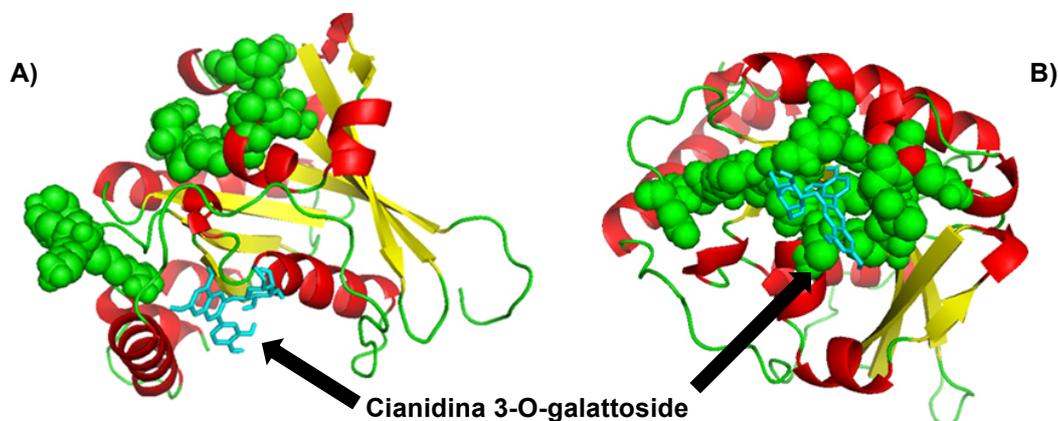
CODICE PDB	NOME PROTEINA	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME CON COFATTORE/IONE	RISULTATI DOCKING SUL SITO DI LEGAME SENZA COFATTORE/IONE
RFI	Istone N-metiltransferasi; H3 lisina 9 specifico 5	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 34 <b>En. di legame:</b> -7,95 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 70
3MHK	Tanchirasi 2	<i>Il cofattore non è presente nella struttura cristallografica</i>	<b>Conformazione:</b> 51 <b>En. di legame:</b> -9,80 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 10  <b>Conformazione:</b> 51 <b>En. di legame:</b> -9,80 kcal/mol <b>Num. di pose nel cluster:</b> 10

L'energia di legame predetta nei docking tra gli antiossidanti e le proteine in presenza del cofattore varia tra -9,23 kcal/mol (nell'interazione tra acido clorogenico e D-ammino-acido ossidasi) e -3,25 Kcal/mol (nell'interazione tra cianidina 3-O-galattoside e GTPasi KRas) (Tab. 9).

L'energia di legame predetta nei docking tra gli antiossidanti e le proteine che non contengono cofattori varia tra -16,18 kcal/mol e -3,08 kcal/mol. La migliore energia predetta è quella dell'interazione tra la D-Amminoacido ossidasi (codice PDB: 3ZNN) e  $\beta$ -carotene. La peggiore interazione predetta è quella tra la Procianidina B<sub>1</sub> e la catena leggera del fattore X (codice PDB: 3KL6) (Tab. 9).

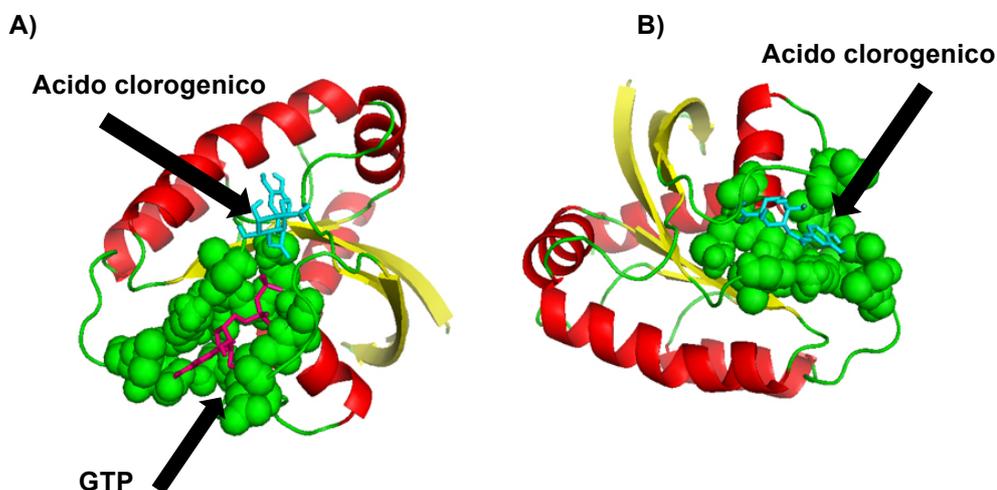
Le interazioni, considerando sia quelle con cofattore sia quelle senza, che hanno valori energia di legame predette più bassi di -10 kcal/mol sono le seguenti; tra l'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi e l'avicularina (-11,06 kcal/mol), tra la metalloproteinasi di matrice 16 (codice PDB: 1RM8) ed [-]-epicatechina (-10,58 kcal/mol); tra guanidinoacetato N-metiltransferasi (codice PDB: 3ORH) e l'iperina (-10,30 Kcal/mol), e isoquercitrina (-10,88 Kcal/mol), florizina (-10,10 Kcal/mol) e rutina (-11,03 kcal/mol), e infine l'interazione tra l'eparansolfato glucosammina 3-O-sulfotransferasi 1 (codice PDB:1ZRH) e la florizina (-10,27 kcal/mol).

In generale i docking focalizzati sul solo sito di legame mostrano valori di energia di legame predetta migliori rispetto a quelli dei docking eseguiti sull'intera superficie proteica in cui l'antiossidante si lega sul sito di legame canonico. Un'eccezione è l'interazione tra cianidina 3-O-galattoside con la proteina Ran nucleare legante GTP (codice PDB: 2MMC) e con GTPasi KRas (cod. PDB: 4OBE). Infatti, in entrambi i casi, l'interazione dell'antiossidante con un sito di legame diverso da quello canonico ha un'energia di legame migliore rispetto a quella associata al docking focalizzato sul sito di legame. L'energia di legame predetta nel sito di legame non canonico è di -7,47 kcal/mol e di -6,58 kcal/mol rispettivamente, mentre nel docking focalizzato sul sito di legame è di -5,26 kcal/mol e di -3,31 kcal/mol (Fig. 42).



**Fig. 42:** Interazione tra Cianidina 3-O-galattoside e 4OBE A) conformazione assunta nel docking sull'intera superficie proteica; B) conformazione assunta nel docking focalizzato sul sito di legame.

Gli antiossidanti mostrano una più alta affinità di legame per le proteine in assenza del cofattore, e inoltre tendono ad occupare il sito di legame del cofattore. Questo è il caso dell'acido clorogenico nel docking con la GTPasi Kras (codice PDB: 4OBE); in assenza del cofattore, GTP lega la proteina con una buona energia di legame predetta (-14,67 kcal/mol) occupando il sito del GTP, mentre in presenza del GTP l'acido clorogenico è costretto ad assumere altre posizioni ma con un'energia di legame meno favorevole (-7,65 kcal/mol) (Fig. 43).



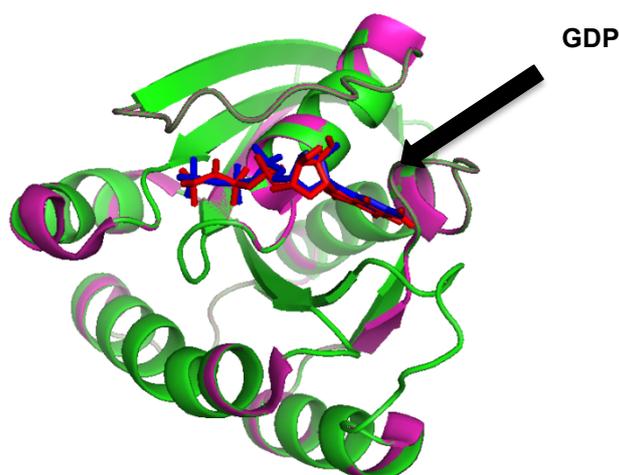
**Fig. 43:** Interazione dell'acido clorogenico con la proteina GTPasi Kras A) in presenza del cofattore; B) in assenza del cofattore

Le interazioni favorite in presenza del cofattore sono quelle tra [-]-epicatechina e la GMP reduttasi 2 (codice PDB: 2C6Q). In presenza di NADH l'antiossidante lega comunque il sito di legame canonico della proteina e i risultati mostrano che l'affinità di legame predetta è maggiore in presenza di NADH (Ki: 751,68 nM) rispetto a quella

che si ha in assenza del cofattore ( $K_i$ : 1,39  $\mu\text{M}$ ) suggerendo che il cofattore potrebbe interagire favorevolmente con l'antiossidante.

### 5.2.3 Docking molecolare tra targets proteici e cofattori

L'alta affinità di legame degli antiossidanti per i targets proteici in assenza del cofattore ha suggerito un meccanismo competitivo tra le due molecole. Per valutare se gli antiossidanti avevano un'affinità per queste proteine maggiore rispetto a quella dei cofattori, sono stati eseguiti docking dei cofattori con le proprie strutture proteiche. Per verificare la corretta stima dell'affinità di legame del cofattore con il proprio target proteico è stato necessario ottenere risultati di docking in cui il cofattore si posizionasse esattamente nello stesso sito di legame e nella stessa conformazione che occupa nella struttura cristallografica. Questo è stato ottenuto variando alcuni parametri di docking, mantenuti in altri casi di default. Per esempio nel docking tra GDP e GTPasi KRas (cod. PDB: 3K8Y) sono state lasciate le molecole d'acqua all'interno del sito di legame del cofattore. Tutti i risultati di docking ottenuti sono, quindi, riferiti al cofattore nella conformazione che esso possiede nella struttura cristallografica (Fig. 44).



**Fig. 44:** Sovrapposizione del cofattore GDP della struttura cristallografica 3K8Y con GDP nella conformazione 86 del docking tra 3K8Y e GDP.

I risultati dei docking tra cofattore e target proteico sono riportati nella Tab. 11.

**Tabella 11:** risultati dei docking eseguiti tra il cofattore e la propria proteina.

CODICE PDB	COFATTORE	RISULTATI DOCKING
3K8Y	GNP	<p>Conformazione: 86            Energia di Legame: -12,84 kcal/mol            Ki: 388,64 pM            Numero di pose nel cluster: 9</p> <p>Conformazione: 94            Energia di Legame: -8,65 kcal/mol            Ki: 459,81 nM            Numero di pose nel cluster: 14</p>
1C1Y (Conformazione A)	GTP	<p>Conformazione: 30            Energia di Legame: -21,47 kcal/mol            Ki: 182,89 aM            Numero di pose nel cluster: 27</p>
1C1Y (Conformazione B)	GTP	<p>Conformazione: 24            Energia di Legame: -9,98 kcal/mol            Ki: 48,25 nM            Numero di pose nel cluster: 13</p> <p>Conformazione: 59            Energia di Legame: -6,16 kcal/mol            Ki: 30,69 μM            Numero di pose nel cluster: 26</p>
40BE	GDP	<p>Conformazione: 91            Energia di Legame: -17,09 kcal/mol            Ki: 53,54 pM            Numero di pose nel cluster: 40</p>
3D3W	NAP	<p>Conformazione: 45            Energia di Legame: -10,35 kcal/mol            Ki: 25,88 nM            Numero di pose nel cluster: 1</p>
2X2E	GDP	<p>Conformazione: 91            Energia di Legame: -9,14 kcal/mol            Ki: 199,43 nM            Numero di pose nel cluster: 49</p> <p>Conformazione: 43            Energia di Legame: -13,78 kcal/mol            Ki: 79,34 pM            Numero di pose nel cluster: 6</p>
20AT	PFM	<p>Conformazione: 84            Energia di Legame: -9,03 kcal/mol            Ki: 238,54 nM            Numero di pose nel cluster: 22</p>
4LB4	NAP	<p>Conformazione: 1            Energia di Legame: -11,34 kcal/mol            Ki: 4,87 nM            Numero di pose nel cluster: 5</p>
2Z5F	A3P	<p>Conformazione: 41            Energia di Legame: -13,81 kcal/mol            Ki: 75,07 pM            Numero di pose nel cluster: 29</p>
2ZB4	NAP	<p>Conformazione: 67            Energia di Legame: -10,10 kcal/mol            Ki: 39,64 nM            Numero di pose nel cluster: 2</p>

2BK3	FAD	<b>Conformazione:</b> 2 <b>Energia di Legame:</b> -6,09 kcal/mol <b>Ki:</b> 34,62 $\mu$ M <b>Numero di pose nel cluster:</b> 6
2IW5	FAD	<b>Conformazione:</b> 9 <b>Energia di Legame:</b> -4,59 kcal/mol <b>Ki:</b> 429,47 $\mu$ M <b>Numero di pose nel cluster:</b> 7
3BUV	NAP	<b>Conformazione:</b> 5 <b>Energia di Legame:</b> -13,29 kcal/mol <b>Ki:</b> 181,31 pM <b>Numero di pose nel cluster:</b> 3
1ZD9	GDP	<b>Conformazione:</b> 37 <b>Energia di Legame:</b> -17,93 kcal/mol <b>Ki:</b> 71,64 fM <b>Numero di pose nel cluster:</b> 38
2RDU	FMN	<b>Conformazione:</b> 69 <b>Energia di Legame:</b> -13,57 kcal/mol <b>Ki:</b> 113,61 pM <b>Numero di pose nel cluster:</b> 61

Questi risultati suggeriscono che gli antiossidanti possono legare le proteine selezionate ma non competono con i loro cofattori. Infatti, dal punto di vista energetico, questi ultimi hanno una più alta affinità di legame con le proteine rispetto agli antiossidanti.

In qualche caso, comunque, l'energia di legame predetta per il legame dell'antiossidante alla proteina si discosta di poco dall'energia di legame predetta per il legame del cofattore. Per esempio, la [+]catechina interagisce con la proteina Rap 1 A correlata a Ras (residui in conformazione B), in assenza del cofattore, con un'energia di legame predetta di -8,48 kcal/mol, mentre il cofattore mostra un'energia di legame predetta di -9,98 kcal/mol. Altre interazioni di antiossidanti che mostrano un'energia di legame predetta simile a quella dei cofattori sono la reinoutrina con la prostaglandina reduttasi 2 (cod. PDB: 2ZB4), e la rutina con la monoammino ossidasi B (cod. PDB: 2BK3), con l'ornitina amminotransferasi (cod. PDB: 2OAT) e la prostaglandina reduttasi 2 (cod. PDB: 2ZB4).

### 5.3. Analisi funzionale dei targets proteici selezionati per gli antiossidanti presenti negli estratti polifenolici delle mele

In letteratura è nota l'attività di *scavengers* degli antiossidanti, così come l'effetto benefico che essi hanno su numerose patologie umane, come già descritto precedentemente. Attualmente non si hanno a disposizione numerosi dati che descrivano le interazioni che queste molecole possono avere con specifici targets proteici. La conoscenza delle reazioni chimiche alla base di queste interazioni è fondamentale per comprendere i meccanismi molecolari a cui queste molecole prendono parte.

Dopo la selezione di possibili targets proteici per antiossidanti presenti nella mela "Annurca" o altri abbondanti nel mondo vegetale, si è proseguito con l'analisi funzionale per ottenere dati in termini di espressione genica e di networks di interazione.

Per l'analisi funzionale sono stati selezionati le migliori interazioni tra gli antiossidanti presenti nelle mele e i targets proteici selezionati, sulla base dell'energia di legame predetta e il numero di pose nel cluster.

Le migliori interazioni selezionate dalle simulazioni *in silico* identificano 18 possibili targets proteici per gli antiossidanti (Tab.12).

**Tabella 12:** interazioni selezionate per l'analisi funzionale.

NOME DELLA PROTEINA	CODICE PDB	ANTIOSSIDANTE
Ipxantina guanina fosforibosiltransferasi	1BZY	Avicularina, Quercitrina
Uridina-5'-monofosfatasi sintasi	2QCG	Avicularina, [-]-Epicatechina, Quercetina
Monoammino ossidasi B	2BK3	Rutina
Proteina Rap 1 A Ras-correlata	1C1Y	[+]-Catechina, Cianidina-3-O-galattoside
Metalloproteasi di Matrice 16	1RM8	[-]-Epicatechina
GMP reduttasi 2	2C6Q	[-]-Epicatechina
Istone demetilasi 1 Lisina specifico	2IW5	Iperina
Ornitina Amminotransferasi	2OAT	Isoquercitrina, Reinoutrina, Rutina
Guanidinacetato N-metiltransferasi	3ORH	Iperina, Isoquercitrina
Proteina Heat shock 70kDa 1A	3ATV	Florizina
Eparan-solfato glucosammina 3-O-sulfotransferasi 1	1ZRH	Florizina
L-Xilulosio reduttasi	3D3W	Florizina
Renina	2G1Y	Procianidina B <sub>1</sub>
3-oxo-5-beta-steroidi-4-deidrogenasi	3BUV	Procianidina B <sub>2</sub>
Leucotriene A-4-idrolasi	3FUN	Procianidina B <sub>2</sub>
Proteina chinasi 14 Mitogeno-attivata	1WBS	Quercetina
Prostaglandina Reduttasi 2	2ZB4	Quercitrina, Reinoutrina, Rutina
Arginina N-metiltransferasi 3	2FYT	Rutina

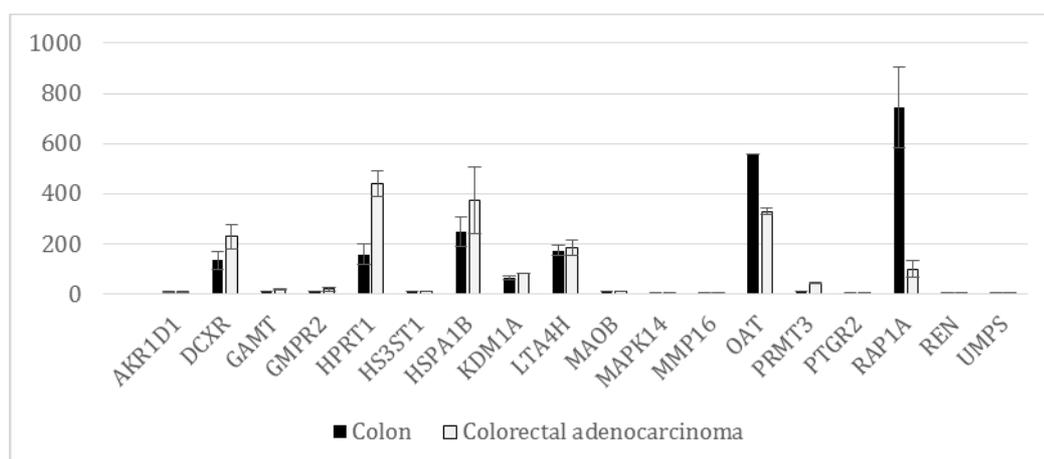
Per questi targets, mediante tools bioinformatici, sono stati ricercati dati sperimentali disponibili negli archivi pubblici. L'attenzione è stata focalizzata sui dati sperimentali inerenti all'effetto chemiopreventivo che gli estratti polifenolici delle mele hanno sull'adenocarcinoma al colon-retto.

Dai dati estratti da BioGPS è emerso che i geni codificanti per i targets proteici selezionati sono differenzialmente espressi nell'adenocarcinoma al colon-retto rispetto ai casi controllo, come riportato nella Tab. 13 e nella Fig. 45.

**Tabella 13:** livelli di espressione genica dei geni codificanti le proteine selezionate per l'analisi funzionale

SIMBOLO DEL GENE	NOME DELLA PROTEINA	COLON (CONTROLLO)	ADENOCARCINOMA AL COLON-RETTO
AKR1D1	3-oxo-5-beta-steroidi-4-deidrogenasi	7.45 ± 0.53	7.40 ± 1.20
DCXR	L-Xilulosio reduttasi	133.60 ± 36.13	228.80 ± 49.64
GAMT	Guanidinoacetato N-metiltransferasi	9.05 ± 0.74	19.40 ± 2.62
GMPR2	GMP reduttasi 2	8.80 ± 0.35	18.75 ± 8.95
HPRT1	Ipxantina-guanina	157.85 ± 41.90	439.05 ± 49.89

	fosforibosiltransferasi		
HS3ST1	Eparan-solfato glucosamina 3-O-sulfotransferasi 1	9.85 ± 0.672	9.80 ± 1.56
HSPA1B	Proteina Heat shock 70kDa 1A	245.45 ± 58.73	373.95 ± 143.74
KDM1A	Istone demetilasi 1 Lisina specifica	63.90 ± 9.05	83.75 ± 0.39
LTA4H	Leucotriene A-4 idrolasi	172.95 ± 19.27	183.25 ± 31.08
MAOB	Monoammino ossidasi B	9.95 ± 0.81	10.55 ± 0.95
MAPK14	Proteina chinasi 14 mitogeno-attivata	5.50 ± 0.424	5.45 ± 0.884
MMP16	Metallo proteina di matrice 16	6.90 ± 0.07	6.85 ± 0.03
OAT	Ornitina Amminotransferasi	556.20 ± 1.34	329.55 ± 15.03
PRMT3	Arginina N-metiltransferasi	8.70 ± 0.63	42.10 ± 1.77
PTGR2	Prostaglandina Reduttasi 2	5.60 ± 0.00	5.55 ± 0.03
RAP1A	Proteina Rap 1A correlata a Ras	741.85 ± 160.69	99.60 ± 32.17
REN	Renina	4.15 ± 0.318	4.15 ± 0.60
UMPS	Uridina-5'-monofosfato sintasi	4.35 ± 0.318	4.30 ± 0.63

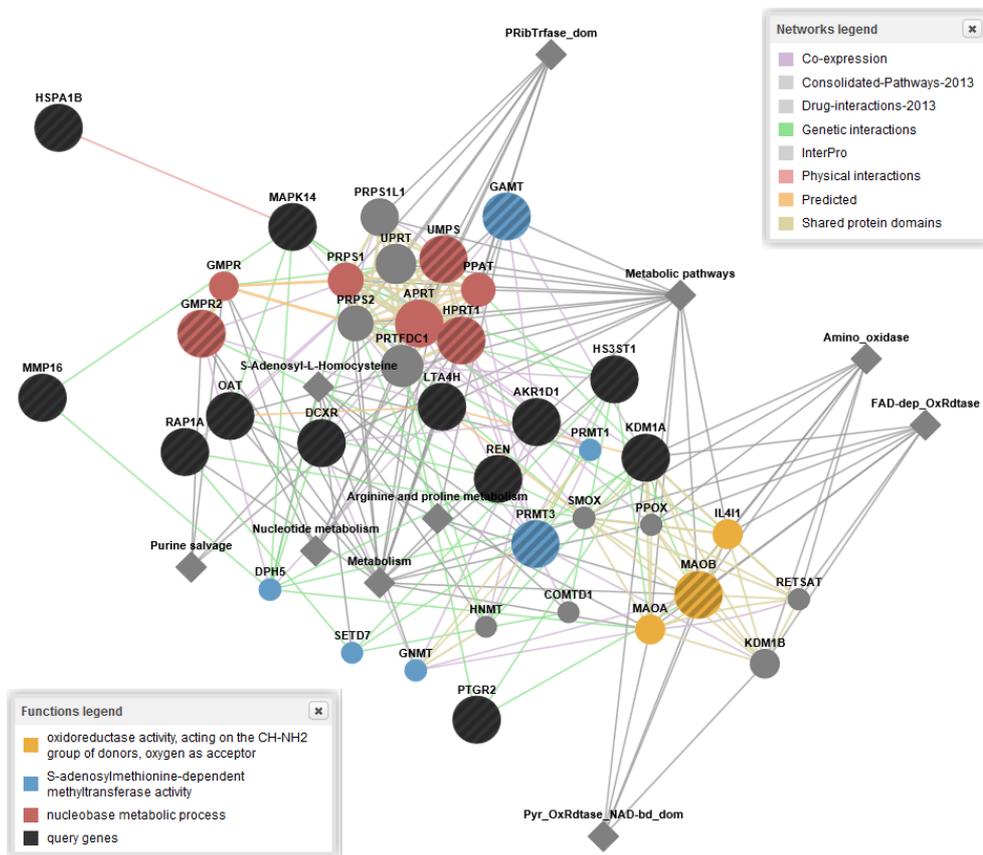


**Fig. 45:** Livelli di espressione genica dei geni codificanti i 18 targets proteici selezionati per l'analisi funzionale, rappresentati come istogramma.

Questi dati mostrano che nell'adenocarcinoma del colon-retto vi è una sottoespressione dei geni OAT e RAP1A che codificano per l'ornitina amminotransferasi e la Proteina Rap 1A correlata a Ras, rispettivamente, e una iperespressione di DCXR, GAMT, GMRP2, HPRT1, KDM1A, PRMT3, ed HSPA1B codificanti L-Xilulosio reducttasi, Guanidinoacetato N-metiltransferasi, GMP reducttasi 2, Ipoantina-guanina fosforibosiltransferasi, Istone demetilasi 1 Lisina specifica, Arginina N-metiltransferasi, e la Proteina Heat shock 70 kDa 1A.

Questi dati suggeriscono che gli antiossidanti selezionati potrebbero interagire con proteine coinvolte significativamente nel cancro al colon, e i loro effetti chemiopreventivi potrebbero essere quindi dovuti alla loro capacità di legare queste proteine e probabilmente di inibirle. La maggior parte delle strutture cristallografiche selezionate contiene nel sito di legame un inibitore, che è stato tolto dal file .pdb per eseguire i docking. Molti degli antiossidanti, legandosi al sito di legame canonico della

proteina, occupano il posto precedentemente occupato dall'inibitore, suggerendo che essi stessi potrebbero avere un effetto inibitorio sulla proteina. Infine, tramite GeneMania sono stati ottenuti i networks di interazione in cui sono coinvolti i geni codificanti i 18 targets proteici selezionati per gli antiossidanti (Fig. 46). La Tab. 14 riportata le funzioni molecolari correlate ai networks di interazione. Le più significative sono quelle che coinvolgono il metabolismo nei nucleotidi, l'attività metiltransferasica e quella di ossidoreduttasi. Mentre l'attività ossidoreduttasica è prevedibile, le altre due rappresentano un dato significativo, considerando che molti farmaci antitumorali agiscono sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi [Rampazzo et al., 2015] e che i processi di metilazione/demetilazione sono estremamente importanti nella regolazione genica e sono coinvolti in vari processi di insorgenza e progressione del cancro [Hamamoto and Nakamura, 2016], come nel cancro al colon-retto [Xue et al., 2015]. Infatti sono stati sviluppati farmaci epigenetici che agiscono come inibitori delle DNA metiltransferasi [Nervi et al., 2015].



**Fig. 46:** Network di interazione dei 18 geni codificanti le proteine selezionate come bersaglio degli antiossidanti, esteso ai 20 interattori più significativi. Il tipo di interazione esistente è descritto dalla legenda in alto a destra. La legenda in basso a sinistra descrive il raggruppamento dei geni su base funzionale. In dettaglio: in rosso sono riportati i geni coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi, in azzurro i geni coinvolti in attività metil-transferasica, in giallo i geni coinvolti in attività ossido-reduttasica. I 18 geni codificanti le

proteine bersaglio degli antiossidanti sono in nero, o evidenziati dalle bande oblique se evidenziati nei gruppi colorati.

I nostri risultati suggeriscono che gli antiossidanti selezionati per l'analisi funzionale, agendo sinergicamente, sono capaci di interagire sia con proteine coinvolte nel metabolismo dei nucleotidi che sugli enzimi con attività metiltransferasica, simulando un'azione simile a quella effettuata dai farmaci anti-tumorali. L'ipotesi che essi agiscano sinergicamente si deve alla fitta rete di interazioni di geni in cui essi agiscono. Esistono diversi pathways che partecipano allo stesso processo e pertanto, se agisse un solo antiossidante, per bloccare uno di essi ci sarebbero altre vie per proseguire. Quindi l'effetto sinergico indurrebbe ad un'azione complessiva su tutti i pathways assicurando l'effetto chemio-preventivo.

**Tabella 14:** Funzioni molecolari associate ai geni codificanti i targets proteici selezionati per l'analisi funzionale.

Funzione	False Discovery Rate
nucleobase metabolic process	3.02e-7
purine nucleobase metabolic process	8.22e-7
S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity	2.70e-5
purine-containing compound salvage	6.06e-5
methyltransferase activity	6.65e-5
transferase activity, transferring one-carbon groups	8.29e-5
cellular metabolic compound salvage	6.95e-4
purine-containing compound biosynthetic process	1.75e-3
oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, oxygen as acceptor	2.46e-3
N-methyltransferase activity	2.87e-3
oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	3.48e-3
transferase activity, transferring pentosyl groups	3.20e-2
pigment biosynthetic process	4.08e-2
protein homotetramerization	5.07e-2
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	5.67e-2
histone methyltransferase activity	7.38e-2
pigment metabolic process	8.08e-2
macromolecule methylation	9.22e-2
ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	9.57e-2

#### 5.4. Considerazioni conclusive sulle interazioni degli antiossidanti con targets proteici

Dai risultati ottenuti in questo progetto, emerge che l'effetto degli antiossidanti su numerose patologie umane potrebbe non essere dovuto solo al loro ruolo di *scavenger* contro le molecole ROS, come finora si è sempre pensato. Gli antiossidanti, legandosi a specifici targets proteici, potrebbero essere coinvolti in meccanismi molecolari che sono alla base di effetti chemio-preventivi. Difatti, i targets proteici identificati per 18 antiossidanti mediante un approccio di docking inverso, e in

particolare i targets identificati per gli antiossidanti presenti negli estratti polifenolici della mela “Annurca”, sono implicati significativamente nel cancro al colon-retto. Infatti, alcuni geni codificanti i targets proteici selezionati sono sottoespressi mentre altri sono sovraespressi in modo significativo. Inoltre, essi sono coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi e nei processi metiltransferasici, bersaglio dei farmaci antitumorali. Gli antiossidanti potrebbero legare i loro targets proteici sinergicamente e inibirli, alterando le vie del metabolismo dei nucleotidi e l’attività degli enzimi metiltransferasici coinvolti nei processi di sviluppo e progressione del cancro. L’approccio di docking inverso su larga scala ha permesso quindi di identificare targets proteici per gli antiossidanti che non sono coinvolti in una singola patologia, riuscendo in questo modo ad ottenere risultati con una più ampia visione dei meccanismi molecolari a cui queste molecole prendono parte.

## Capitolo 6. Conclusioni

L'interesse crescente sul ruolo dell'alimentazione nella salute umana ha spinto negli anni molti ricercatori a voler comprendere i meccanismi molecolari cui le molecole associate agli alimenti prendono parte.

Mediante un approccio multidisciplinare integrato sono stati eseguiti due studi: da un lato si è cercato di verificare il possibile coinvolgimento delle micotossine nell'eziologia dell'autismo, e dall'altro lato sono stati identificati possibili nuovi meccanismi molecolari mediante cui gli antiossidanti svolgono la loro attività biologica all'interno della cellula. Questo approccio, che prevede di organizzare dati che comprendono informazioni distribuite su diversi livelli, ha permesso di ottenere dati significativi per i due studi condotti nell'ambito del progetto di dottorato.

La valutazione di un possibile ruolo delle micotossine nell'eziologia dell'autismo è avvenuta mediante l'utilizzo di strumenti bioinformatici e di metodiche sperimentali. L'approccio bioinformatico ha permesso di individuare targets proteici per 12 micotossine contaminanti di latte e cereali. Questi targets sono tutti umani ed espressi nel cervello e/o coinvolti in patologie cerebrali. Lo studio delle interazioni proteina-ligando, mediante docking molecolare, ha permesso di selezionare le migliori interazioni e di individuare il possibile sito di legame. L'interazione tra acetilcolinesterasi,  $\beta$ -secretasi e neuroiligina 4X con aflatossina B<sub>1</sub>, aflatossina B<sub>2</sub>, ocratossina A, deossinivalenolo e gliotossina è stata verificata applicando diversi metodi sperimentali. I risultati sperimentali hanno confermato l'interazione tra acetilcolinesterasi e aflatossina B<sub>1</sub> e tra neuroiligina 4X e aflatossina B<sub>2</sub>, ocratossina A, deossinivalenolo e gliotossina. Entrambe le proteine sono espresse a livello sinaptico e appartengono alla stessa famiglia proteica; mentre la prima è coinvolta nella degradazione dell'acetilcolina, un neurotrasmettitore coinvolto negli impulsi nervosi, la seconda sembra essere coinvolta nei fenomeni di plasticità neuronale. L'interazione delle micotossine con questi due targets proteici potrebbe suggerire l'alterazione dei pathways in cui esse sono coinvolti (interazione sociale, comunicazione, apprendimento) che risultano tra i disordini osservati nei bambini autistici. Certamente queste ipotesi andranno verificate ulteriormente per comprendere l'effetto che le micotossine hanno su queste proteine quando interagiscono con esse.

I possibili meccanismi molecolari cui prendono parte gli antiossidanti esogeni, presenti negli estratti polifenolici della mela "Annurca", per esercitare le loro potenti attività biologiche all'interno della cellula sono stati studiati mediante l'utilizzo di strumenti bioinformatici. L'approccio di docking inverso ha permesso di selezionare possibili targets proteici per ognuna delle molecole antiossidanti e lo studio di docking molecolare ha approfondito alcune interazioni previste. Con lo studio *in silico* delle interazioni si è riusciti ad ipotizzare il sito di legame di alcuni antiossidanti sui loro bersagli proteici e ad escludere un ruolo competitivo tra antiossidanti e cofattori. Le migliori interazioni sono state oggetto dell'analisi funzionale mediante cui sono stati valutati i livelli di espressione genica dei geni codificanti i targets proteici selezionati per gli antiossidanti. I geni in esame sono differenzialmente espressi nell'adenocarcinoma al colon-retto e i loro prodotti sono coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi e nell'attività metiltransferasica, che sono vie di segnalazione implicate nella crescita e progressione tumorale [Hamamoto and Nakamura, 2016]. Gli antiossidanti derivanti dagli estratti polifenolici delle mele potrebbero esercitare il loro

effetto benefico sull'adenocarcinoma al colon-retto legando questi targets e interferendo con i pathways in cui essi sono coinvolti.

## Capitolo 7. Materiali e Metodi

I risultati ottenuti in questo lavoro derivano dall'applicazione e dall'integrazione di metodi bioinformatici e metodiche sperimentali. Gli strumenti bioinformatici utilizzati comprendono: banche dati, software e web-servers, mentre le metodiche sperimentali sono: Dot-Blot, Fluorescenza statica, Fluorescenza risolta nel tempo, Anisotropia, Termoforesi su Microscala che sfruttano le proprietà fluorescenti delle molecole oggetto del progetto. Nel seguente capitolo, saranno descritti nel dettaglio dapprima gli strumenti bioinformatici e i reagenti utilizzati e poi i protocolli applicati per ogni metodica.

### 7.1. Strumenti Bioinformatici

#### 7.1.1 Banche Dati

**Pubmed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>): è un database bibliografico contenente informazioni sulla letteratura scientifica biomedica dal 1949 ad oggi; la prima versione online è del gennaio del 1996.

È stato prodotto dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) presso la *National Library of Medicine* (NLM) dei *National Institutes of Health* (NIH) degli Stati Uniti ed è comunemente interrogato attraverso Entrez, il motore di ricerca messo a punto dall'NCBI per l'individuazione di informazioni biologiche, chimiche e mediche.

PubMed, che contiene milioni di riferimenti bibliografici derivati da migliaia di periodici biomedici, consente l'accesso al MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System*), l'archivio bibliografico on-line del sistema MEDLARS. Condivide le informazioni di base con Medline e con l'Index Medicus, la corrispondente versione stampa la cui pubblicazione, per l'avvento degli strumenti informatici, è stata interrotta nel 2004. Rispetto a Medline, PubMed è tuttavia arricchito da riferimenti provenienti da altri database bibliografici secondari specializzati, come l'*Index to Dental Literature*, l'*International Nursing Index*, l'*Hospital Literature Index* e altre fonti d'informazione su specifici settori.

**PubChem** (<http://pubchem.ncbi.nlm.gov>): è una banca dati pubblica e gratuita che contiene le strutture di piccole molecole organiche e informazioni sulle loro attività biologiche. È suddivisa in tre database primari interconnessi: Substance (informazioni sui composti), Compound (strutture) e BioAssay (saggi di bioattività). Il database Substance contiene informazioni chimiche, Compound contiene strutture chimiche estratte dal database Substance e infine BioAssay contiene dati sull'attività biologica delle sostanze chimiche testate attraverso esperimenti [Kim et al., 2015].

**Protein Data Bank** (<http://www.rcsb.org>): è una banca dati pubblica contenente strutture tridimensionali di proteine, acidi nucleici, carboidrati e una varietà di complessi determinati sperimentalmente attraverso cristallografia a raggi X, spettroscopia NMR ed altre tecniche a bassa risoluzione, quali ad es. la microscopia crioelettronica. Questi metodi permettono di identificare le coordinate di ogni atomo nella molecola. Le informazioni primarie memorizzate nell'archivio PDB sono

contenute in files che contengono anche le coordinate atomiche delle molecole biologiche e sono disponibili in diversi formati (PDB, mmCIF, XML). Ogni file nella banca dati è identificato da un codice di 4 caratteri: un numero e tre caratteri alfanumerici. In PDB sono disponibili 115,764 strutture (Febbraio 2016).

**UniProt** (<http://www.uniprot.org>): è una banca dati contenente sequenze proteiche e informazioni funzionali riferite ad esse. UniProt nasce nel 2002 ed integra l'informazione presente nelle già esistenti banche dati Swiss-Prot, TrEMBL e PSD-PIR; si presenta distribuita in tre livelli:

**1. UniParc** (Uniprot archive), è un database non ridondante che raccoglie le sequenze proteiche presenti nella banche dati pubbliche. Le sequenze identiche sono registrate come singole entries, indipendentemente dalla specie di provenienza e in questo modo si evita la ridondanza. Contiene solo sequenze proteiche e nessuna ulteriore informazione.

**2. UniProtKB** (Uniprot Knowledgebase), rappresenta il "corpo centrale" di questo sistema integrato e conserva i dati di Swiss-Prot, TrEMBL e PSD-PIR. In questa sezione, oltre ad essere raccolti i dati fondamentali quali sequenze proteiche, nome o descrizione della proteina e informazioni tassonomiche, sono incluse anche ontologie biologiche, classificazioni, riferimenti incrociati e chiare indicazioni della qualità dell'informazione. UniProt Knowledgebase si divide in due sezioni: **UniProt/Swiss-Prot**, nella quale sono annotate sequenze in maniera completamente manuale in accordo con informazioni ottenute dalla letteratura e dall'analisi computazionale, valutata dal curatore, e **UniProt/TrEMBL**, che contiene invece sequenze annotate in maniera automatizzata. Swiss-Prot contiene 550299 sequenze mentre TrEMBL contiene 597,118,159 sequenze (Febbraio 2016).

**3. UniProt Reference** (UniRef) costituisce un insieme di banche dati, derivate da UniProt e UniParc, organizzate sulla base di criteri di similarità di sequenza: per esempio, **UniRef90** e **UniRef50** raccolgono in ogni singola entry l'insieme delle sequenze che presentano una percentuale di identità di sequenza maggiore del 90% e del 50% rispettivamente [Apweiler et al., 2004].

**KEGG Pathway Database** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>): è una banca dati realizzata dall'Università di Kyoto. Contiene informazioni sui pathways metabolici della cellula, focalizzando l'attenzione anche sulle variazioni delle vie metaboliche tra diversi organismi viventi. È una risorsa integrata composta da 3 tipi di banche dati: una genomica, una chimica e una di networks, e da un software associato che sono sviluppati dal Kanehisa Laboratory, presso l'Istituto di Ricerca chimica dell'Università di Kyoto.

### 7.1.2. Web-servers utilizzati per la ricerca di targets proteici e per l'analisi funzionale

**idTarget** (<http://www.idtarget.nchc.org.tw>): è un web-server disponibile on-line gratuitamente che permette di predire possibili targets proteici di una piccola molecola chimica attraverso un approccio "divide-et-impera" in combinazione con una funzione di scoring basata su un'analisi di regressione e modelli di carica di chimica quantistica. Nell'approccio divide-et-impera, per il calcolo di docking, sono costruite

piccole griglie sovrapposte in modo da limitare lo spazio di ricerca, ottenendo così risultati di maggiore efficienza. I targets proteici sono scelti tra quasi tutte le strutture contenute nella banca dati Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). I potenziali targets proteici sono valutati mediante le funzioni di punteggio e il profilo di analisi di affinità di AutoDock4. Per analizzare i risultati, il profilo di affinità di ogni sito di legame è modellato da una funzione gaussiana, e la sua larghezza è definita dalla gamma delle affinità di legame previste dei complessi di diversi ligandi nello stesso sito di legame della stessa proteina.

idTarget richiede un file di input in formato .pdb, .mol2 o .pdbqt e utilizza internamente il formato .pdbqt che contiene le informazioni delle cariche atomiche e dei tipi di atomi. Questo software permette anche di scegliere se protonare automaticamente il file di input. Inoltre, idTarget permette di utilizzare due diverse modalità per la ricerca di siti di legame: quella “scanning” e quella “fast”. Con la modalità “scanning”, i docking vengono eseguiti per ogni struttura proteica elencata nella banca dati PDB; con l’opzione “fast”, invece, prima viene associato il ligando ai siti di legame delle proteine omologhe attraverso la loro sovrapposizione in base all’informazione di allineamento strutturale calcolata in precedenza, dopodiché i siti di legame del ligando vengono ottimizzati sulla base di ricerche adattative in modo da rimuovere contatti troppo vicini con atomi della proteina.

L’output di idTarget consiste in una tabella contenente: il nome e il codice PDB della proteina; l’energia di legame predetta (kcal/mol); lo Z-score; il file .dlg contenente le coordinate del ligando legate alla proteina e il collegamento alla pagina PDB dove è descritta la struttura proteica identificata.

I targets sono restituiti in ordine crescente di energia predetta [Wang et al., 2012].

**BLAST** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): è un algoritmo di allineamento che si basa sull’individuazione della Maximal Segment Pair, ossia la coppia di segmenti di identica lunghezza tra tutti quelli contenuti in sequenza che, allineati senza indels, mostrano il massimo punteggio possibile. Il punteggio si calcola sommando i valori contenuti in una matrice di sostituzione per ogni coppia di amminoacidi appaiati dei due segmenti. I due segmenti rappresentano dunque la zona di massima somiglianza locale tra le due sequenze. BLASTP è l’algoritmo utilizzato per confrontare la sequenza query proteica con le sequenze di proteine contenute nei database [Altschul et al., 1990].

**BioGPS** (<http://biogps.org>): è un database di annotazioni geniche in cui sono raggruppate quelle provenienti da fonti pubbliche e quelle del portale stesso [Wu et al., 2009]. Gli utenti possono usufruire per la ricerca della pagina predefinita da BioGPS ma possono anche personalizzare il contenuto in base al loro caso specifico [Wu et al., 2013].

Gli utenti possono individuare informazioni sul gene di loro interesse utilizzando un’interfaccia di ricerca flessibile, che accetta i codici dei geni derivanti da più fonti (Entrez Gene, Ensemble, RefSeq, UniProt, Affimetryx etc.), e lo stesso vale per i codici delle annotazioni (GeneOntology, InterPro etc.).

Oltre alle annotazioni associate ad ogni gene, BioGPS fornisce anche “layouts” che collegano i geni con informazioni più comunemente ricercate. Ad esempio il layout “Literature” si concentra sulla ricerca in letteratura, visualizzando i plugin PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e Google Scholar (<https://scholar.google.it>); il layout “KEGG” (<http://www.kegg.jp>) mostra i pathways biologici in cui il gene di

interesse è coinvolto. GeneAtlas è un data set di BioGPS in cui vengono mostrati i patterns di espressione genica da un insieme diversificato di tessuti e tipi di cellule [Wu et al., 2009].

**GeneMANIA** (<http://genemania.org>): è un web server che permette di generare ipotesi sulla funzione dei geni in esame. Dato un elenco di geni, GeneMANIA estende l'elenco con i geni funzionalmente simili e ne identifica i dati di genomica e proteomica disponibili. Attualmente sono disponibili i dati per 6 tipi di organismo (*Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae*) e centinaia di set di dati sono estratti da GEO, BIOGRID, Pathway Commons e I2D. Gli utenti possono selezionare sottoinsiemi di dati associati ad un organismo oppure possono caricare i loro dati e analizzarli [Warde-Farley et al., 2010].

### 7.1.3. Autodock

AutoDock è un software per prevedere come piccole molecole, generalmente substrati o farmaci candidati, si legano a un recettore con struttura 3D nota.

AutoDock combina un campo di forza di energia libera con un algoritmo genetico Lamarckiano fornendo una previsione veloce delle conformazioni leganti la proteina e valutando l'energia libera di associazione predetta per il complesso. L'energia libera di docking ( $\Delta G_d$ ) calcolata da Autodock è la somma dell'energia di legame, che comprende l'energia di interazione intermolecolare e l'energia libera torsionale, più l'energia di interazione intramolecolare.

AutoDock utilizza delle griglie di spaziatura per consentire una rapida valutazione dell'energia di legame delle conformazioni. In questo modo, la proteina viene incorporata in una griglia che localizza le interazioni nel recettore e attribuisce ad ogni tipo di atomo nel ligando l'energia di interazione che avrebbe in quel punto del recettore. Questa griglia può essere utilizzata come una tabella di ricerca durante una simulazione di docking [Morris et al., 2009].

Autodock 4 consiste in due programmi: Autodock, che esegue il docking del ligando, e Autogrid che precalcola queste griglie. In Autogrid la macromolecola è inserita in un reticolo tridimensionale di punti posti a una distanza tipicamente compresa tra 0,2 e 1,0 Å (il valore di default è 0,375 Å), pari ad un quarto della lunghezza di un legame singolo standard tra due atomi di carbonio. La regione compresa nella griglia è quella in cui si prevede che il ligando si posizionerà. In ogni punto del reticolo si valuta l'energia d'interazione con tutti gli atomi della macromolecola. L'energia in ogni punto della griglia è determinata da un set di parametri legati al tipo di atomo che vi si trova ed è la somma delle interazioni di coppia tra esso e tutti gli atomi della macromolecola entro un particolare raggio di cutoff [Lupieri, 2006].

Autodock, come detto, implementa un algoritmo genetico Lamarckiano che prevede, al termine di ogni generazione, un'esplorazione quasi esaustiva dello spazio locale del sito di legame da parte del ligando, attraverso un algoritmo di ricerca sviluppato da Solis e Wets. L'algoritmo crea un insieme di conformazioni di prova, e poi nelle generazioni successive tali conformazioni mutano, cambiando i parametri conformazionali, in modo da competere in maniera analoga all'evoluzione biologica, selezionando infine le conformazioni con la più bassa energia di legame [Morris et al., 2009].

Una delle maggiori approssimazioni che è adottata nel docking è la completa rigidità del recettore, però AutoDock4 permette anche di rendere flessibili porzioni specifiche della proteina. L'utente seleziona un piccolo numero di catene laterali e queste sono considerate in modo separato dal resto della proteina. Durante la simulazione, per queste catene laterali si esplorano i gradi di libertà torsionali usando gli stessi metodi utilizzati per esplorare lo spazio conformazionale del ligando flessibile. La rimanente porzione della proteina è rappresentata utilizzando griglie di affinità come descritto sopra [Morris et al., 2009].

**AutoDock Tools (ADT):** è una interfaccia grafica per aiutare l'utente nella preparazione dei file di input del docking e l'analisi dei risultati di AutoDock. ADT facilita la formattazione dei file richiesti da AutoDock, fornendo opzioni che permettono la protonazione, il calcolo delle cariche e dei legami rotazionali nella proteina e nel ligando. Per semplificare la preparazione del docking, l'utente può identificare il sito attivo e visualizzare lo spazio di ricerca di simulazione del docking. Inoltre ADT include una varietà di metodi innovativi per il clustering, la visualizzazione e l'analisi dei risultati degli esperimenti di docking [Morris et al., 2009].

## 7.2. Metodiche bioinformatiche

### 7.2.1. Docking inverso per le micotossine e gli antiossidanti

Per ciascuna molecola considerata, ovvero le 12 micotossine e i 18 antiossidanti, idTarget ha selezionato migliaia di possibili targets proteici. Sulla base della migliore energia di legame, per le micotossine sono stati analizzati i primi 100 targets proteici che sono stati confrontati tra loro per identificare quelli comuni a 2 o più micotossine, mentre per ogni antiossidante sono stati selezionati solo i primi 20. Sia per le micotossine che per gli antiossidanti sono stati selezionati successivamente tutti i targets umani. Riguardo ai targets non umani presenti tra i targets proteici selezionati per gli antiossidanti, e quelli non umani comuni a 5 o più micotossine, sono state ricercate strutture omologhe umane che hanno sostituito quelle non umane, quando disponibili, utilizzando blastp e le informazioni contenute nella banca dati PDB.

Dei targets proteici selezionati per le micotossine sono state verificate le annotazioni relative alla funzione e al tessuto di espressione (con UniProt), ai pathways e alle patologie in cui essi sono coinvolti (con KEGG). Questo studio ha permesso di selezionare, per le micotossine, tutti i targets proteici umani che sono espressi nel cervello e/o coinvolti direttamente o indirettamente in patologie cerebrali. Di questi targets e di quelli selezionati per gli antiossidanti è stata valutata l'integrità della loro struttura, controllando se queste presentavano amminoacidi o atomi mancanti, mutazioni e una bassa risoluzione ( $>2.5$  Å). Le strutture fuori dai parametri di valutazione sono state sostituite con strutture migliori o wild type, quando disponibili. Inoltre per le strutture che presentano residui in più conformazioni (cioè con occupazione  $<1$ ), ognuna di esse è stata utilizzata separatamente.

### 7.2.2. Docking molecolare

Per valutare la bontà dell'interazione predetta da idTarget e per individuare il sito di legame dei ligandi sui targets proteici selezionati è stato eseguito il docking molecolare classico utilizzando AutoDock 4.2. In entrambi gli studi i docking sono

stati eseguiti mantenendo il recettore rigido e il ligando flessibile; le molecole d'acqua, i ligandi (eccetto i cofattori riportati da Uniprot) e i substrati sono stati eliminati dai files .pdb delle proteine, fatta eccezione per alcuni casi che verranno descritti in seguito. Sia i ligandi che i recettori sono stati preparati utilizzando AutoDockTools, aggiungendo gli idrogeni e le cariche. Per il docking è stato implementato l'algoritmo genetico Lamarckiano, e sono state fatte generare 100 possibili conformazioni del ligando; gli altri parametri sono stati mantenuti di default. Per le proteine con più catene identiche, il docking è stato fatto solo su una di queste, scegliendo la migliore sulla base di parametri strutturali obiettivi. Infine solo le interazioni con un'alta affinità di legame e un alto numero di pose nel cluster sono stati valutati.

### 7.2.3 Docking molecolare con le micotossine

Dapprima i docking molecolari sono stati eseguiti impostando la griglia in modo tale che essa includesse l'intera superficie proteica. In seguito sono stati fatti docking molecolari settando la griglia solo sul sito di legame di ogni proteina, che è stato ricavato dal file .pdb; il docking focalizzato sul sito di legame è stato fatto solo tra le proteine e le micotossine che nel docking molecolare presentavano un'elevata affinità di legame e un cluster con un alto numero di pose. Sia nei docking sull'intera superficie proteica sia in quelli sul solo sito di legame, è stato mantenuto il cofattore all'interno della struttura proteica.

### 7.2.4. Docking molecolare con gli antiossidanti

È stato prima fatto un docking molecolare settando la griglia includendo l'intera superficie proteica tra gli antiossidanti e le strutture proteiche che sono state selezionate per ognuno di essi. In seguito sono stati implementati i docking posizionando la griglia solo sul sito di legame, ricavato dal file .pdb, della proteina. I docking focalizzati sul sito di legame sono stati eseguiti sia con che senza cofattore e ioni. Infine, sono stati fatti docking, focalizzati sul sito di legame, tra ogni proteina target e il suo cofattore, quando presente, per valutare una possibile competizione tra il cofattore e il ligando. In base al cofattore sono stati modificati alcuni parametri del docking per mantenere il ligando nella stessa posizione originale; cioè è dovuto alle dimensioni dei cofattori e al numero di legami rotazionali. Un esempio del cambiamento dei parametri del docking si verifica nella simulazione dell'interazione tra il GDP e la proteina GTPasi Kras (codice PDB: 4OBE) dove è stata mantenuta l'acqua nel sito di legame.

### 7.2.5. Analisi funzionale mediante tools bioinformatici

Mediante tools bioinformatici è stata fatta, per i targets proteici selezionati per gli antiossidanti, una validazione funzionale e un'analisi dei loro networks di interazione. Da BioGPS, sono stati estratti i dati dei livelli di espressione dei geni codificanti per i 18 targets leganti gli antiossidanti, nel colon e nell'adenocarcinoma colon-rettale. Per ogni singolo gene è stato estratto dal dataset GeneAtlas U133A il valore di espressione (con deviazione standard) registrato nel colon e nell'adenocarcinoma colon-rettale. I valori sono stati raccolti in tabella per un confronto complessivo.

Per l'analisi dei networks di interazione è stato usato il tool GeneMANIA. Questo strumento è stato preferito perché particolarmente adatto all'analisi di liste contenenti un numero non elevato di geni o proteine [Warde-Farley et al., 2010]. Nella pagina di interfaccia del server sono stati inseriti i simboli dei geni codificanti i 18 targets proteici identificati per gli antiossidanti, e dal menù a tendina è stata selezionata la voce: H. sapiens (human). Il server ha restituito il network in cui sono coinvolti i geni e le loro funzioni.

### 7.3. Metodiche sperimentali

#### 7.3.1. Reagenti utilizzati

La Neurologina 4, X-linked (NLGN4X) e la  $\beta$ -secretasi sono state acquistate dall'Acro Biosystem (Beijing, Cina), mentre l'Acetilcolinesterasi è stata acquistata dalla SIGMA ALDRICH (Milano, Italy).

Le aflatossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, la gliotossina, il deossinivalenolo e l'ocratossina A sono state acquistate dalla OrSell (Limidi di Soliera, Modena).

#### 7.3.2. Dot Blot

La tecnica del Dot-Blot è una tecnica semi-quantitativa, grazie alla quale si riesce ad identificare il legame tra due molecole. Nel nostro studio è stata applicata per valutare l'interazione tra proteine e le micotossine fluorescenti. Prevede di applicare piccoli spot di proteina su una membrana di nitrocellulosa seguito da un tempo di incubazione utile per fissare la proteina alla membrana. Successivamente si applica sullo stesso spot il ligando e si procede con lavaggi veloci della membrana. Se il legame avviene, il ligando resta attaccato alla membrana, e quindi alla proteina, anche dopo i lavaggi. Essendo il ligando fluorescente, il legame si verifica rilevando il segnale di emissione di fluorescenza del ligando.

I saggi di Dot-Blot sono stati applicati per valutare l'interazione tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub> e aflatossina B<sub>2</sub>.

##### **Dot-Blot tra AChE e aflatossina B<sub>1</sub>:**

sulla membrana sono stati fatti cinque spot, di cui tre di 1,5  $\mu$ l di AChE 170 ng/ $\mu$ g, uno con 1,5  $\mu$ l di Hepes (il tampone in cui è sciolta l'AChE) e uno con 1,5  $\mu$ l di aflatossina B<sub>1</sub> 100  $\mu$ M. Dopo un tempo d'incubazione necessario per asciugare la membrana sono stati spottati 1,5  $\mu$ l di aflatossina B<sub>1</sub> 100  $\mu$ M su due spot contenenti AChE. Dopo un lavaggio di 15 minuti in PBS sono stati rilevati i segnali di fluorescenza all'ImageQuant LAS4000, uno strumento sensibile per chemiluminescenza, fluorescenza e transilluminazione UV.

##### **Dot-Blot tra AChE e aflatossina B<sub>2</sub>:**

sulla membrana sono stati fatti cinque spot, di cui tre di 1,5  $\mu$ l di AChE 170 ng/ $\mu$ g e uno con 1,5  $\mu$ l di Hepes (il tampone in cui è sciolta l'AChE) e uno con 1,5  $\mu$ l di aflatossina B<sub>2</sub> 100  $\mu$ M. Dopo un tempo d'incubazione necessario per asciugare la membrana sono stati spottati 1,5  $\mu$ l di aflatossina B<sub>2</sub> 100  $\mu$ M su due spot contenenti AChE. Dopo un lavaggio di 15 minuti in PBS sono stati rilevati i segnali di

fluorescenza all'ImageQuant LAS4000, uno strumento sensibile per chemiluminescenza, fluorescenza e transilluminazione UV.

### 7.3.3. Spettroscopia di Assorbimento

Prima di eseguire una misura in fluorescenza sono stati fatti spettri di assorbimento per NLGN4X, Acetilcolinesterasi e  $\beta$ -secretasi, le tre proteine con cui sono stati eseguiti i saggi di fluorescenza. Gli spettri sono stati ritenuti ottimali quando l'assorbanza della proteina a 295 nm è compresa tra 0.05 e 1.

### 7.3.4. Spettroscopia di Fluorescenza

Mediante saggi di fluorescenza è possibile verificare l'interazione tra due molecole valutando la variazione di intensità di fluorescenza emessa da una molecola fluorescente, quando eccitata a una specifica lunghezza d'onda. In questi saggi è stata sfruttata la capacità di emissione di fluorescenza dei triptofani presenti nelle proteine per valutare l'interazione con le micotossine, a differenti concentrazioni.

Sono stati effettuati saggi di fluorescenza statica per verificare il legame tra NLGN4X, e aflatoossina B<sub>1</sub>, aflatoossina B<sub>2</sub>, gliotossina, ocratossina A e deossinivalenolo, tra Acetilcolinesterasi e aflatoossina B<sub>1</sub> e tra  $\beta$ -secretasi e gliotossina, aflatoossina B<sub>1</sub>, aflatoossina B<sub>2</sub>.

Le indagini di legame tra NLGN4X e le micotossine sono state condotte titolando una soluzione di proteina 1,25  $\mu$ M sciolta in PBS pH 7.4 con quantità crescenti di micotossine alla temperatura di 25°C.

I saggi di fluorescenza con Acetilcolinesterasi e aflatoossina B<sub>1</sub> sono stati effettuati titolando soluzioni di proteina 0,17  $\mu$ g/ul in Hepes 20mM pH 8 con quantità crescenti di micotossine; il saggio è stato condotto a 37°C.

Nei saggio di fluorescenza tra  $\beta$ -secretasi e gliotossina la proteina è concentrata 3,46  $\mu$ M in PBS pH 7.4; nel saggio con aflatoossina B<sub>1</sub> è concentrata 1,6  $\mu$ M in PBS pH 7.4 e nel saggio con aflatoossina B<sub>2</sub> è concentrata 1,2  $\mu$ M in PBS pH 7.4. Tutte le misure sono state eseguite titolando con volumi crescenti di micotossine a 37°C.

Aflatoossina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, gliotossina e ocratossina A sono state solubilizzate in DMSO puro alle concentrazioni di 35,6 mM, 14 mM, 30,6 mM, e 30,8 mM rispettivamente. Il deossinivalenolo è stato solubilizzato in acqua Milli-Q alla concentrazione di 170 mM.

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con lo spettrofluorimetro Jasco eccitando a lunghezza d'onda di 295 nm e raccogliendo l'emissione di fluorescenza nell'intervallo di lunghezza d'onda compresa tra 310 e 500 nm, con slidt 5 nm sia in emissione che in eccitazione.

Per ogni misura lo spettro di emissione di fluorescenza è stato registrato in seguito all'aggiunta della micotossina e dopo aver atteso un tempo d'incubazione pari a 15 minuti.

Ogni spettro è stato rilevato dopo aver agitato con una pipetta Pasteur la soluzione, aspettando circa 20 secondi tra la fine dell'agitazione e l'inizio della misura

I dati sono stati rielaborati con Excel e il calcolo delle costanti di dissociazione è stato effettuato con il software PRISM.

**Misura fluorescenza NLGN4X-Aflatossina B<sub>1</sub>**

Il volume della proteina è 400 µl e la concentrazione della proteina è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di aflatossina B<sub>1</sub> portata alla concentrazione nominale di 2,5 mM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 50 µM di aflatossina B<sub>1</sub>.

**Misura fluorescenza NLGN4X-Aflatossina B<sub>2</sub>**

Il volume della proteina è 200 µl e la concentrazione della proteina è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di aflatossina B<sub>2</sub> portata alla concentrazione nominale di 20 µM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 500 nM di aflatossina B<sub>2</sub>.

**Misura fluorescenza NLGN4X-Gliotossina**

Il volume della proteina è 200 µl e la concentrazione della proteina è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di gliotossina portata alla concentrazione nominale di 50 µM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 10 µM di gliotossina.

**Misura fluorescenza NLGN4X-Ocratossina A**

Il volume della proteina è 200 µl e la concentrazione della proteina è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di ocratossina A portata alla concentrazione nominale di 50 µM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 20 µM di gliotossina.

**Misura fluorescenza NLGN4X-Deossinivalenolo**

Il volume della proteina è 200 µl e la concentrazione della proteina è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di deossinivalenolo portata alla concentrazione nominale di 50 µM in acqua Mill-Q. Le misure sono state registrate da 0 nM a 20 µM di deossinivalenolo.

**Misura fluorescenza Acetilcolinesterasi-Aflatossina B<sub>1</sub>**

Il volume della proteina è 400 µl e la concentrazione è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di aflatossina B<sub>1</sub> portata alla concentrazione nominale di 10 mM in Hepes 20 mM pH 8. Le misure sono state registrate da 0 µM a 7,5 µM di aflatossina B<sub>1</sub>.

**Misura fluorescenza β-secretasi – Gliotossina**

Il volume della proteina è 400 µl e la concentrazione è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di gliotossina portata alla concentrazione nominale di 2,5 mM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 50 µM di gliotossina.

**Misura fluorescenza β-secretasi – Aflatossina B<sub>1</sub>**

Il volume della proteina è 400 µl e la concentrazione è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di aflatossina B<sub>1</sub> portata alla concentrazione nominale di 2,5 mM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 50 µM di aflatossina B<sub>1</sub>.

### Misura fluorescenza $\beta$ -secretasi – Aflatossina B<sub>2</sub>

Il volume della proteina è 400  $\mu$ l e la concentrazione è mantenuta costante. Sono state fatte aggiunte successive di aflatossina B<sub>2</sub> portata alla concentrazione nominale 2,5 mM in PBS. Le misure sono state registrate da 0 a 50  $\mu$ M di aflatossina B<sub>2</sub>.

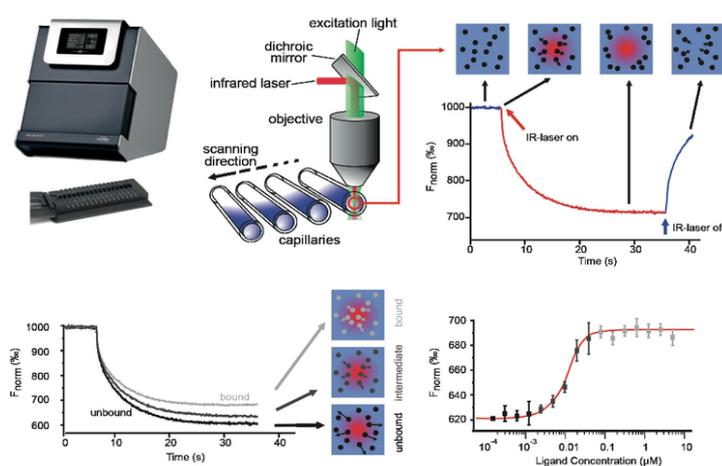
### 7.3.5. Termoforesi su Microscala

La termoforesi su microscala (MST) è una tecnologia utilizzata per l'analisi delle biomolecole. Per termoforesi si intende il movimento di molecole lungo un gradiente termico microscopico, dipendente da carica, dimensione e idratazione della molecola. L'effetto termoforetico consente di determinare affinità di legame, interazioni molecolari e attività cinetiche, mediante la misura della termoforesi.

Il gradiente di temperatura è generato da un laser IR. Il segnale ottenuto da uno strumento di MST si suddivide in diversi step che si susseguono in tempi precisi.

Inizialmente si ha una fluorescenza iniziale e cioè la fluorescenza del campione a temperatura ambiente senza riscaldamento del laser; a  $t = 5$  secondi il laser viene acceso e si osserva un cambiamento della fluorescenza indotta dal riscaldamento del campione a cui segue il movimento termoforetico. Una volta che il laser viene spento si ha una retrodiffusione. Ogni fase permette di ottenere informazioni sull'affinità di legame.

Gli esperimenti di Termoforesi su Microscala sono stati eseguiti con Monolith (Fig. 47).



**Fig. 47:** La soluzione all'interno del capillare è localmente riscaldata con un laser IR focalizzato, che è accoppiato al percorso della luce utilizzando uno specchio caldo. La fluorescenza all'interno del capillare viene ripresa con un fotodiode viene rilevata in tempo. Il laser IR è acceso dopo 5 secondi. La fluorescenza diminuisce all'aumentare della temperatura e le molecole fluorescenti che formano complessi si allontanano dal punto riscaldata a causa della termoforesi [Nano Temper Technologies GmbH: MST Technology].

Con questa metodica sono stati valutati i legami tra acetilcolinesterasi e aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub> e gliotossina e i legami tra NLGN4X e aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub> e gliotossina.

Sia l'acetilcolinesterasi sia la neurologina 4X sono portate a una concentrazione di 100 nM in HEPES pH 8 e in PBS pH 7.4, rispettivamente, mentre la concentrazione delle micotossine varia tra 300 nM e 9 μM. Sono stati preparati 16 campioni, ognuno contenente 10 μl di ligando ad una diversa concentrazione, ma tutti contenenti DMSO all'1%; in seguito sono stati aggiunti ad ogni campione 10 μl di proteina 100 nM. Dopo un breve periodo di incubazione i campioni sono stati caricati in 16 capillari di vetro ed è stata eseguita la misura.

### 7.3.6. Misura di fluorescenza dei triptofani risolta nel tempo e anisotropia

Quando una molecola assorbe un fotone, si può assistere ad una serie di eventi, come il rilassamento vibrazionale o conversione interna (cioè la perdita di energia in assenza di emissione di luce), la fluorescenza, l'incrocio intersistema (che corrisponde al passaggio da uno stato di singoletto a uno stato di tripletto) e la fosforescenza. Questa serie di eventi sono rappresentati nel diagramma di Jablonski (Fig. 48).

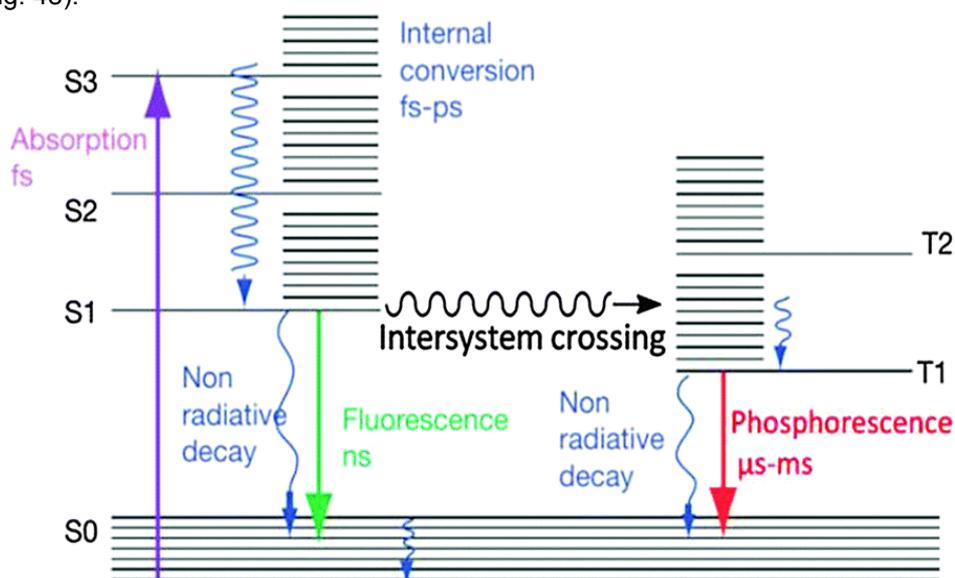


Fig.48: Diagramma di Jablonsky per le molecole organiche [Chen et al. 2015].

Ciascuno dei processi si verifica con una certa probabilità, ed è caratterizzato da costanti di velocità e di decadimento ( $k$ ). La durata media di tempo  $\tau$  per il decadimento delle molecole da uno stato all'altro è reciprocamente proporzionale alla velocità di decadimento:  $\tau = 1/k$ . Il tempo medio di decadimento è definito "lifetime". La durata della fluorescenza è il tempo richiesto da una popolazione di fluorofori eccitati tende a diminuire in modo esponenziale a N/E tramite la perdita di energia attraverso fluorescenza e altri processi non radiativi. La durata dei processi di

fluorescenza varia nell'ordine dei nanosecondi ed è calcolata dalla pendenza della curva di decadimento secondo la seguente equazione:

$$F(t) = F_0 e^{-t/\tau}$$

dove  $F_0$  è l'intensità al tempo  $t = 0$ ,  $t$  è il tempo dopo l'assorbimento e  $\tau$  il tempo medio di fluorescenza [Berezin and Achilefu, 2010].

In presenza di fluorofori, la pendenza del decadimento è meno ripida a causa dell'esistenza di stati eccitati finiti. Così, fluorofori con durata maggiore hanno pendenza maggiore (Fig. 49).

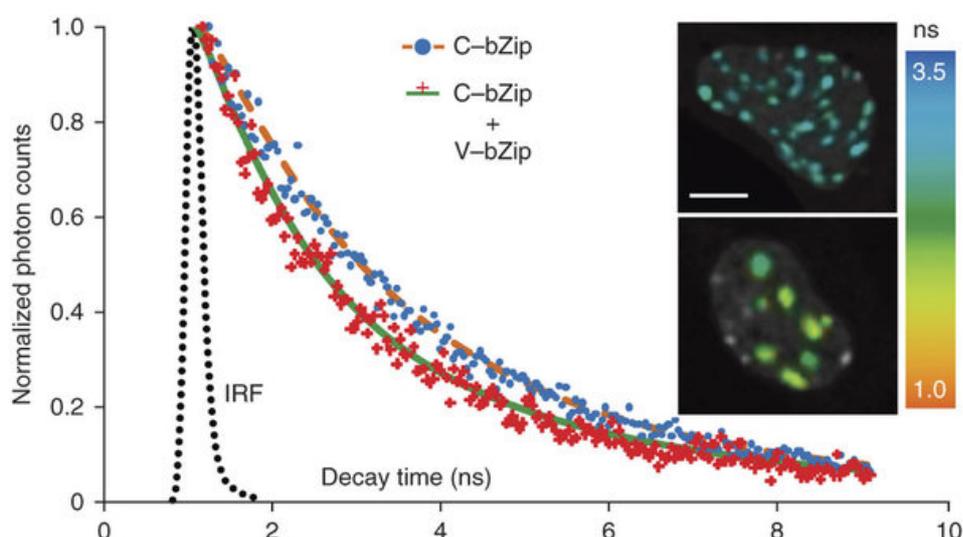


Fig. 49: Esempio di curve di decadimento del lifetime di un fluoroforo [Sun et al., 2011].

La fluorescenza risolta nel tempo rientra nei metodi che permettono di valutare il fenomeno di FRET (Trasferimento di Energia per Risonanza) per determinare la distanza tra le molecole che interagiscono, per lo più proteine, monitorando i cambiamenti di intensità di fluorescenza di una molecola donatore e di una accettore e di studiare le strutture, le interazioni e eventi funzionali tra le molecole. Questo trasferimento di energia può essere misurato direttamente utilizzando la durata della fluorescenza del complesso molecolare, applicando la seguente equazione:

$$E_t = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d},$$

dove  $\tau_{da}$  è il lifetime di fluorescenza del donatore in presenza dell'accettore e  $\tau_d$  è il lifetime di fluorescenza del donatore in assenza dell'accettore [Berezin and Achilefu, 2010].

Oltre a misurare il lifetime, la fluorescenza risolta nel tempo è utilizzata per identificare altre caratteristiche importanti dei fluorofori, come la velocità di rotazione delle molecole e l'interazione tra due molecole. Nella tecnica di anisotropia di

fluorescenza (chiamata anche polarizzazione di fluorescenza), il fluoroforo viene irradiato con luce polarizzata linearmente utilizzando un filtro di polarizzazione. L'intensità di fluorescenza risultante viene misurata attraverso un altro filtro di polarizzazione posto davanti al rivelatore, prima orientato in parallelo ( $F_{\parallel}$ ) e poi in perpendicolare ( $F_{\perp}$ ). L'anisotropia fluorescente  $r$  può essere determinata dall'equazione:

$$r = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}}$$

dove  $F_{\parallel}$  è l'intensità di fluorescenza con i 2 filtri di polarizzazione posti in parallelo tra loro e  $F_{\perp}$  è l'intensità di fluorescenza con i due filtri in perpendicolare tra loro. Essa dipende dalla durata della fluorescenza e dal tempo di correlazione rotazionale delle molecole.

Allo scopo di verificare l'interazione e per valutare il possibile trasferimento di energia ottenuto dagli esperimenti di fluorescenza statica, tra NLGN4X e aflatossina  $B_2$  e quella tra NLGN4X e ocratossina, sono state eseguite misure di fluorescenza statica e dinamica nel dominio del tempo dei residui di triptofano, in parallelo. I saggi hanno permesso di valutare la variazione di intensità di fluorescenza e dell'anisotropia statica dei ligandi, utilizzando il fluorimetro FluoTime 300 (PicoTime) (Fig. 50).



Fig. 50: Immagine del Fluorimetro FluoTime300

Le misure sono state fatte titolando 200  $\mu$ l di proteina NLGN4X 1,3  $\mu$ M con aggiunte successive di ligando per ottenere concentrazioni da 0 nM a 750 nM.

La lunghezza d'onda di eccitazione per la misura d'intensità di fluorescenza dei Trp è 290 nm e l'emissione è stata raccolta nell'intervallo di lunghezza d'onda 300-500 nm.

Il lifetime dei residui di Trp è stato osservato a 340 nm con il polarizzatore orientato all'angolo magico, che corrisponde a 54,7°.

La lunghezza d'onda di eccitazione per la misura d'intensità di fluorescenza dei ligandi (aflatossina  $B_2$  e ocratossina A) è 360 nm e l'emissione è stata raccolta nell'intervallo di lunghezza d'onda 405-600 nm.

La lunghezza d'onda di eccitazione per la misura dell'anisotropia dei ligandi è 340 nm e l'emissione è stata raccolta a 450 nm con il polarizzatore prima in posizione verticale (VV) e poi orizzontale (VH).

L'anisotropia è stata calcolata usando la formula:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}G}{I_{VV} + 2I_{VH}G}$$

dove  $I_{VV}$  è l'intensità di fluorescenza misurata con il polarizzatore orientato parallelamente al percorso di osservazione,  $I_{VH}$  è l'intensità di fluorescenza misurata con il polarizzatore orientato perpendicolarmente al percorso di osservazione e G è il fattore di correzione.

L'analisi dei dati è stata effettuata usando il software Easytau (PicoQuant).

**Bibliografia**

Abba Y., Hassim H., Hamzah H. and Noordin M.M., **2015**. Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Advances in Virology* **2015**, 1-7.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J., **1990**. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M.J., Natale D.A., O'Donovan C., Redaschi N. and Yeh L.S., **2004**. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115-119.

Ashwood P. and Van De Water J., **2004**. A review of Autism and the Immune Response. *Clin. Develop. Immunol.* **11**, 165–174.

Ashwood P., Anthony A., Torrente F. and Wakefield A.J., **2004**. Spontaneous Mucosal Lymphocyte Cytokine Profiles in Children with Autism and Gastrointestinal Symptoms: Mucosal Immune Activation and Reduced Counter Regulatory Interleukin-10. *J. Clin. Immunol.* **24**, 664-673.

Astoreca A.L., Magnoli C.E. and Dalcerro A.M., **2010**. Ecophysiology of *Aspergillus* Section *Nigri* Species Potential Ochratoxin A Producers. *Toxins* (Basel) **2**, 2593–2605.

Athar M., Back J.H., Tang X., Kim K.H., Kopelovich L., Bickers D.R. and Kim A.L., **2007**. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**, 274-283.

Aureli G., Quaranta F, Amoriello T, Melloni S, Desiderio E, D'Egidio MG, **2010**. Studio triennale sulla contaminazione da deossinivalenolo (DON) nel frumento duro in coltivazione biologica e convenzionale. *Ital. J. Agron.* **4**, 353-366.

Bak M.J., Jun M. and Jeong W.S., **2012**. Procyanidins from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Seeds Regulate ARE-Mediated Enzyme Expression via Nrf2 Coupled with p38 and PI3K/Akt Pathway in HepG2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 801–818.

Bennett L.L., Rojas S. and Seefeldt T., **2012**. Role of antioxidants in the prevention of cancer, *J. Exp. Clin. Med.* **4**, 215-222.

Berezin M.Y. and Achilefu S., **2010**. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684.

Betina V., **1984**. Biological effects of mycotoxins. In: Betina V (Ed.), *Mycotoxins production, Isolation, Separation and Purification*. *Elsevier*, 25-26.

Bok J., DaWoon Chung D., Balajee S.A., Kieren A., Marr, K.A., Andes D., Nielsen C.F., Frisvad J.C., Kirby K.A. and Keller K.P., **2006**. GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Infect. Immun.* **7**, 6761-6768.

Boyer J., and Liu R.H., **2004**. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrit. J.* **3**, 5.

Carratù B., and Sanzini E. **2005**. Composti Bioattivi della dieta. *Ann. Ist. Super. Sanità* **41**, 7-16.

Castoria R., Wright S A.I., and Droby S., 2008. Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits, *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*.Ch. **16**, 311-333.

Chen J., Yu S., Fu Y., and Li X., **2014**. Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 276.

Chen Y., Bai Y., Han Z., He W. and Guo Z., **2015**. Photoluminescence imaging of Zn<sup>2+</sup> in living systems. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4517-4546.

Ciegler A., Beckwith A. C., and Jackson L.K., **1976**. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 664–667.

Collins S.M., Surette M. and Bercik P., **2012**. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Rev. Microbiol.* **10**, 735-742.

Corrêa Lima M.P., and Gomes-da-Silva M.H., **2005**. Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. *Nutr. Hosp.* **20**, 235-241.

de Pascual-Teresa S., Moreno D.A. and García-Viguera C., **2010**. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1679–1703.

De Santis B., **2009**. Micotossine e autismo. III Congresso Nazionale: le micotossine lungo la filiera agro-alimentare e zootecnica. *Ist. Super. Sanità*, 28-30 Settembre 2009.

Di Costanzo L., Drury J.E., Penning T.M., and Christianson D.W. **2008**. Crystal structure of human liver Delta4-3-ketosteroid 5beta-reductase (AKR1D1) and implications for substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 16830-16839.

Ehrenkranz JR, Norman L., Kahn G., and Roth J., **2005**. Phlorizin: a Review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **21**, 31-38.

Ferrieri F., Amenduni C., Battista N., Brunetti A., Corte G., Intini N., Leonetti E., Lo Greco F., Palma M., Santoro T. and Monitoraggio F., 2011. Monitoraggio della

contaminazione da micotossine in prodotti alimentari: attività 2008-2010 del polo alimenti ARPA Puglia-Bari. [www.foodchem.it](http://www.foodchem.it).

Fimognari C., Lenzi M., Sestili P., Turrini F., Ferruzzi L., Hrelia P., and Cantelli-Forti G., **2012**. Sulforaphane potentiates RNA damage induced by different xenobiotics; *PLoS One* **7**(4).

Fombonne E., **2009**. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* **65**, 591-598.

Forwood J.K., Lonhienne T.G., Marfori M., Robin G., Meng W., Guncar G., Liu S.M., Stewart M., Carroll B.J., and Kobe B., **2008**. Kap95p binding induces the switch loops of RanGDP to adopt the GTP-bound conformation: implications for nuclear import complex assembly dynamics. *J. Mol. Biol.* **383**, 772-782.

Fraunberger E.A., Scola G., Lalibertè V.L.M., Doung A., and Andreatza A.C., **2016**. Redox Modulations, Antioxidants and Neuropsychiatric Disorders. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 4729192.

Fung F. and Richard F.C., **2004**. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **42**, 217-234.

Galvano F., La Fauci L., Vitaglione P., Fogliano V., Vanella L. and Felgines C., **2007**. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Ann. Ist. Super. Sanità* **43**, 4, 382-393.

Gardiner D.M., Waring P., and Howlett B.J., **2005**. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **151**, 1021-1032.

Gardiner D.M., and Howlett B.J., **2005**. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **248**, 241-248.

Genuis S.J., and Lobo R.A., **2014**. Gluten Sensitivity Presenting as a Neuropsychiatric Disorder. *Gastroenterol. Res. and Pract.* **2014**.

Gerhauser C., **2008**. Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components. *Planta Med.* **74**, 1608-1624.

Giammanco M., Majo D.D., Leto G., Flandina C., Piazza M.D., and Guardia M.L., **2012**. The role of vitamin K in bone remodeling and osteoporosis. *J. Food Res.* **1**, 106.

Giovannini C., Filesi C., D'Archivio. M., Scazzocchio B., Santangelo C. and Masella R., 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *Ann. Ist. Super. Sanità* **3**, 336-347.

Goines P.E., and Ashwood P., **2013**. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicol. Teratol.* **36**, 67–81.

Görlach A., Dimova E.Y., Petry A., Martínez-Ruiz A., Hernansanz-Agustín P., Rolo A.P., Palmeira C.M., and Kietzmann T., **2015**. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol.* **6**, 372–385.

Graf B.A., Milbury P.E. and Blumberg J.B., **2005**. Blumberg, Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J. Med. Food* **8**, 281-290.

Greco M.V., Franchi M.L., Rico Golba S.L., Pardo A.G., and Pose G.N., **2014**. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *Sci. World J.* **2014**.

Gunnaiah R., and Kushalappa A.C., **2014**. Metabolomics deciphers the host resistance mechanisms in wheat cultivar Sumai-3, against trichothecene producing and non-producing isolates of *Fusarium graminearum*. *Plant Physiol. Biochem.* **83**, 40-50.

Hada B., Yoo M.R., Seong K.M., Jin Y.W., Myeong H.K., and Min K.J., **2010**. D-chiro-Inositol and Pinitol extend the life Span of *Drosophila melanogaster*. *J. Gerontol. A Biol. Med. Sci.* **68**, 226-234.

Hamamoto R., and Nakamura Y., **2016**. Dyregulation of protein methyltransferases in human cancer: an emerging target class for anticancer therapy. *Cancer Sci.* **2016**, 1-8.

Heneman K., Zidenberg-Cherr S., **2008**. Nutrition and Health Info-Sheet for health professionals. *University of California, Davis, CA*.

Holzer P. and Farzi A., **2014**. Neuropeptides and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **817**, 195–219.

Horváth E., Papp G., Belágyi J., Gazdag Z., Vágvölgyi C., and Pesti M., **2010**. *In vivo* direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1898-1904.

Hu Y.J., Chao-Hui C., Zhou S., Bai A.M., and Ou-Yang Y., **2011**. The specific binding of chlorogenic acid to human serum albumin. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 2781-2787.

- Ibrahim S.H., Voigt R.G., Katusic S.K., Weaver A.M., and Barbaresi W.J., **2009**. Incidence of Gastrointestinal Symptoms in Children: A Population-Based Study. *Pediatrics*, **124**, 680–686.
- Illichev Y.V., Perry J.L., Rüker F., Dockal M., and Simon J.D., **2002**. Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 275–293.
- Jones M.P., Dille J.B., Drossmanà D., and Crowell M.D., **2006**. Brain–gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroenterol. Motil.* **12**, 91-103.
- Kalnina N., Chen X., Rolfs A., Halleck A., Hines L., Eisenstein S., Koundinya M., Raphael J., Moreira D., Kelley T., LaBaer J., Lin Y., Phelan M., Farmer A., **2003**. Cloning of human full-length CDSs in BD Creator(TM) system donor vector. *EMBL/GenBank/DDBJdatabases*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Kim S., McEwen L.R., Stuart R.B., Thiessen P.A., Gindulyte A., Zhang J., Bolton E.E., Bryant S.H., **2015**. PubChem Laboratory Chemical Safety Summary. *ACS. CHED. CCCE Newsletter* **3**, 1-10.
- Koch T.C., Brivida K., Watzl B., Fähndrich C., Bub A., Rechkemmer G., Barth S.W., **2009**. Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: impact of juice constituents and obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1289-1302.
- Lawely R., **2013**. Listeria. *Food Safety Watch, The science of safe food. Cap. 1*.
- Leopoldini M., Marino T., Russo N., and Toscano M., **2004**. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atoms versus electron transfer mechanism. *J Phys. Chem. A*, **108**, 4916-4922.
- Lim T.K., **2012**. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants, *Fruits* **4**, 1-911.
- Louis P., **2012**. Does the Human Gut Microbiota Contribute to the Etiology of Autism Spectrum Disorders? *Dig. Dis. Sci.* **57**, 1987–1989.
- Lupieri P., **2006**. Approcci di “docking” molecolare alle interazioni biologiche rilevanti per la terapia di cattura di neutroni su boro “bnct”. **Cap.3**, 14-21.
- Lucarelli S., Frediani T., Zingoni AM., Ferruzzi F., Giardini O., Quintieri F., Barbato M., D’Eufemia P., and Cardi E., **1995**. Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med.* **37**, 137-141.
- Manners J. G., **1993**. Invasion of the host plant and damage to host tissues. In: *Principles of plant pathology. Cap. 8*, 79-101.

Maresca M., **2013**. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins (Basel)* **5**, 784–820.

Mari A., Tedesco I., Nappo A., Russo G.L., Malorni A., Carbone V., **2010**. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca apple, a southern cultivar. *Food Chem.* **123**, 157-164.

Martins I.M., **2015**. Overnutrition Determines LPS Regulation of Mycotoxin Induced Neurotoxicity in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 29554–29573.

Matta A., Luisoni E., and Surico G., **1996**. *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore, 94-107.

McKinley E. R., and Carlton W. W., **1991**. Patulin. In: *Mycotoxins and phytoalexins* Sharma, R.P., and Salunkhe, D.K., Eds., 191-236.

Mezzelani A., Landini M., Facchiano F., Raggi M.E., Villa L., Molteni M., De Santis B., Brera C., Caroli A.M., Milanesi L., and Marabotti A., **2015**. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: A translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutr. Neurosci.* **4**, 145-161.

Moake M.M., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W., **2005**. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **1**, 8–21.

Mochly-Rosen D., and Zakhari S., **2010**. Focus on: The cardiovascular system: what did we learn from the French (Paradox)? *Alcohol Res. Health* **33**, 76-86.

Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., and Olson A.J., **2009**. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2789.

Mut-Salud N., Álvarez PJ, Garrido JM, Carrasco E., Aránega A. and Rodriguez-Serrano F., **2015**. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1-19.

Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni A., Fogliani V., **2004**. Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J. Agricult. Food Chem.* **52**, 6526–6531.

Nervi C., De Marinis E., and Codacci-Pisanelli G., **2015**. Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials. *Clin. Epigenetics* **10**, 7-127.

Olthof M.R., Hollman P.C., Zock P.L and Katan M.B., **2001**. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 532-538.

- Peraica M., Radic B., Lucic A. and Pavlovic M., **1999**. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* **77**, 754-766.
- Perez-Vizcain F., and Duarte J., **2010**. Flavonol and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* **31**, 478-494.
- Pestka J.J., **2008**. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam. Part A.* **25**, 1128–1140.
- Placinta C.M., D'Mello J.P.F, and MacDonald A.M.C., **1999**. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **78**, 21–37.
- Prelusky D.B., Scott P.M., Trenholm H.L., and Lawrence G.A., **1990**. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B.* **25**, 87-103.
- Puel O., Galtier P., and Oswald I. P., **2010**. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* **2**, 613-631.
- Quaderni del ministero della Salute, **2015**. Nutrire il pianeta, nutrirlo in salute. Equilibri nutrizionali di una sana alimentazione, ISSN: 2038-5293.
- Quideau S., Deffieux C., Douat-Casassus, and Pouységú L., **2011**. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie. Intl. Ed.* **50**, 586-621.
- Rampazzo C., Tozzi MG, Dumontet C., and Jordjeim LP., **2015**. The druggability of intracellular nucleotide-degrading enzymes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* Epub ahead of print.
- Reddy L., and Bhoola K., **2010**. Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins* **2**, 771-779.
- Michell R.H., **2008**. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 151-161.
- Sajjadi S.M., Abdollahi H., Rahmanian R., and Bagheri L., **2016**. Quantifying aflatoxins in peanuts using fluorescence spectroscopy coupled with multi-way methods: Resurrecting second-order advantage in excitation–emission matrices with rank overlap problem. *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* **156**, 63–69.
- Scafuri B., Facchiano A., Marabotti A., **2015**. Inverse docking approaches. In: A transfer of in Silico Methods Applications, Medicinal Chemistry to Food Science. *Nova Publishers Cap.* **5**, 81-105.
- Schmidt-Heydt M., Cramer B., Graf I., Lerch S., Humpf H. and Geisen R., **2012**.

Wavelength-Dependent Degradation of Ochratoxin and Citrinin by Light *in Vitro* and *in Vivo* and Its Implications on *Penicillium*. *Toxins* **4**, 1535-1551.

Schoonbeek H., Del Sorbo G., and De Waard M.A., **2001**. The ABC Transporter BcatrB Affects the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to the Phytoalexin Resveratrol and the Fungicide Fenpiclonil. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **14**, 562-571.

Shaffer D., Campbell M., Bradley S.J., Dennis P. Cantwell, Gabrielle A. Carlson G.A., Cohen D.J., Garfinkel B., Klein R., Lahey B., Loeber R., Newcorn J., Paul R., Rapoport J.H.L., Rutter M., Volkmar F., and Werry J.S., **1994**. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, **Cap. 4**, 37-122.

Shattock, P., and Whiteley, P., **2002**. Biochemical aspects in autism spectrum disorders: updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biomedical intervention. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**, 175–183.

Sica D., and Zollo F., **2007**. Chimica dei composti eterociclici farmacologicamente attivi. *Piccin*.

Singh SK, Eroglu C. **2013**. Neuroligins provide molecular links between syndromic and nonsyndromic autism. *Sci Signal.* **6**, re4.

Soreq H., Ben-Aziz R., Prody C.A., Seidman S., Gnatt A., Neville L., Lieman-Hurwitz E., Lev-Lehman E., Ginzberg D., Lapidot-Lifson Y., and Zakut H., **1990**. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9688-9692.

Sun Y., Day R.N. and Periasamy A. **2011**. Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Protocols* **6**, 1324–1340.

Traar V., **2013**. Mycotoxins - a hazard in food and feed production. *All about feed* **21**, 30-31.

Uauy R. and Solomons N., **2005**. Diet, Nutrition, and the Life-Course Approach to Cancer Prevention, International conference on Diet, Nutrition, and Cancer. *J. Nutr.* **135**, 2934S-2945S.

Valicenti-McDermott M., McVicar K., Rapin I., Wershil BK, Cohen H., and Shinnar S., **2006**. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **27**(2 Suppl), S128–136.

van De Sande M.M.H., van Buul V.J. and Brouns F.J.P.H., **2014**. Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutrition Res. Rev.* **7**, 87-101.

Vannozzi G., **2009**. Lineamenti di dietoterapia e nutrizione clinica. Cap 2, 19-66

- Vauzour D., Rodriguez-Mateos A., Corona G., Oruna-Concha M.J., and Spencer J.P. E., **2010**. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients* **2**, 1106–1131.
- Vojdani A., O'Bryan T., Green J.A., McCandless J., Woeller K.N., Nourian A.A., and Cooper E.L., **2004**. Immune Response to Dietary Proteins, Gliadin and Cerebellar Peptides in Children with Autism. *Nutr. Neurosci.* **7**, 151-161.
- Wang J.C., Chu P.Y., Chen C.M., and Lin J.H., **2012**. idTarget: a web server for identifying protein targets of small chemical molecules with robust scoring functions and a divide-and-conquer docking approach. *Nucleic Acids Res.* **40**, W393-W399.
- Wang X.D., **1994**. Absorption and metabolism of beta-carotene. *J Am. Coll. Nutrit.* **13**, 314-25.
- Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O., Zuberi K., Badrawi R., Chao P., Franz M., Grouios C., Kazi F., Lopes C.T., Maitland A., Mostafavi S., Montojo J., Shao Q., Wright G., Bader G.D. and Morris Q., **2010**. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucl. Acids Res.* **38**(suppl 2), W214-W220.
- Whiteley P., Shattock P., Knivsberg AM, Seim A., Reichelt KL, Todd L., Carrand K. and Hooper M., **2013**. Gluten and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front. Hum. Neurosci.* **6**, 344, 1-8.
- Wu C., MacLeod I., and Su A.I., **2013**. BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information. *Nucl. Acids Res.* **41**, D561-D565.
- Wu C., Orozco C., Boyer J., Leglise M., Goodale J., Batalov S, Hodge C.L., Haase J., Janes J., Huss J.H. and Su I.A., **2009**. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* **10**, R130.
- Xue M., Lai SC., and Wang L.J., **2015**. Non-invasive DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. *J. Dig. Dis.* **16**, 699-712.
- Zagon IS., **1987**. Endogenous opioids, opiod receptors and neuronal development. *Nida Res. Monogr.* **78**, 61-71.
- Zain M.E., **2011**. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem. Soc.* **15**, 129–144.
- Zepnik H., I Pa'bler A., Schauer U. and Dekant W., **2000**. Ochratoxin A-Induced Tumor Formation: Is There a Role of Reactive Ochratoxin A? *Toxicol. Sci.* **59**, 59-67.
- Zhou L., and Foster J.A., **2015**. Psychobiotics and the gut–brain axis: in the pursuit of happiness. *Neuropsych. Dis. Treat.* **11**, 715–723.

Zulueta A., Caretti A., Signorelli P., Ghidoni R. **2015**. Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **7**, 10636-10643.