

Università degli Studi del Piemonte Orientale
"A. Avogadro"
Facoltà di medicina e Chirurgia
Dottorato in Medicina Molecolare- ciclo XVII

Relazione annuale, A.A: 2004-2005
IV anno

STUDIO DELLA RELAZIONE TRA AUTOFAGIA E MORTE CELLULARE IN MODELLI DI
NEURODEGENERAZIONE "IN VITRO"

Tutor: Prof. Ciro Isidoro

Candidata: Roberta Castino

INTRODUZIONE GENERALE

I lisosomi e l'autofagia

I lisosomi, gli organuli con la maggiore concentrazione di proteasi e altri enzimi idrolitici nella cellula (De Duve, 1983), sono principalmente responsabili del mantenimento dell'omeostasi macromolecolare cellulare attraverso la degradazione di materiale trasportato in questi compartimenti (Mitchener et al., 1976; Knecht et al., 1984). Il materiale da degradare viene trasportato attraverso tre vie ai lisosomi (Castino et al., 2003): 1. la microautofagia, mediante la quale porzioni di citoplasma sono direttamente intrappolate da evaginazioni della membrana lisosomica (Dunn, 1994); 2. un meccanismo mediato dalla chaperone hsc73 che utilizza la proteina di membrana lisosomica LAMP2 come recettore per traslocare proteine citosoliche aventi al C-terminale la sequenza KFERQ (Cuervo e Dice, 1998; Cuervo et al., 2003) e 3. la macroautofagia, per mezzo della quale interi organelli vengono inglobati da membrane originate dal reticolo endoplasmatico o dal TGN (Kim e Klionsky, 2000). In tutte le cellule eucariote l'autofagia basale assicura il turnover fisiologico delle strutture invecchiate, contribuendo così all'equilibrio omeostatico tra sintesi proteica e biogenesi di organelli e degradazione proteica e rinnovo di organelli (Dunn, 1994). La macroautofagia (da qui in avanti autofagia, indicata con l'abbreviazione "atg") è certamente il processo di degradazione principale. L'atg è soggetta a rapida modulazione a seconda delle condizioni micro-ambientali in cui viene a trovarsi la cellula: essa aumenta in presenza di stress citotossici (Lemasters et al., 1998; Castino et al., 2005a) e in carenza di nutrienti (Kopitz et al., 1990; Munafo e Colombo, 2001) ed è ridotta in risposta a stimoli proliferativi (es. fattori di crescita) (Ballard, 1985).

L'autofagia è un complesso processo cellulare che coinvolge riarrangiamenti dinamici delle membrane. Originariamente fu descritta come la risposta cellulare alla mancanza di nutrienti. In cellule di mammifero private di siero e aminoacidi appaiono rapidamente vescicole nel citosol. Queste vescicole dette autofagosomi hanno una vita media di pochi minuti in quanto rapidamente fondono con i lisosomi. L'autofagia è probabilmente il meccanismo principale per la degradazione di proteine a lunga vita e il solo meccanismo per il turnover di organuli quali mitocondri e perossisomi. Sebbene il turnover di organuli avvenga generalmente in modo non selettivo, la degradazione dei perossisomi attraverso un processo noto come "pexofagia" può essere altamente selettivo. Il meccanismo di pexofagia dei perossisomi è stato mostrato nei lieviti così come nelle cellule di mammifero. L'autofagia inizia con l'intrappolamento di una porzione di citoplasma che può includere un intero organello in una vescicola a doppia membrana, che generalmente deriva dal

reticolo endoplasmatico (Dunn, 1990; Bohley e Seglen, 1992) e probabilmente anche dal Trans Golgi Network (TGN) (Kihara et al., 2001) per formare il vacuolo autofagico (fig. 1). Il passaggio successivo prevede la fusione del vacuolo autofagico con il lisosoma e rilascio del corpo autofagico. Il processo autofagico è finemente regolato a vari livelli da protein e lipido-kinasi (es. PI3K, AKT/PKB) e fosfatasi (es. PTEN, PP2A) e da altre proteine che formano complessi regolatori con questi enzimi (es. Beclin) (Klionski e Emr, 2000, Kim e Klionski, 2000).

Autofagia e morte cellulare programmata

Sulla base delle caratteristiche morfologiche e biochimiche si distinguono tre principali modalità di morte: la necrosi, l'apoptosi (o morte cellulare programmata di tipo I) e la morte autofagica (o morte cellulare programmata di tipo II)(Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Zakeri et al., 1995). La necrosi è associata a perdita dell'integrità della membrana e distruzione delle strutture cellulari; l'apoptosi è caratterizzata da deidratazione cellulare e condensazione citoplasmatica; la morte cellulare autofagica è caratterizzata dalla presenza nel citoplasma di vacuoli autofagici che pure, come nel caso dell'apoptosi determinano la riduzione del contenuto cellulare e del volume (Schweichel e Merker,1973; Zakeri et al., 1995). Inizialmente si riteneva che i lisosomi avessero un ruolo (passivo) soltanto nella necrosi. Le ricerche degli ultimi anni hanno chiaramente dimostrato una partecipazione attiva dei lisosomi (in particolare delle catepsine B e D) nell'apoptosi indotta da citochine citotossiche e da molti farmaci antitumorali (Deiss et al., 1996; Giucciardi et al., 2000; Demoz et al., 2002; Turk et al., 2002). La morte cellulare autofagica, in cui pure i lisosomi sono evidentemente coinvolti, sopravviene quando il processo autofagico, che entro certi limiti svolge un ruolo protettivo, sfugge ad ogni controllo (Bursch, 2000; Castino et al., 2005a).

La morte autofagica è associata con una aumentata regolazione dell'autofagia che porta ad una incontrollata degradazione di strutture cellulari da parte di idrolasi lisosomiche, prevalentemente catepsine (Bursch et al., 2000).

Questo tipo di morte cellulare è stato osservato, per esempio, in cellule di carcinoma mammario trattate con tamoxifene (Bursch et al., 1996) e in cellule di leucemia linfoblastica trattate con TNF α (Jia et al., 1997).

Autofagia e malattie neurodegenerative

Molte malattie neurodegenerative sono la conseguenza di neurodegenerazione e morte cellulare dei neuroni (Mattson, 2000). Un dato costante in malattie neurodegenerative quali la

Sindrome di Alzheimer, il morbo di Parkinson o la Corea di Huntington è la presenza di vacuoli autofagici nei neuroni interessati dalla patologia (Anglade et al., 1997; Nixon et al., 2000; Kegel et al., 2000). Nei neuroni che esprimono la proteina mutata ATM, causa dell'Atassia-Teleangectasia, o la proteina prionica mutata, causa dell'encefalopatia spongiforme, si osserva l'accumulo di un gran numero di lisosomi giganti (Barlow et al., 2000; Laszlo et al., 1992). I neuroni striatali di topi transgenici che iper-esprimono la proteina "huntingtina" se stimolati con dopamina elevano i tassi di autofagia con aumento dei numeri di lisosomi e infine vanno incontro a morte cellulare non-apoptotica (Petersen et al., 2001). La stessa sorte succede a neuroni che iperesprimono l'alfa-sinucleina (la proteina che accumula nei corpi di Lewy e che è direttamente coinvolta nella patogenesi del morbo di Parkinson) sottoposti a stress da dopamina (Gomez-Santos et al., 2003). L'importanza della proteolisi lisosomica mediata dalle catepsine B e D nella sopravvivenza e nella morte cellulare dei neuroni è dimostrata dal fatto che la totale inibizione di una sola delle due proteasi lisosomiche provoca la morte apoptotica di cellule di neuroblastoma (Castino et al., 2002).

Lisosomi e autofagia nell'invecchiamento neuronale

Anche la proteolisi lisosomica sembra essere implicata nell'invecchiamento di molti tipi cellulari e tissutali (Bahr and Nendiske 2002; Lynch and Bi 2003). Tra gli aspetti da prendere in considerazione vi sono la stabilità lisosomica, il danneggiamento dei sistemi coinvolti nel trasporto di macromolecole ai lisosomi, e l'alterazione dell'espressione di proteasi lisosomiche. Alcuni studi, ad esempio, hanno dimostrato che durante il normale invecchiamento neuronale si osserva un notevole incremento dell'espressione di catepsina D e catepsina E (Bahr and Nendiske 2002; Dunlop et al 2002; Lynch and Bi 2003).

Data l'importanza dei lisosomi nella degradazione dei complessi macromolecolari, la perdita della loro attività potrebbe determinare un rapido aumento dell'ossidazione proteica e della formazione di aggregati. La somministrazione di inibitori lisosomici è sufficiente per indurre patologie correlate all'età.

Inoltre, studi in vitro, hanno evidenziato il ruolo della proteolisi lisosomica nella regolazione del turn-over dell' α -sinucleina .

Condizioni, infatti, che determinino un'alterazione del processo lisosomico possono favorire l'accumulo di α -sinucleina (Gomez-Santos et al 2003; Stefanis, Larsen et al 2001).

Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo dell'inibizione lisosomica sia nell'indurre l'accumulo di lipofuscine (Terman and Brunk 1998; Szweda et al 2003) che nell'aumentare l'effetto che lo stress ossidativo ha nell'indurre l'accumulo di lipofuscine (Sundelin, Nilsson and Brunk 2001).

Anche la macroautofagia sembra avere un ruolo nella morte neuronale.

Molti studi mettono in evidenza l'associazione tra un'eccessiva attivazione della macroautofagia e l'insorgenza di alcune patologie del SNC quali le sindromi di Huntington, di Alzheimer e di Parkinson (Bahr and Bendiske 2002; Larsen and Sulzer 2002).

I PARTE: Il Diabete insipido familiare neuroipofisario

Il diabete insipido familiare neuroipofisario (FNFI) è una malattia autosomica dominante ereditaria che si manifesta nella prima infanzia con eccessiva sete e diuresi come conseguenza di una progressiva perdita di secrezione dell'ormone vasopressina dai terminali nervosi ipotalamici.

E' stato dimostrato che mutazioni nel gene della vasopressina possono essere causa di FNFI (Hansen et al., 1997). La vasopressina è un peptide neuroendocrino prodotto nei nuclei dei neuroni ipotalamici. Ha una struttura analoga a quella dell'ossitocina (i due geni sono situati molto vicini nel genoma; sono separati da una sequenza intergenica di 11 kbp nel ratto e di 3 kbp nel topo). La vasopressina è sintetizzata come prepropeptide nei neuroni magnocellulari i cui corpi cellulari sono localizzati nei nuclei sopraottici (SON) e nei nuclei paraventricolari (PVN) del sistema ipotalamico. Dopo la traslocazione nel reticolo endoplasmatico, il propeptide viene trasferito all'apparato di Golgi e nel TGN viene incluso in granuli densi della via secretoria. Un ulteriore passaggio di maturazione avviene quando i granuli sono trasportati lungo gli assoni dal corpo cellulare ai terminali nervosi. Qui, il peptide viene mantenuto e mobilizzato solo quando ne viene richiesta la secrezione.

Nel laboratorio del Prof. Murphy, dove ho trascorso 18 mesi durante il secondo e il terzo anno di Dottorato, abbiamo generato un modello in vitro che riproduce il fenotipo cellulare descritto nei neuroni di ratti transgenici FNFI. Questi ratti, prodotti nel laboratorio del Prof Murphy esprimono il gene 3-VCAT-3-Cys67Stop che codifica per una vasopressina troncata omologo a quella riscontrata in una forma di FNFI dell'uomo (Cys67stop), e presentano i sintomi del diabete insipido neuroipofisario. L'ibridazione in situ ha dimostrato l'espressione cellula-specifica del transgene nei neuroni ipotalamici magnocellulari sopraottici (SON) e paraventricolari (PVN) dei ratti FNFI. L'RNA transgenico è tradotto in un peptide che viene rilevato nei corpi cellulari di SON e PVN, ma non nei prolungamenti neuritici di ratti deidratati, usando uno specifico anticorpo che riconosce unicamente un epitopo inserito al carbossiterminale della vasopressina Cys67Stop troncata. L'induzione della proteina Cys67Stop determina nei neuroni la comparsa di strutture vescicolari dilatate nel corpo cellulare che sono riconosciute da anticorpi specifici per il reticolo

endoplasmico. La microscopia elettronica evidenzia una tipica morfologia riconducibile alla presenza di vescicole autofagiche.

II PARTE: Lo stress ossidativo

Lo stress ossidativo è considerato uno dei principali mediatori del declino delle funzioni cellulari che si osserva progressivamente durante l'invecchiamento. Esso provoca l'aumento, all'interno di una cellula o di un tessuto, dei livelli di proteine, lipidi e acidi nucleici ossidati.

In seguito all'esposizione con specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) le proteine possono andare incontro a numerose modificazioni post-trascrizionali tra cui: ossidazione degli aminoacidi, racemizzazione e deaminazione dei residui di acido aspartico e/o di asparagina, e ossidazione dei gruppi sulfidrilici (Agarwal 1994; Davies 1987; Sohal 2002; Stadtman et Levine 2000).

Le alterazioni proteiche così formatesi a causa dello stress ossidativi favoriscono le interazioni, non specifiche, proteina-proteina che a loro volta promuove la formazione di aggregati proteici insolubili (Agarwal and Sohal 1994; Squier 2001; Stadtman and Levine 2000), che possono alterare l'omeostasi cellulare e il traffico vescicolare (Butterfield & Kanski 2001; Goldberg 2003; Hoff, Zyromski, Armstrong & O'Neil 1993; Lee et al. 2003).

Per ridurre l'accumulo di aggregati proteici la cellula utilizza, in particolare, due sistemi proteolitici che fanno capo al proteosoma e ai lisosomi.

Sress ossidativo e invecchiamento neuronale

Il sistema nervoso centrale è, tra gli organi e i tessuti, il più vulnerabile allo stress ossidativo. Questo può essere spiegato sulla base di alcune caratteristiche del SNC che contribuiscono a incrementare i livelli dei ROS intracellulari: l'elevato metabolismo, gli elevati livelli di metalli reattivi e l'azione di neurotrasmettitori attivi.

Accanto a questo si aggiunge il fatto che durante l'invecchiamento si ha una riduzione, a livello del SNC, della capacità antiossidante. Il SNC presenta elevati livelli di lipidi, soprattutto acidi grassi polinsaturi, che in seguito all'esposizione con i ROS possono andare incontro a perossidazione lipidica generando gli LPPs (prodotti di perossidazione lipidica).

Stress ossidativo e malattie neurodegenerative

L'eziologia di alcune malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la corea di Huntington rimane ancora, in molti casi, non chiara. Molti studi hanno messo in relazione la morte neuronale con lo stress ossidativo (Jenner P. 1996; Simonian N. A. 1996) e la presenza nella cellula di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La malattia di Alzheimer (AD) è caratterizzata, dal punto di vista fisiopatologico, dall'accumulo extracellulare di sostanza β -amiloide e da aggregati microfibrillari intracellulari. L'esposizione di neuroni in coltura con la proteina β -amiloide può indurre direttamente il processo apoptotico (Loo, 1999) e può incrementare la vulnerabilità dei neuroni stessi nei confronti dello stress ossidativo e della riduzione della disponibilità energetica che si osserva durante l'invecchiamento (Mattson, 1998). L'interazione della β amiloide con metalli (Cu, Fe) può favorire la produzione di H_2O_2 che, a sua volta, incrementa sia la tossicità sia la morte neuronale (Multhaup, 2002).

I pazienti con il **morbo di Parkinson (PD)** mostrano una profonda disfunzione motoria causata dalla neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra. Dal punto di vista anatomo-patologico, un carattere distintivo del morbo di Parkinson è la presenza dei CORPI di LEWY, caratteristiche inclusioni sferiche ialine. Anche in questo caso lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale giocano un ruolo centrale nella malattia. Sia l'invecchiamento che alcuni fattori genetici potrebbero rendere i neuroni dopaminergici più sensibili all'aumento dello stress ossidativo.

La **Corea di Huntington** è una malattia neurodegenerativa, ereditabile, ad esordio tardivo, causata da una mutazione a livello del gene codificante per l'huntingtina. Tale gene presenta, a livello della regione codificante, una espansione della tripletta CAG che si traduce in una sequenza poliglutamminica a livello della proteina. Questa forma mutata e troncata nella regione N-terminale forma degli aggregati intranucleari che insieme alla eccitotossicità, allo stress ossidativo e alla deplezione di energia portano alla morte dei neuroni dello striato. Nella Corea di Huntington, nelle aree cerebrali colpite da degenerazione neuronale, si osservano livelli elevati sia di radicali liberi che di altri prodotti tipici del danneggiamento ossidativo: malondialdeide 8-idrossideossiguanosina, 3-nitrotirosina e eme-ossigenasi (Browne et al. 1999). Questo indica un coinvolgimento dello stress ossidativo nella neurodegenerazione osservata nell'Huntington.

SCOPO DEL LAVORO (I)

Il principale obiettivo di questo studio è stata la relazione tra l'accumulo della proteina vasopressina mutata, l'autofagia, la sopravvivenza cellulare e la morte cellulare nel modello di diabete insipido neuroipofisario. Durante il mio terzo anno di dottorato nel laboratorio del Prof. Murphy abbiamo messo a punto in un modello *in vitro* di FNDI in cellule di neuroblastoma murino N2a infettate con adenovirus ricombinanti che esprimono una vasopressina normale (Ad-VCAT) o mutata (Ad-VCAT-Cys67stop).

In questa parte dello studio abbiamo ipotizzato che

- 1) L'iper-regolazione dell'autofagia finalizzata ad eliminare la proteina mutata, rende i neuroni più prони alla morte in seguito all'esposizione ad un secondo insulto. Per valutare la nostra ipotesi abbiamo utilizzato la Dopamina come induttore di stress eccitotossico addizionale tenuto conto che *in vivo* i neuroni del SON e del PVN sono effettivamente bersagliati da questo neuromediatore.

RISULTATI (I)

I meccanismi di morte cellulare di cellule neuronali meglio conosciuti, classicamente classificati come apoptosi, sono mediati dall'attivazione della caspasi 9 e della via mitocondriale, o direttamente della caspasi 8 e successivamente della caspasi 3 (Yuan et al., 2003; Lockshin e Zakeri, 2002). Esistono altre vie di morte cellulare, e tra queste l'autofagia (Lockshin e Zakeri, 2002), e i diversi meccanismi di morte non sono mutuamente esclusivi tra di loro. Nel corso di questo quarto anno di Dottorato ci siamo occupati di approfondire le relazioni tra la morte apoptotica e l'autofagia in cellule di neuroblastoma che iperesprimono una vasopressina mutata e che sono sottoposte ad un secondo insulto stressante. Abbiamo indagato sulle vie di regolazione della citotossicità conseguente alla somministrazione di uno stress intracellulare (sintesi di proteina mutata che forma aggregati insolubili) e uno stress extracellulare rappresentato da un neuromediatore.

1) L'espressione della vasopressina Cys67stop sensibilizza le cellule Neuro2a ad un secondo insulto

Abbiamo ipotizzato che la vasopressina Cys67stop sensibilizzi la cellula agli effetti di un secondo insulto. Le cellule di neuroblastoma Neuro2a sono state infettate per 10h con Ad-

VCAT-Cys67stop, che codifica per la vasopressina troncata Cys67stop, o con il virus di controllo Ad-VCAT codificante per una vasopressina normale. Le cellule infettate sono state successivamente incubate con Dopamina (DA) per 8,14, e 40 ore, ed è stata valutata la morte cellulare mediante colorazione con tripan blue (Fig. 1). Precedentemente abbiamo dimostrato che l'espressione della vasopressina troncata da sola non compromette la vitalità cellulare (Castino et al, 2005b). Nelle cellule infettate con Ad-VCAT Cys67stop la morte cellulare appare più' rapida quantitativamente più elevata, se comparata a quella delle cellule infettate con il virus di controllo.

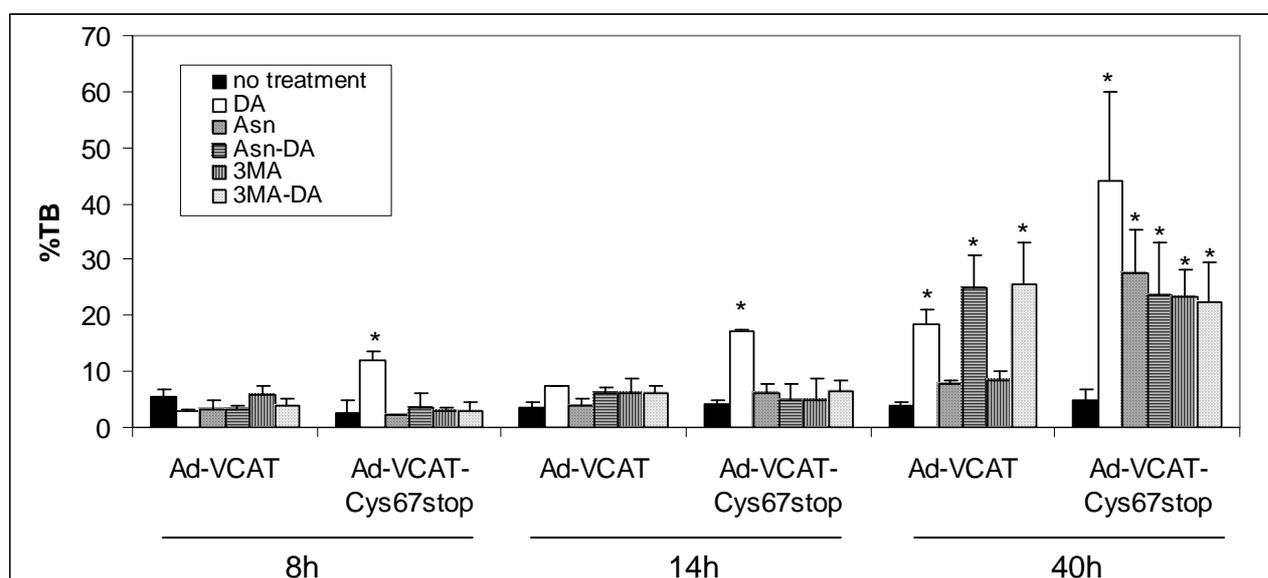


Figura 1. L'espressione della vasopressina Cys67stop sensibilizza le cellule di neuroblastoma N2a agli effetti tossici della DA.

2) La morte cellulare indotta da DA nelle cellule che esprimono la vasopressina Cys67stop è autofagia-dipendente

Ci siamo chiesti se la morte cellulare indotta da DA nelle cellule Neuro2a che esprimono la proteina Cys67stop fosse correlata all'autofagia. Come è stato precedentemente dimostrato (Castino et al., 2005b), il blocco dell'autofagia con Asparagina (Asn) (che previene la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma (Hoyvik et al., 1991)), o 3-metiladenina (3MA) (che blocca la formazione dell'autofagosoma (Seglen e Gordon, 1982; Bloomart et al., 1997)) non ha alcun effetto sulla

vitalità cellulare di cellule infettate con Ad-VCAT (Fig 1). Tuttavia sia Asn che 3MA inducono morte cellulare in cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop (Fig 1), suggerendo che l'autofagia è un meccanismo di pro-sopravvivenza in cellule che accumulano una vasopressina mutata (Castino et al, 2005b). La tossicità della Dopamina diventa evidente nelle cellule Ad-VCAT cys67stop solo dopo 14 ore di trattamento, ma il trattamento simultaneo con Asn o 3MA protegge dalla morte cellulare, suggerendo che la morte indotta da DA, in queste cellule sia dipendente dall'autofagia.

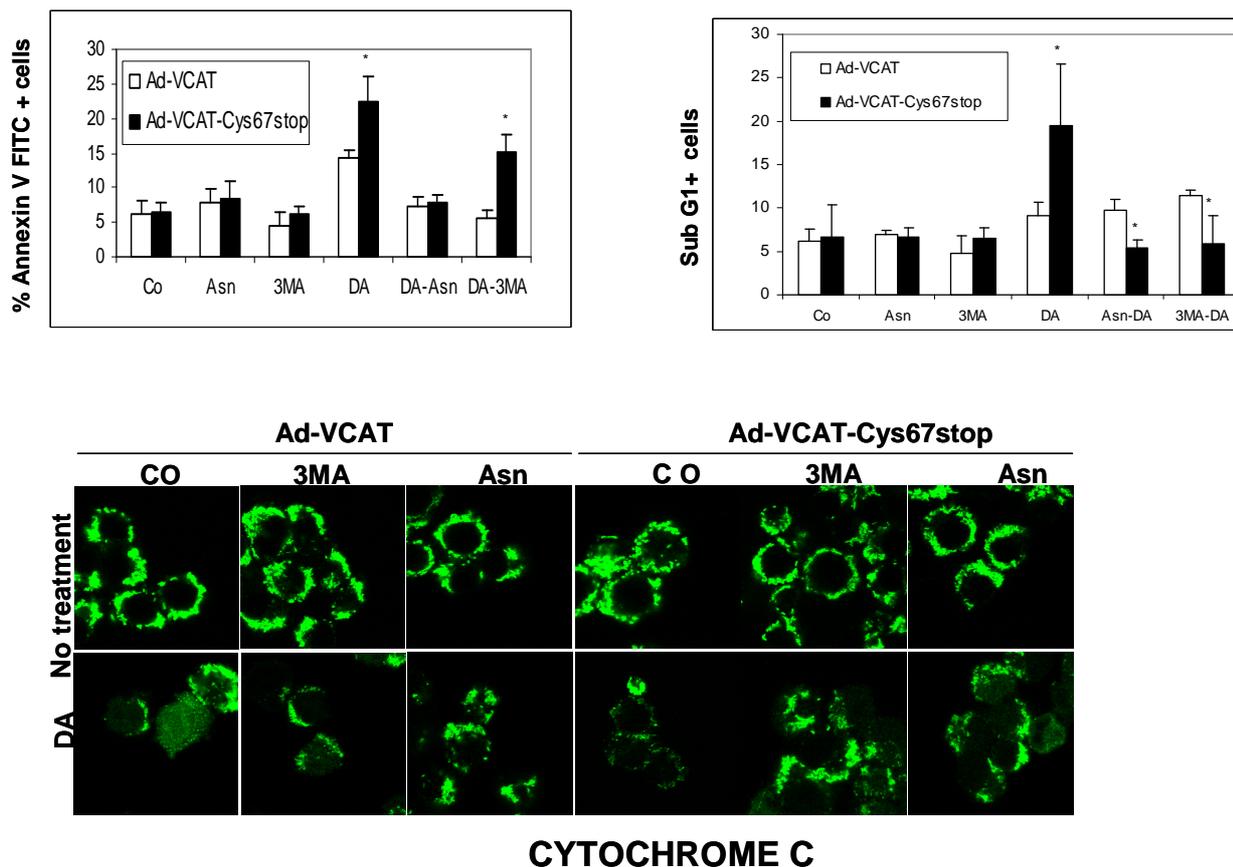


Figura 2. La Dopamina attiva una via apoptotica dipendente dall'autofagia nelle cellule che esprimono la proteina cys67stop

3) Nelle cellule che esprimono la proteina Cys67stop la morte cellulare indotta da Dopamina ha caratteristiche tipiche dell'apoptosi

Ci siamo chiesti se la morte cellulare indotta da Dopamina nelle cellule Cys67stop fosse correlata all'apoptosi classica. Abbiamo utilizzato l'analisi a citofluorimetro a flusso per quantificare la

popolazione di cellule marcate con AnnessinaV- FITC che identifica le cellule nelle prime fasi dell'apoptosi o ioduro di propidio (PI), che identifica le cellule ipodiploidi nella fase sub G1. Il trattamento con DA delle cellule Cys67stop quadruplica la quota di cellule Annessina V positive (Fig 2A). L'analisi citofluorimetrica di cellule fissate e marcate con PI ha permesso di quantificare la popolazione ipodiploide corrispondente al picco subG1 e tipica del processo apoptotico (Fig 2B). Anche in questo caso, un aumento della quota di cellule positive nelle cellule Cys67stop rispetto alle VCAT ha suggerito il coinvolgimento del processo apoptotico. L'apoptosi è associata all'attivazione delle caspasi e rilascio del citocromo c dai mitocondri (Lim et al., 2002). L'immunoistochimica ha rivelato un rilascio massivo di citocromo c dai mitocondri nelle cellule Cys67stop rispetto a quelle di controllo (Fig 2C).

4) L'apoptosi indotta da DA è autofagia dipendente nelle cellule Cys67stop

Inibitori classici dell'autofagia quali 3MA e Asn bloccano l'apoptosi nelle cellule Cys67stop. Gli inibitori riducono sostanzialmente la quota di cellule Annessina positive (Fig 2A), il picco subG1 (Fig 2B), il rilascio di citocromo c (Fig 2C) nelle cellule Cys67stop.

5) L'apoptosi indotta da DA è caspasi dipendente

Abbiamo valutato il possibile coinvolgimento delle caspasi. L'analisi citofluorimetrica ha rivelato una notevole attivazione delle caspasi nelle cellule Cys67stop ma non nelle VCAT trattate con DA che veniva abolita in presenza di inibitori dell'autofagia come Asn e 3MA (Fig 3A). Abbiamo utilizzato l'inibitore ZVAD-fmk per mostrare che la morte cellulare indotta da DA nelle cellule Cys67stop fosse caspasi dipendente. Come atteso, ZVAD-fmk blocca l'attività delle caspasi (Fig 3B).

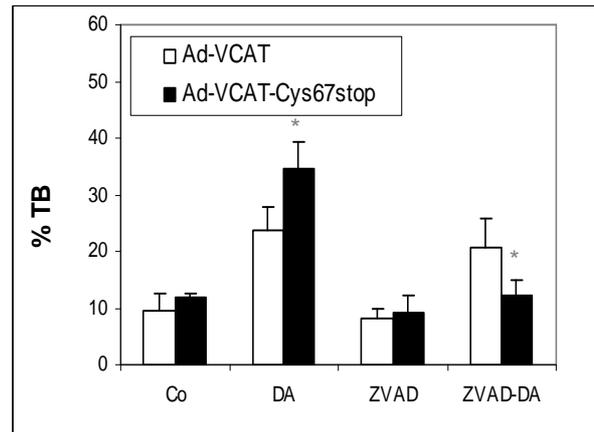
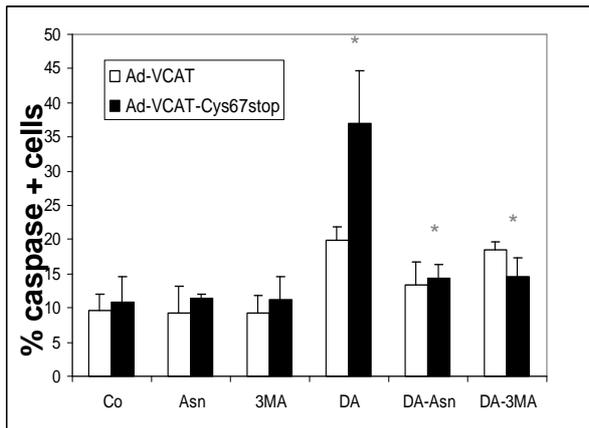


Figura 3. La morte cellulare indotta da DA nelle cellule che esprimono la vasopressina mutata è caspasi-dipendente.

6) Formazione dell'autofosoma e apoptosi

Abbiamo ulteriormente valutato l'eventuale legame funzionale tra autofagia e morte cellulare caspasi dipendente indotta da DA. La monodansilcadaverina (MDC) è una sonda fluorescente che viene selettivamente incorporata negli autofosomi e negli autolisosomi (Biederbick et al., 1995; Munafo' e Colombo, 2001). Abbiamo colorato le cellule con MDC dopo essere state trattate con o senza DA (Fig 4). Come abbiamo precedentemente dimostrato (Castino et al., 2005), nelle cellule Cys67stop si osservano vacuoli di dimensioni maggiori che nelle cellule di controllo. Il trattamento con DA induce la formazione di grosse vescicole autofagiche in cellule infettate con Ad-VCAT e Ad-VCAT-Cys67stop. Come atteso il blocco dell'autofagia con 3MA riduce i livelli di autofagolisosomi nelle cellule Cys67stop. Tuttavia, il trattamento con ZVAD-fmk aumenta la formazione di autofagolisosomi in entrambe le cellule con e senza DA, suggerendo che le caspasi possano iniziare l'autofagia.

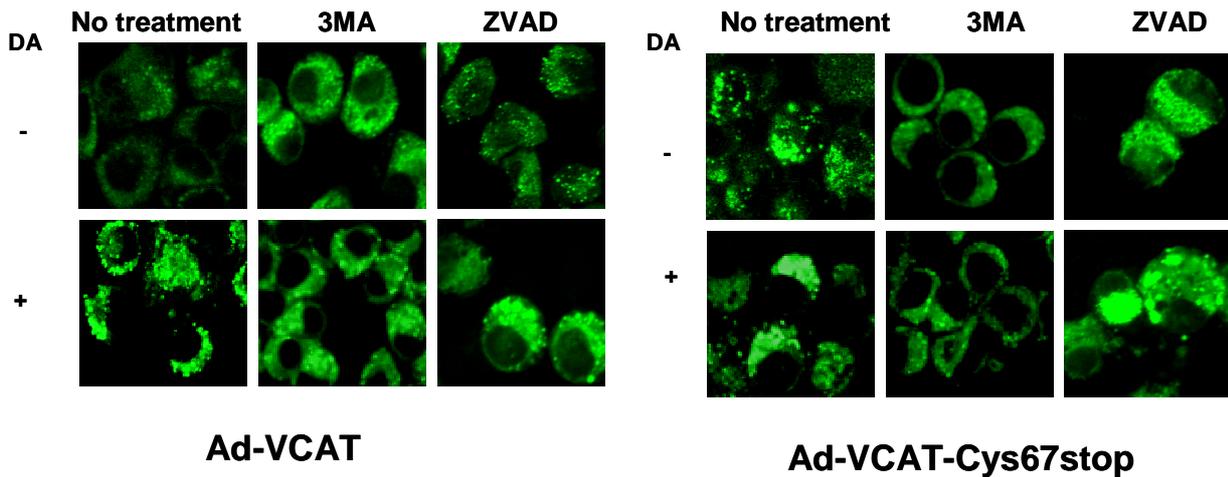


Figura 4. La formazione dell'autofagosoma nelle cellule N2a infettate con il virus adVCAT e con il virus AdVCAT-Cys67stop.

CONCLUSIONI (I)

Sulla base dei dati fin qui riportati possiamo concludere che:

- 1) L'espressione della vasopressina Cys67stop sensibilizza le cellule ad un secondo insulto (DA)
- 2) La morte cellulare indotta da DA è autofagia dipendente e presenta le caratteristiche tipiche dell'apoptosi

NOTA: I risultati su esposti sono descritti in un articolo originale pubblicato sulla rivista *Faseb Journal*

SCOPO DEL LAVORO (II)

La neurodegenerazione e la morte cellulare neuronale sono strettamente correlate ai sintomi di molte malattie neurodegenerative. Lo stress ossidativo rappresenta una delle cause più importanti di morte cellulare nei tessuti neuronali. L'ossido nitrico (NO), un gas permeabile delle membrane coinvolto nella neurotrasmissione è implicato nell'ischemia cerebrale e nella neurodegenerazione. La Dopamina (DA) costituisce un'altra importante fonte di stress ossidativo nel sistema nervoso in modo particolare nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*. Sia la

morte cellulare apoptotica che il processo autofagico lisosomico sono stati proposti come possibili responsabili della neurodegenerazione.

Durante il quarto anno del mio Dottorato ci siamo posti l'obiettivo di chiarire:

- la complessa relazione tra la morte cellulare apoptotica e la via autofagico-lisosomica in cellule di neuroblastoma sottoposte a stress ossidativi.

RISULTATI (II)

1) La Dopamina (DA), l' Idrossidopamina (OHDA), il donatore di NO (NOC-9) e il perossido di idrogeno (H₂O₂) inducono morte cellulare in cellule di neuroblastoma umano SHSY5Y

Le cellule neuronali sono fisiologicamente esposte a continue stimolazioni da parte dei neurotrasmettitori che possono provocare stress ossidativo. Tra i neurotrasmettitori per i quali è documentata l'induzione di radicali liberi nelle cellule bersaglio si annoverano la dopamina (DA) e il suo derivato ossidato idrossi-dopamina (OH-DA) e l'ossido di azoto (NO).

In una prima serie di esperimenti abbiamo analizzato gli effetti citotossici di queste molecole sulle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Per mimare *in vitro* la condizione di stress da radicali dell'ossido di azoto abbiamo utilizzato la 6-(2-idrossi-1-metil-2-nitrosoidrazino)-N-metil-1-esanamine (NOC-9), che libera spontaneamente l'NO, senza l'intervento di un cofattore, in condizioni fisiologiche. I NOC agiscono come degli zwitterioni stabilizzati da un legame idrogeno intramolecolare. Se posti in una soluzione acquosa i NOC si dissociano in due molecole di NO e in una amina (Seccia et al 1996). Le cellule, fatte aderire su piastre Petri, sono state esposte a varie concentrazioni di DA, OH-DA e NOC-9 per 16 ore ed è stata valutata la sopravvivenza cellulare a fine trattamento. Questi esperimenti preliminari avevano lo scopo di individuare le condizioni sperimentali ottimali per iniziare lo studio di caratterizzazione degli effetti citotossici dei radicali liberi. In Figura 5 sono riportati i dati relativi alla citotossicità indotta da DA, OH-DA e NO (utilizzando il donatore NOC-9) nelle colture di neuroblastoma SH-SY5Y in condizioni di tempo e concentrazione (delle singole sostanze) tali da non provocare la mortalità totale delle cellule e ciò al fine di poter meglio caratterizzare le differenze morfologiche e biochimiche tra le cellule vitali sopravvissute allo stress ossidativo e le cellule che invece soccombono. Inoltre, per la concentrazione dei neurotrasmettitori abbiamo utilizzato

quella ritenuta più prossima alla situazione fisiologica secondo quanto riportato in letteratura, e che rispettivamente sono 1 mM DA, 100 μ M o 200 μ M OH-DA (come indicato nelle legende) e 250 μ M NOC-9. La morte cellulare è stata valutata contando le cellule rimaste adese (sopravvissute, ancorché sottoposte a stress) e le cellule necrotiche (che incorporano il colorante blu tripano). I dati indicano che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la DA provoca una mortalità pari a circa il 50 %, mentre la citotossicità da OH-DA e NOC-9 risulta essere minore (pari a circa il 25-30 %). Negli esperimenti successivi ci siamo focalizzati sul perossido di idrogeno e abbiamo approfondito lo studio della relazione tra autofagia e morte cellulare.

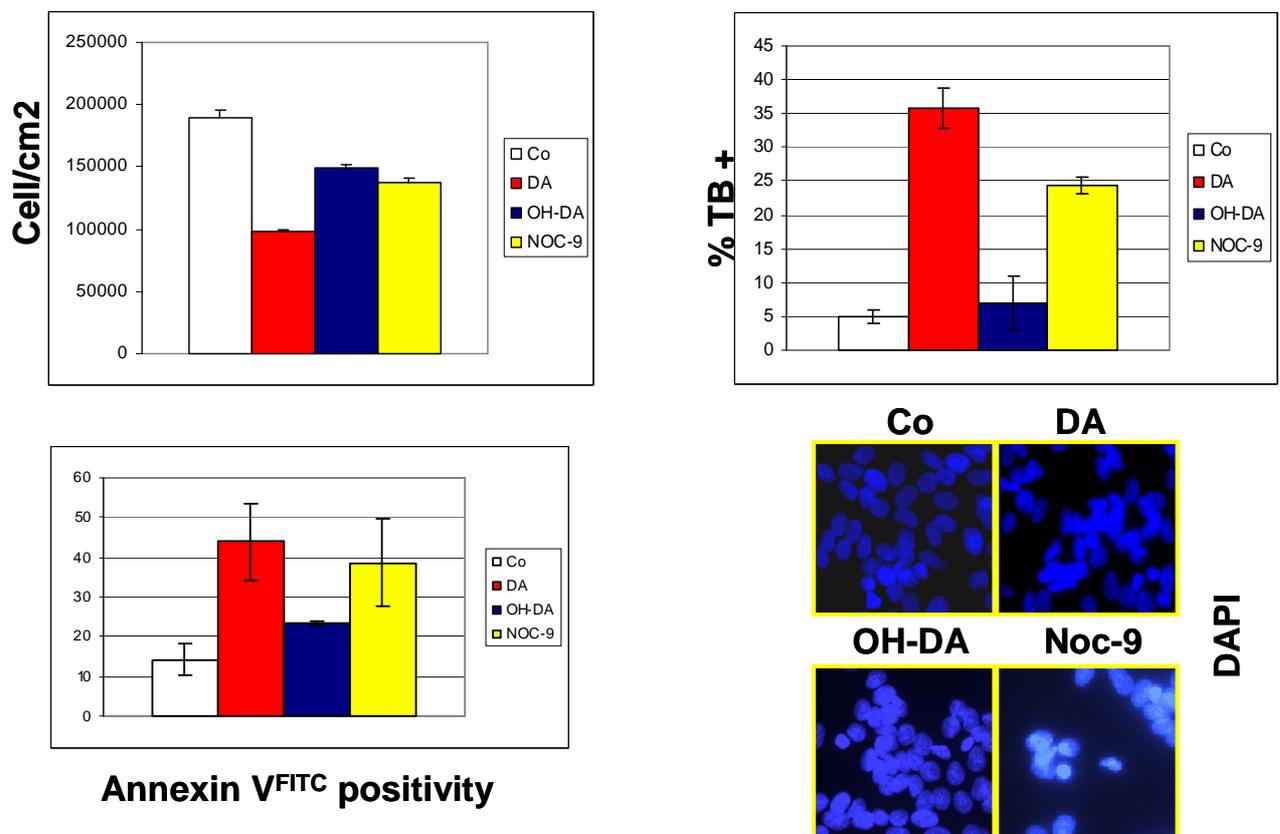


Figura 5. Citotossicità indotta da DA, OH-DA e NO.

2) I neurotrasmettitori inducono l'autofagia

Dati recenti di letteratura indicano la possibilità che i tipi I e II di morte cellulare programmata condividano alcune vie di segnalazione e che i due eventi, seppur differiscano nella modalità di induzione, non siano di fatto totalmente indipendenti l'uno dall'altro. In effetti, abbiamo dimostrato in collaborazione con il laboratorio di David Murphy (Università di Bristol, UK) che esiste una regolazione reciproca tra morte apoptotica e morte autofagica (Castino et al., 2005a; Castino et al., 2005b). Abbiamo quindi verificato l'eventuale induzione di autofagia da parte dei

neurotrasmettitori. Per evidenziare la presenza di vacuoli autofago-lisosomici abbiamo colorato le cellule adese su vetrino con la monodansilcadaverina (MDC), una sostanza autofluorescente che permea la membrana plasmatica e accumula nei vacuoli acidi. Le immagini riportate in Figura 6 dimostrano la presenza di vacuoli MDC positivi nelle cellule trattate con DA, OH-DA e NOC-9 in quantità notevolmente maggiore rispetto a quanto si osserva nelle cellule di controllo non trattate. Per verificare che la positività per MDC sia effettivamente in relazione con il processo autofagico abbiamo eseguito l'analisi su una serie parallela di cellule trattate con DA, OH-DA e NOC-9 in presenza di 3MA, un inibitore dell'autofagia (Seglen e Gordon, 1982; Jia et al 1997).

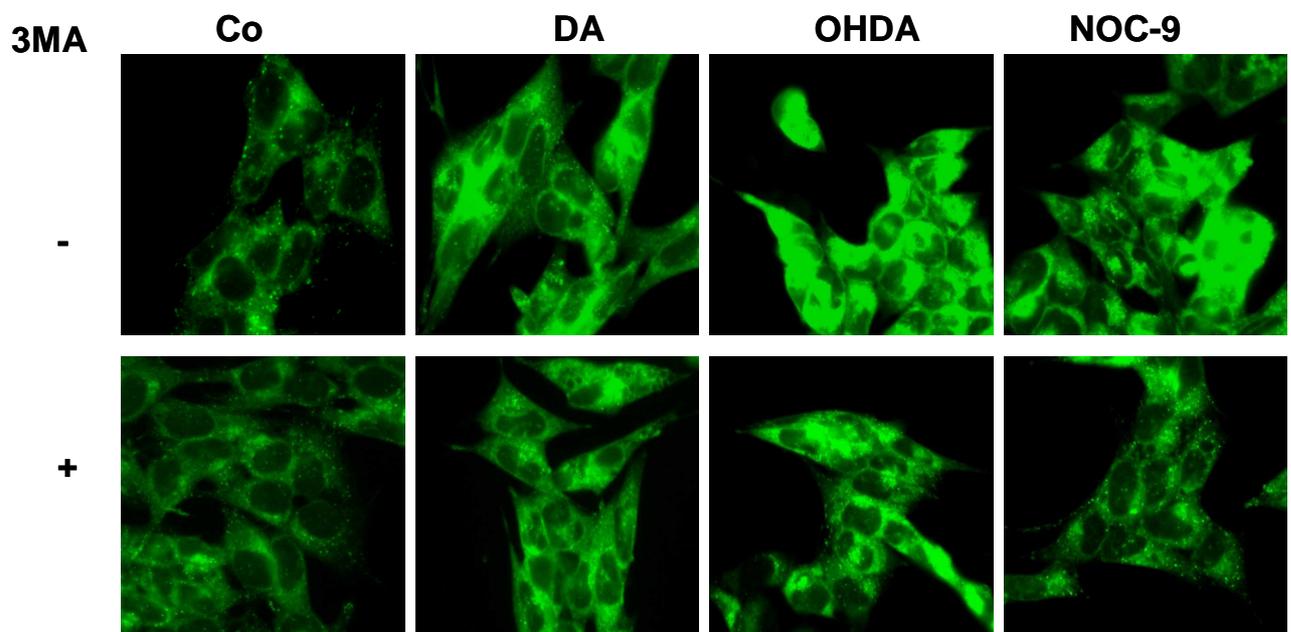


Figura 6. Induzione di autofagia da parte dei neurotrasmettitori

I dati fin qui riportati indicano chiaramente che i neurotrasmettitori DA, OH-DA e NO possono indurre autofagia e morte cellulare con le caratteristiche fenotipiche dell'apoptosi, cui può seguire la degenerazione necrotica.

3) La morte cellulare indotta da perossido di idrogeno (H₂O₂) presenta caratteristiche tipiche dell'apoptosi

Il perossido di idrogeno può essere considerato il capostipite più rappresentativo dei radicali ossidanti che possono formarsi nel corso del metabolismo cellulare. In effetti, in molti lavori

sperimentali il trattamento con perossido di idrogeno viene utilizzato quale esempio paradigmatico di tossicità da stress ossidativi.

Negli esperimenti che seguono abbiamo perciò utilizzato il perossido di idrogeno (200 μM) per analizzare a livello molecolare gli eventi morfologici e biochimici prodotti dallo stress ossidativi. Come si osserva in Figura 7, a questa concentrazione il perossido provoca circa il 50% di mortalità dopo 2 ore di trattamento e oltre 80 % di mortalità dopo 16 ore di trattamento.

In figura 6 si osserva anche che la citotossicità da perossido di idrogeno si esplica con la modalità dell'apoptosi, come si può dedurre dalla positività all'annexina V, dall'attivazione delle caspasi, dalle modificazioni a carico della cromatina e dalla comparsa di una popolazione con DNA ipodiploide.

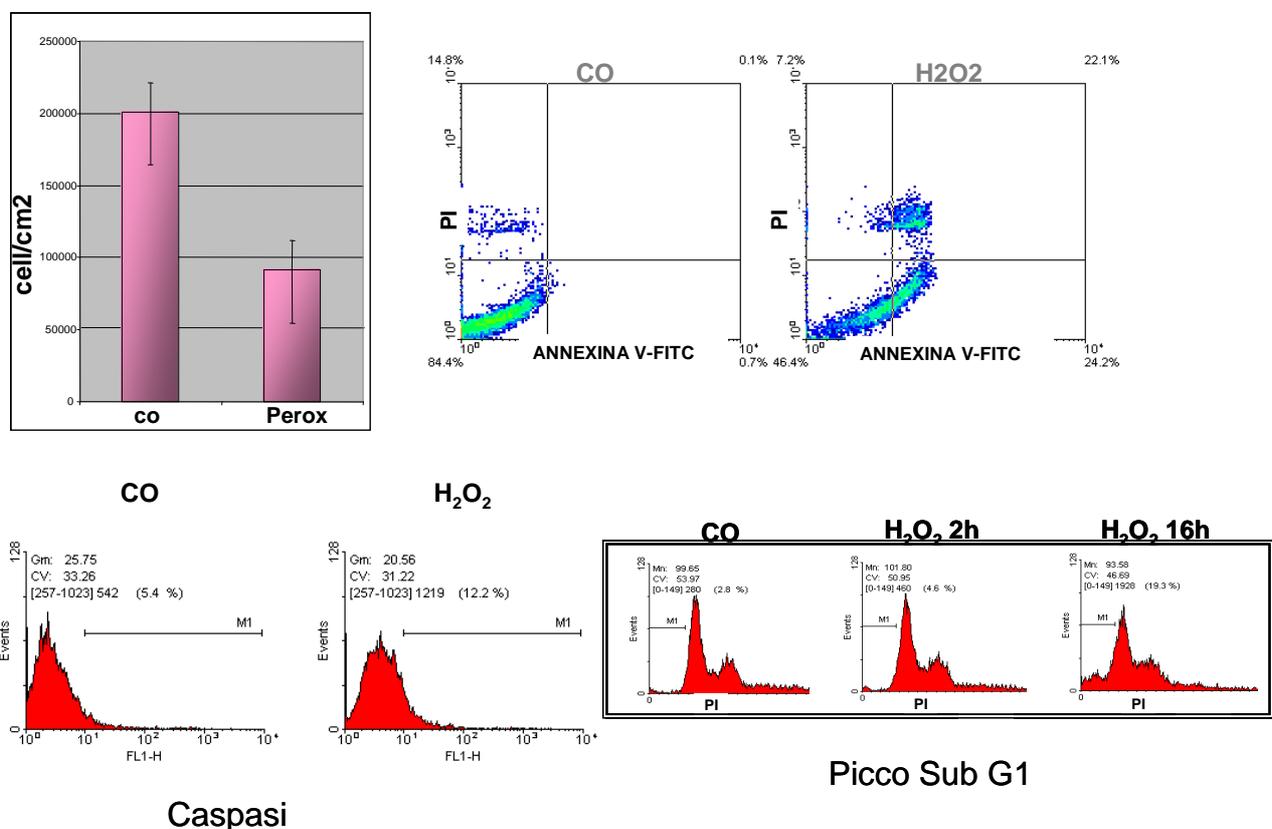


Figura 7. Caratteristiche della morte cellulare indotta da H₂O₂

4) La morte cellulare indotta da perossido di idrogeno (H₂O₂) induce l'autofagia

Le cellule di controllo e trattate con H₂O₂ per 2h sono state colorate con monodansilcadaverina, un colorante specifico dei compartimento autofagici e autofagolisosomi. La figura 8 mostra una iperregolazione dell'autofagia, confermata da una aumentata espressione della proteina Beclin 1, una proteina regolatrice dell'autofagia.

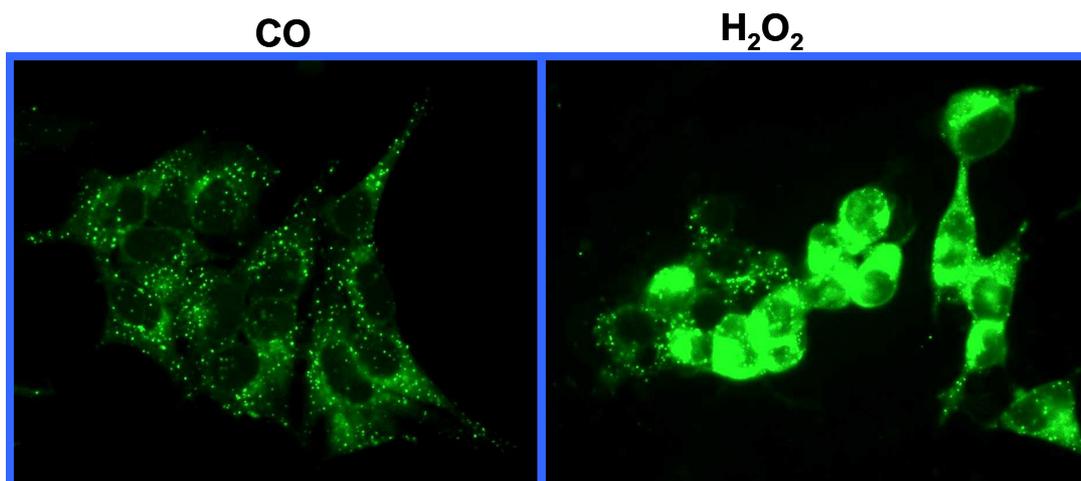


Figura 8. Marcatura dei vacuoli autofagici mediante MDC.

L'MDC era ritenuto fino a pochi mesi or sono un buon marcatore morfologico dell'autofagia. Tuttavia, in un recente articolo pubblicato sulla rivista specialistica *Autophagy* i ricercatori (Tanida et al 2005) hanno dimostrato che il marcatore attualmente disponibile che al meglio consente di rilevare e studiare anche dinamicamente l'induzione del processo autofagico è rappresentato dalla proteina LC3. In effetti, la positività per MDC indica semplicemente un accumulo di vacuoli autofagico-lisosomico, che potrebbe risultare dal rallentato 'turn-over', ovvero un diminuito smaltimento del materiale autofagocitato.

Per verificare se effettivamente lo stress ossidativo è associato a induzione di autofagia abbiamo analizzato al microscopio confocale a fluorescenza la localizzazione della proteina di fusione GFP-LC3 in cellule trasfettate (in transiente) con il plasmide GFP-C2-LC3 e successivamente esposte a perossido di idrogeno. A tal fine abbiamo costruito il vettore di espressione procedendo dapprima alla clonazione del cDNA di LC3 mediante PCR (utilizzando primers specifici da noi disegnati) e alla successiva inserzione di questo cDNA nel plasmide peGFP-C2 (Clontech).

Le immagini riportate nella Figura 9 dimostrano che nelle cellule non trattate (controllo) la proteina LC3 è distribuita omogeneamente nel citoplasma e non appare legata a sistemi di membrana (organelli), una distribuzione uguale a quella della proteina GFP osservata nelle cellule trasfettate con il vettore ('vuoto') peGFP-C2 di controllo.

Per contro, in seguito a trattamento con perossido di idrogeno nelle cellule trasfettate con il plasmide pGFP-LC3 si osserva una rapida (dopo solo 5 minuti) redistribuzione della fluorescenza che assume un aspetto puntiforme, ad indicare la traslocazione della proteina LC3 su membrana. Come detto nell'introduzione nel corso dell'autofagia la proteina LC3 è sequestrata dal citoplasma sulla membrana del nascente vacuolo autofagico.

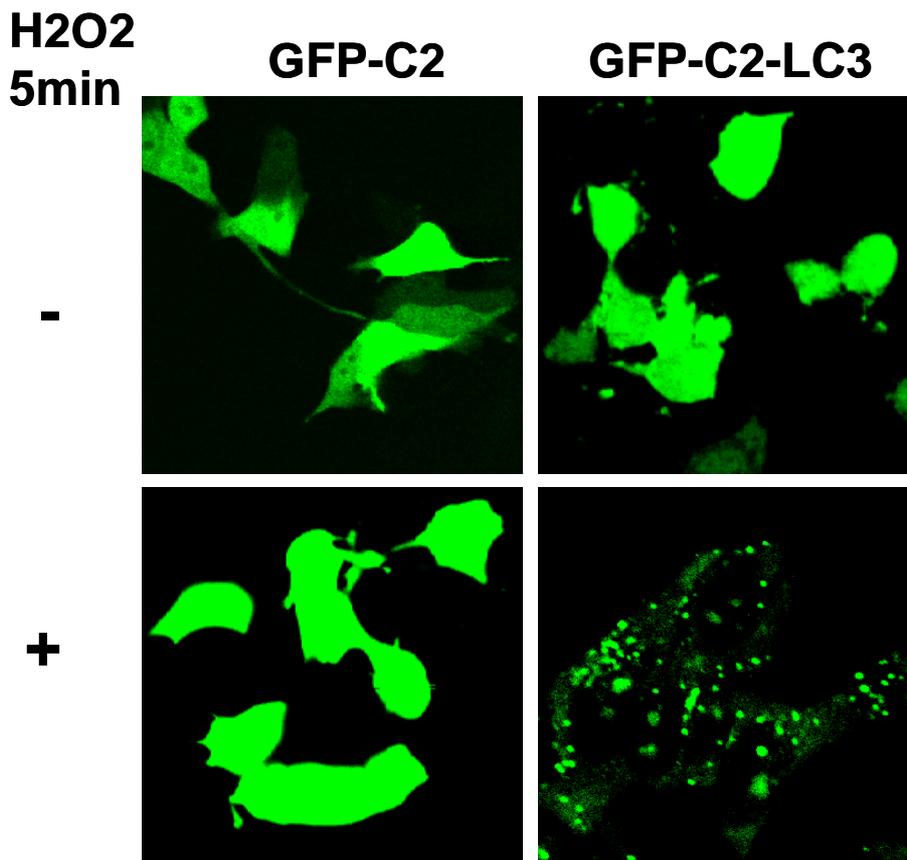


Figura 9. Trasfezione transiente con GFP-LC3

5) La morte cellulare indotta da H2O2 è autofagia-dipendente: effetti di inibitori farmacologici (3MA), e dell'espressione ectopica del "dominant negative di PI3K(III).

L'autofagia, che dipende dalla fosfatidilinositide 3 chinasi (PI3K), è stata inibita mediante l'uso di 3MA (Fig 10) o infettando le cellule con un adenovirus che iper-esprime una proteina dominante negativa della Pi3K (Vps34^{-/-}). In entrambi i casi l'inibizione dell'autofagia protegge dalla morte indotta da H2O2 (Fig 11). La 3-metiladenina (3MA), un inibitore della PI3K, è una sostanza largamente utilizzata negli studi sull'autofagia. Seglen e Gordon (1982) hanno dimostrato che l'azione inibente della 3MA si esplica nelle fasi iniziali di questo processo bloccando la formazione del vacuolo autofagico. Per verificare il coinvolgimento attivo del processo autofagico nell'induzione della morte cellulare da parte del perossido di idrogeno, abbiamo eseguito esperimenti di incubazione a 16 h in presenza di 3MA. La figura 10 mostra i risultati degli esperimenti di citotossicità da perossido condotti in assenza o presenza di 3MA. L'istogramma rivela che effettivamente il perossido riduce la sopravvivenza a circa il 55% della coltura di controllo. La 3MA, di per sé non tossica, esercita un effetto protettivo sulle colture trattate con perossido, annullandone la tossicità. Abbiamo verificato che nelle nostre

condizioni sperimentali la 3MA fosse efficace nell'inibire l'autofagia. Le immagini mostrate dimostrano che effettivamente la 3MA inibisce l'induzione di autofagia da parte del perossido. Abbiamo ulteriormente indagato sulla modalità di morte cellulare e sull'efficacia della 3MA di proteggere dalla morte indotta dal perossido. Le cellule sono state brevemente incubate con annessina V-FITC e analizzate al citofluorimetro per valutare l'espressione sulla plasmamembrana della fosfatidil-serina, indicatore di morte cellulare programmata.

Come mostrato in Figura 10, il trattamento con perossido è associato a positività per l'annessina V e questa positività assume valori confrontabili con il controllo nei campioni trattati con perossido e contemporaneamente con 3MA. Abbiamo quindi proceduto a discriminare il tipo di morte cellulare programmata.

A questo punto abbiamo voluto verificare che si trattasse di apoptosi classica caspasi-dipendente e che l'inibizione 3MA-mediata della PI3K fosse associata a inibizione dell'attivazione delle caspasi. Abbiamo pertanto misurato l'attività delle caspasi con un metodo citofluorimetrico nelle cellule incubate nelle 4 diverse condizioni sperimentali. I risultati di questo esperimento dimostrano che il perossido induce l'attivazione delle caspasi e che tale attivazione non ha luogo se il trattamento è fatto in presenza di 3MA (fig. 10)

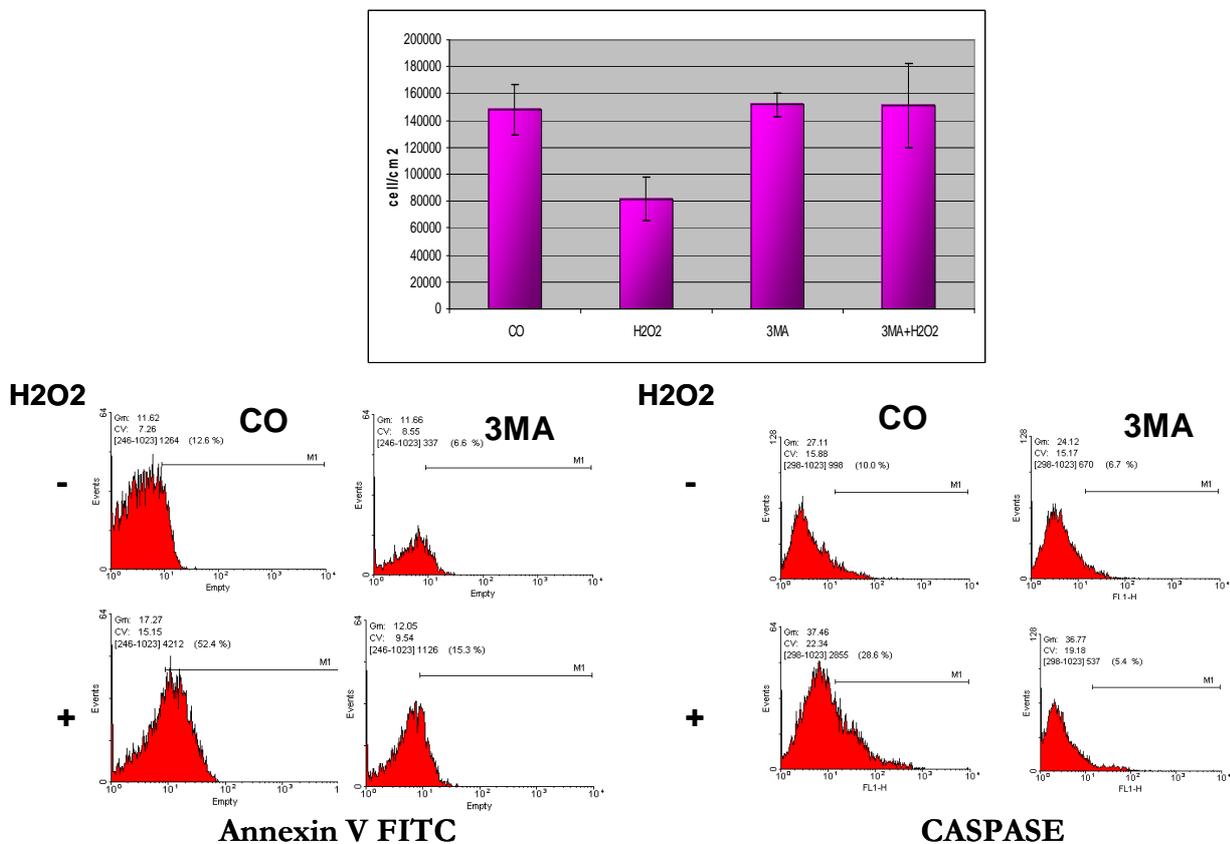


Figura 10. Inibizione della via autofagico lisosomica con 3MA.

I dati su riportati suggeriscono che l'apoptosi indotta dal perossido dipende dall'attivazione del processo autofagico, o più precisamente dall'attività della PI3K (bersaglio dell'inibizione da parte della 3MA). Sono note due classi di PI3K potenzialmente coinvolte nella regolazione dell'autofagia: la classe I e la classe III. La PI3K I è in realtà posta sulla via di segnalazione della sopravvivenza cellulare e della sintesi proteica e solo indirettamente agisce sull'autofagia, peraltro con effetti inibitori mediati dal PiP3. La PI3K III è invece implicata nella regolazione positiva dell'autofagia, essendo direttamente coinvolta nel passaggio cruciale di attivazione del processo di formazione del vacuolo autofagico (Kim e Klionsky 2000; Petiot et al 2000). Nel nostro laboratorio è disponibile il vettore adenovirale ricombinante per l'espressione della forma 'dominante negativa' del Vps34, omologo di PI3K III. Ci siamo avvalsi di questo 'strumento' biotecnologico per verificare il coinvolgimento di questa chinasi nella via di segnalazione apoptotica innescata dallo stress ossidativo. Abbiamo messo a punto in esperimenti preliminari le condizioni ottimali di infezione e trattamento, per avere il massimo dell'espressione di Vps34^{-/-} in corrispondenza della risposta citotossica allo stress ossidativo. Abbiamo approntato anche un controllo di cellule infettate con un vettore adenovirale 'vuoto' (ovvero che non contiene il cDNA per l'espressione di alcuna proteina ectopica). Per ottenere una citotossicità comparabile a quella sin qui osservata (pari a circa il 50% del controllo non trattato) e allo stesso tempo avere il massimo di espressione della proteina mutante 'dominant negative' di PI3K è stato necessario coltivare le cellule per 48 h dal piastramento e prolungare l'incubazione con perossido a 16 h.

I risultati di questi esperimenti sono riportati nelle figure 11. La citotossicità e l'effetto protettivo sono stati quantificati contando le cellule adese alla piastra e sopravvissute al trattamento con perossido nelle diverse colture. Gli istogrammi chiaramente dimostrano la minor mortalità delle cellule esposte al perossido infettate con l'adenovirus ricombinante per Vps34^{-/-}: il numero di cellule sopravvissute appare doppio rispetto a quelle presenti nelle colture trattate con perossido in assenza di infezione o infettate con adenovirus di controllo.

A conferma dell'effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi caspasi-dipendente abbiamo anche misurato l'attività delle caspasi nelle diverse condizioni sperimentali. Il dato dimostra che effettivamente l'iper-espressione del mutante 'dominant negative' di PI3K previene l'attivazione delle caspasi indotta dallo stress ossidativo. Le immagini rivelano che l'infezione con il vettore adenovirale ricombinante per Vps34^{-/-} è in grado di bloccare anche l'induzione del processo autofagico associata allo stress ossidativo.

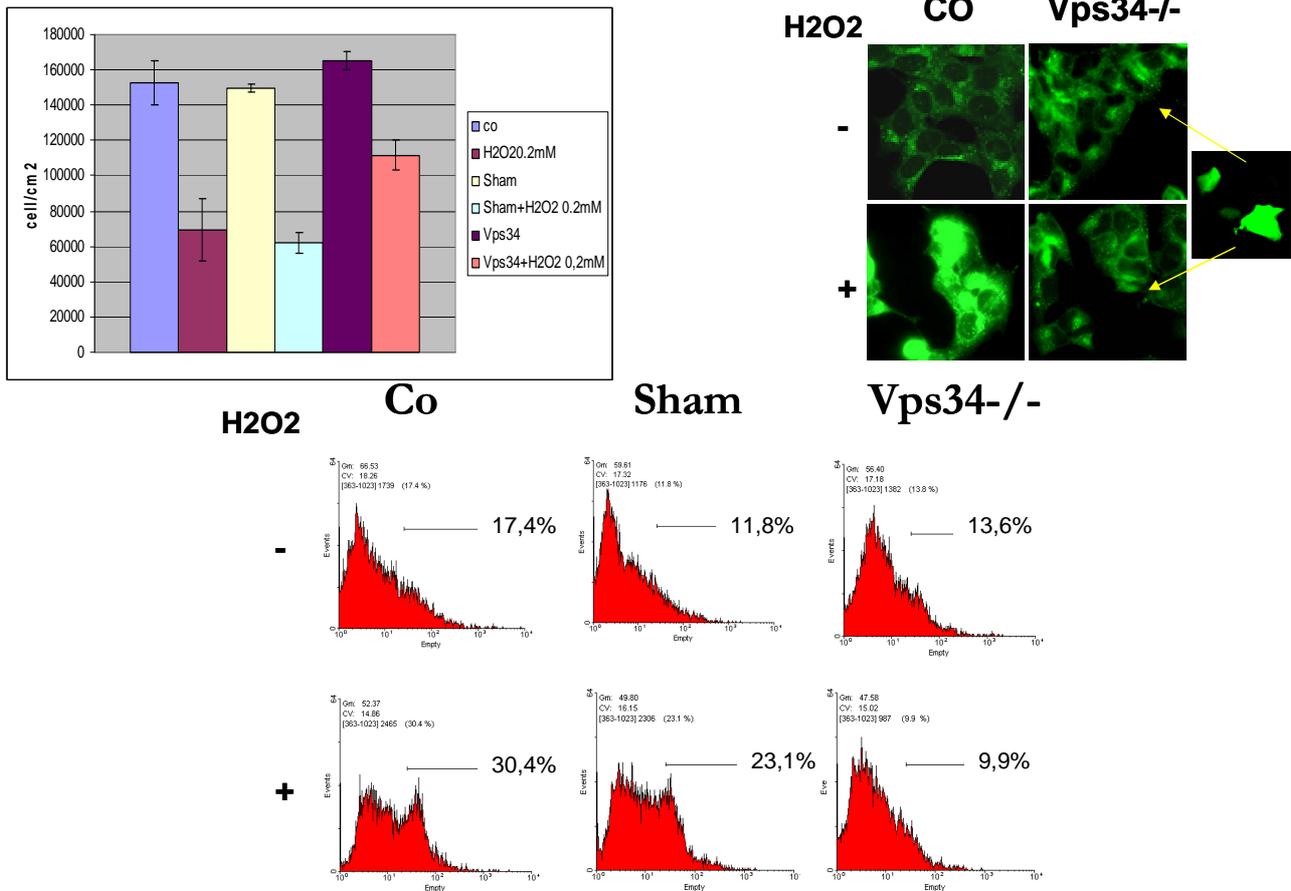


Figura 11. Inibizione della PI3KIII con l'adenovirus dominante negativo Vps34 -/-

6) L'inibizione della proteasi lisosomica catepsina D protegge dalla morte indotta da H2O2: effetti della PstA e del knock down dell'espressione proteica

Abbiamo valutato il ruolo di catepsina D, una delle proteasi maggiormente responsabili della degradazione autofagica-lisosomica, nella morte cellulare indotta da H2O2 nelle cellule SHSY5Y. Catepsina D è stata inibita in modo farmacologico mediante l'inibitore specifico PstA (Fig 12) o mediante l'uso di SiRNA specifici (Fig13). La Pepstatina A (Pst) è un antibiotico naturale che inibisce specificamente le aspartico-proteasi ed è universalmente utilizzato per inibire l'attività della CD (Isidoro et al 1997; De Stefanis et al 1997). Le cellule sono state incubate per 2h con o senza perossido in assenza o presenza di Pst. Per consentire una ottimale inibizione della CD, la Pst è stata somministrata alle colture cellulari 24 h prima dell'inizio del trattamento con perossido e riaggiunta nel corso del trattamento. Alla fine del trattamento sono state contate le cellule necrotiche (tripano blu-positive) presenti nelle colture. Il dato, espresso in percentuale, dimostra chiaramente che la Pst protegge le cellule esposte al perossido (Figura 12). A conferma che la protezione si esercita nelle fasi precedenti la necrosi secondaria, ovvero sul processo di morte cellulare

programmata, abbiamo valutato gli effetti della Pst in termini di positività all'annexina V (un marcatore di membrana della morte cellulare programmata). Il dato citofluorimetrico in Figura dimostra che effettivamente in presenza di Pst la positività per l'annexina V, associata al trattamento con perossido, è ridotta a meno della metà. Infine, abbiamo valutato il coinvolgimento delle caspasi nel processo di morte e l'eventuale capacità della Pst di impedirne l'attivazione associata allo stress ossidativo. Il dato mostrato dimostra che nelle colture trattate con perossido, in effetti, l'attivazione delle caspasi è impedita in presenza di Pst.

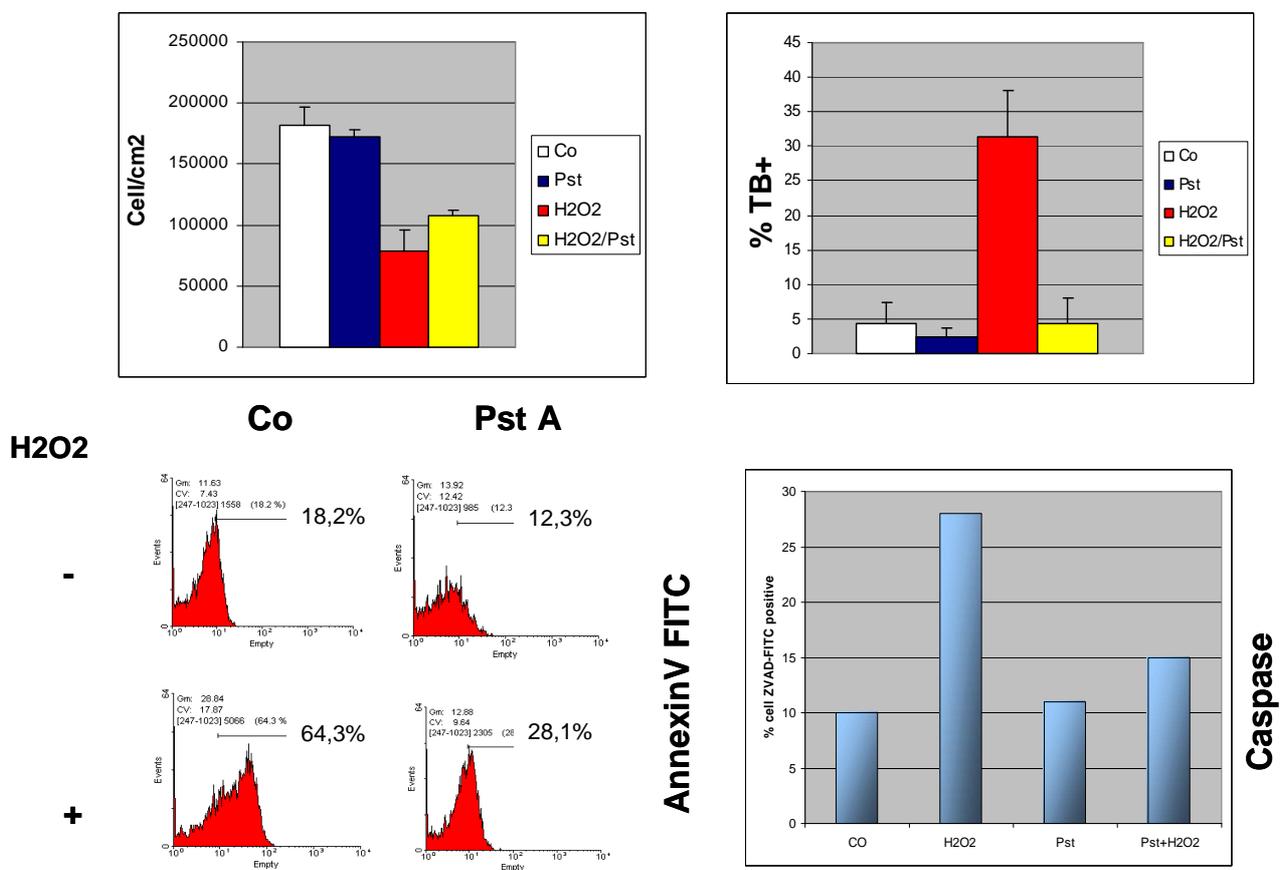
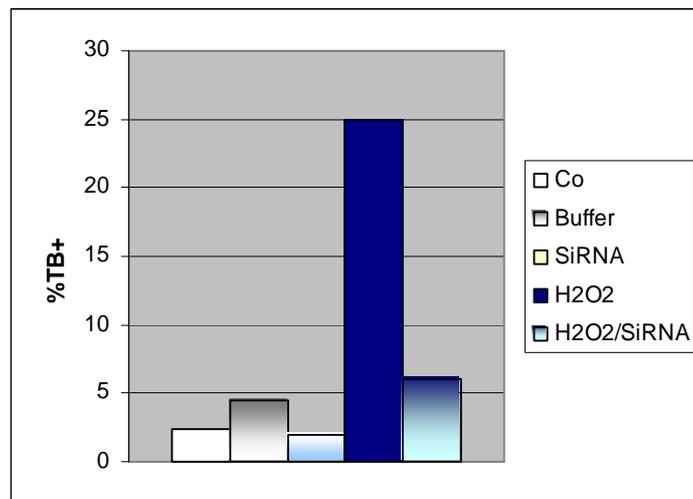


Figura 12. Inibizione di catepsina D con PstA

La Pst è un inibitore piuttosto specifico delle aspartico-proteasi e chiaramente non è un inibitore delle caspasi. Nella cellula di mammifero, l'unica aspartico-proteasi espressa nei lisosomi attualmente nota è la CD. L'interpretazione dei dati appare pertanto univoca: l'attività della CD è indispensabile per l'attivazione dell'apoptosi caspasi-dipendente indotta dallo stress ossidativo. Abbiamo voluto, tuttavia, verificare che fosse effettivamente la CD, e non un'altra aspartico-proteasi non descritta, a mediare l'attivazione delle caspasi. Ci siamo avvalsi della tecnica

recentemente descritta di knock-down dell'espressione proteica mediante 'piccoli RNA interferenti' (cosiddetta tecnica dello 'small interference RNA o siRNA). Abbiamo messo a punto in esperimenti preliminari le condizioni ottimali di trasfezione del siRNA specifico per ottenere il massimo effetto di ipo-regolazione (down-regulation) della CD, senza che ciò risultasse di per sé tossico per la cellula. L'analisi mediante western blotting mostrata e il dosaggio dell'attività enzimatica mostrato in Figura 5.4.1B dimostrano che nelle condizioni sperimentali adottate si ottiene un'inibizione dell'espressione di CD pari a circa il 90%.



Cathepsin activity (arbitrary unit)

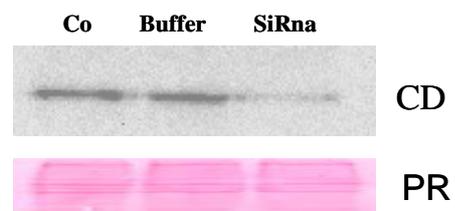
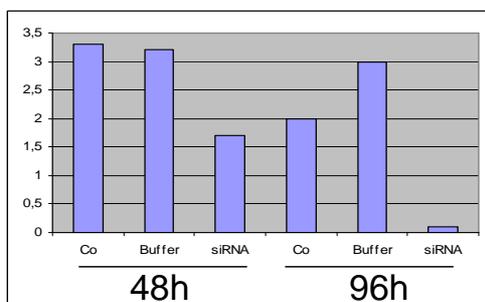


Figura 13. Knock down di catepsina D.

Nelle colture trasfettate con siRNA specifico per CD esposte al perossido la mortalità (espressa come percentuale di cellule necrotiche tripano blu-positive) risulta essere sostanzialmente sovrapponibile a quella rilevata nelle cellule di controllo non trattate (13). La trasfezione per sé con o senza siRNA, in queste condizioni sperimentali, non risulta essere tossica per le cellule.

Questi dati ci permettono di concludere che la CD ha un ruolo importante e precoce nella segnalazione della risposta citotossica allo stress ossidativo, essendo la proteolisi CD-mediata necessaria e indispensabile perché si verifichino l'attivazione delle caspasi e gli altri eventi biochimici e morfologici tipici dell'apoptosi.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal S., Sohal R. S. (1994). Aging and proteolysis of oxidized proteins. *Archives of Biochemistry Biophysics* 309:24-28.
- Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C., Agid Y. (1997). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol* 12 :25-31
- Bahr B. A., Bendiske J. (2002). The neurophathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *Journal of Neurochemistry* 83:481-489.
- Ballard F.J. Regulation of protein breakdown by epidermal growth factor in A431 cells. 1985 *Exp. Cell. Res* 157 (1) 172-80
- Barlow C., Ribaut-Barassin C., Zwingman T.A., Pope A.J., Brown K.D., Owens J.W., Larson D., Harrington E.A., Haeblerle A.M., Mariani J., Eckhaus M., Herrup K., Bailly Y. 2000. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *PNAS* 97:871-876
- Blommaert E.F., Luiken J.J. et al. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270 :2320-2326.
- Bohley P., Seglen P.O. 1992. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia.* 48: 151-7
- Borlongan C. V., Kanning K., Poulos S. G., Freeman T. B. et al. (1996). Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *Journal Fla Med Assoc.* 83: 335-341.
- Browne S. E., Ferrante R. J., Beal M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 9: 147-163.
- Bursch W., Ellinger A., Gerner C., Frohwein U., Schulte-Hermann R. 2000. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann. Y. Acad. Sci.* 926: 1-12.

Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS . 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. Aug;17(8):1595-607

Butterfield D. A., Kanski, J. (2001). Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mechanical Ageing and development* 122:945-962.

Castino R., Pace D., Demoz M., Gargiulo M., Ariatta C., Raiteri E., Isidoro C. 2002. Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas. *Int J Cancer* 97:775-779.

Castino R., Demoz M. and C. Isidoro. Destination "lysosome": a target organelle for tumour cell killing? *J. Mol. Recognition* 2003, 16:1-13.

Castino R., Davies J., Beaucourt S., Isidoro C., Murphy D. (2005) Autophagy is a prosurvival mechanism in cells expressing an autophagosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene. *The FASEB journal*.
<http://www.fasebj.org/cgi/reprint/043162fjev1?ijkey=K2Vc9Gi3nmRgI&keytype=ref&siteid=fasebj>.

Castino R., Isidoro C., Murphy D. (2005) Autophagy-dependent cell survival and cell death in an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus in vitro model. *The FASEB Journal*.
<http://www.fasebj.org/cgi/reprint/043163fjev1?ijkey=VCXLqVFV5bDSs&keytype=ref&siteid=fasebj>.

Cataldo, A.M., Hamilton, D., Barnett, J.L., Paskevich, P.A., and Nixon, R.A. 1996. Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 186-199.

Cuervo A.M., Dice J.F. 1998. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* 76: 6-12.

Cuervo A.M., Mann L., Bonten E.J., d'Azzo A., Dice J.F. 2003. Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J.* 22: 47-59.

Deiss L.P., Galinka H., Berissi H., Cohen O., Kimchi A. 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 15:3861-3870.

Davies K. J.(1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry* 262:9895-9901.

De Duve C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137 :391-7.

Démoz M., Castino R., Cesaro P., Baccino F.M., Monelli G., Isidoro C. 2002. Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNF α , not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D. *Biol Chem* 383:1237-1248.

Davies, J., and Murphy, D. (2002) Autophagy in hypothalamic neurons of rats expressing a familial neurohypophysial diabetes insipidus transgene. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 629-637.

Dunlop 2002

Dunn W.A. 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol* 110:1923-1933

Dunn, 1994 . *Trends Cell Biol* 4:139-143

Guicciardi M.E., Deussing J., Miyoshi H., Bronk S.F., Svingen P.A., Peters C., Kaufmann S.H., Gores G.J. 2000. Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106:1127-37 .

Goldberg A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 18: 895-9.

Gomez-Santos C., Ferrer I., Santidrian A.F., Barrachina M., Gil J., Ambrosio S. 2003. Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res* 73 :341-35.

Hansen L.L., Ikeda Y., Olsen G.S., Busch A.K., Mosthaf L. (1997). Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 274: 25078-84.

Hoff H.F., Zyromski N., Armstrong D., O'Neil L. (1993). Aggregation as well as chemical modification of LDL during oxidation is responsible for poor processing in macrophages. *J. Lipid Res.* 34: 1919-29.

Hoyvik K., Gordon P.B., Berg T.O., Stromhaug P.E., Seglen P.O. (1991). Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J. Cell. Biol.* 113: 1305-12.

Jellinger, K.A. 2000. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 107,1-29.

Jenner P., Olanow C.W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:S161-S170.

Jia L., Dourmashkin R.R., Alleen P.D., Gray A.B., Newland A.C., Kelsey S.M. 1997. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br. J. Haematol.* 98: 673-85.

Kegel K.B., Kim M., Sapp E., McIntyre C., Castano J.G., Aronin N., DiFiglia M. 2000. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J. Neurosci.* 20: 7268-78.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Curie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-57.

Kihara A., Noda T., Ishihara N., Ohsumi Y. 2001. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 152: 519-30.

Kim J., Klionsky D.J. 2000. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 303-42.

Klionsky D.J., Emr S.D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290: 1717-21.

Klionsky D.J., Ohsumi Y. 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. cell. Dev. Biol.* 15:1-32.

Knecht E., Hernandez-Yago J., Grisolia S. 1984. Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp. Cell. Res.* 154:224-32.

Kopitz J., Kisen G.O., Gordon P.B., Bohley P., Seglen P.O. 1990. Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 111: 941-53.

Larsen and Sulzer 2002

Laszlo L., Lowe J., Self T., Kenward N., Landon M., McBride T., Farquhar C., McConnell I., Brown J., Hope J. 1992. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol.* 166 :333-341.

Lee H.G., Petersen R.B, Zhu X., Honda K., Aliev G., Smith M.A., Perry G. (2003). Will preventing protein aggregates live up to its promise as prophylaxis against neurodegenerative diseases? *Brain Pathol.* 13:630-8.

Lemasters J.J., Oian T., Elmore S.P., Trost L.C., Nishimura Y., Herman B., Bradham C.A. 1998. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors.* 8: 283-5.

Lim C.S., Lee J.C., Kim S.D., Cheng D.J., Kaang B.K. (2002). Hydrogen peroxide-induced cell death in Aplasia sensory neurons. *Brain Research* 941:137-145.

Lockshin R.A., Zakeri Z. (2002). Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:2405-19.

Mattson M.P. 2000. Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary restriction, telomerase activation, and stem cell therapy. *Exp. Gerontol.* 35: 489-502.

Mitchener J.S., Shelburne J.D., Bradford W.D., Hawkins H.K. 1976. Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am. J. Pathol.* 83:485-91.

Munafò D.B., Colombo M.I. 2001. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell. Sci.* 114: 3619-29.

Nixon R.A., Cataldo A.M., Mathews P.M. 2000. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem. Res.* 25: 1161-72.

Petersen et al., 2001 *Hum Mol Genet* 10 :1243-1254.

Schweichel J.U., Merker H.J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7: 253-66.

Seglen P.O., Gordon P.B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagi/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 79:1889-1892.

Simonian N. A., Coyle J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Annu Rev pharmacol toxicol* 36:83-106.

Standtman, E. R., Levine, R. L.(2000). Protein oxidation. *Annals of New York Academy of Sciences* 899:191-208.

Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W.C. (2002). Mechanisms of aging: appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology & Medicine* 33:575-586.

Squier T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology* 36:1539-1550.

Stephanis L., Larsen K., Rideout H. J., Sulzer D., Greene L. A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in Pc12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *Journal of Neuroscience* 21:9549-9560.

Sundelin S. P., Nilsson S. E., Brunk U. T. (2001). Lipofuscin-formation in cultured retinal pigment epithelial cells is related to their melanin content. *Free Radical Biology & Medicine* 30:74-81.

Szweda P. A., Camouse M., Lundberg K. C., Oberley T. D., Szweda L. I. (2003). Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic system. *Ageing Research Review* 2:383-405.

Terman A., and Brunk U.T. (1998). Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106:265-76.

Turk et al., (2002) *Biol Chem* 383:1035-1044.

Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.

Yuan J., Lipinski M., Degterev A. (2003). Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron.* 40:401-13.

Zakeri A., Glasauwer F.E., Egnatchik J.G. 1995. Familial syringomyelia: case report and review of the literature. Surg. Neurol. 44: 48-53.

ATTIVITA' FORMATIVA

(Anno 2004-2005)

SEMINARI

25 Novembre 2004 REPERTAXIN, UN NUOVO INIBITORE DI IL-8: RISULTATI PRECLINICI E IDENTIFICAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE

Dr. Riccardo Bertini (Centro Ricerche Dompé, L'Aquila)

11 Marzo 2005 PROTEOMICA DELL'EPITELIO INTESTINALE

Prof.ssa Margherita Ruoppolo (Dip.di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II")

21 Marzo 2005 SCLEROSI MULTIPLA: RICERCA DI GENI DI SUSCETTIBILITA' NELLA POPOLAZIONE FINLANDESE

Dott.ssa Rosanna Asselta (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano)

23 Marzo 2005 LE CELLULE DENDRITICHE, UN GIOCATORE CHIAVE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA: QUALI E QUANTI TIPI?

Dott.ssa Stefania Nicola (Dip. Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro")

6 Aprile 2005 TOWARDS REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CHROMATIN MODIFICATION: SOME BIOMEDICAL MODEL.

Prof. Gerardo Lopez-Rodas (Dipartimento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de Valencia)

30 Maggio 2005 IL DOLORE ARTICOLARE: UN PROBLEMA CLINICO O BIOCHIMICO?

Prof. Giampiero Pescarmona (Dip. Genetic, Biologia e Biochimica, Università di Torino)

1 Giugno 2005 GENI E TRAPIANTI

Prof. Antonio Amoroso (Università di Torino)

8 Giugno 2005 PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA: ASPETTI MEDICI, BIOLOGICI E LEGALI

Prof. Torre (Procreazione assistita: aspetti psicologici)

Dott.ssa Fortina (Fecondazione medicalmente assistita: aspetti tecnici)

Prof. Somigliano (Diagnosi genetica pre-impianto)

Prof. Pelissero (Il difficile equilibrio tra procreazione medicalmente assistita e diritti del concepito)

Prof. Prat (Cellule staminali: stato dell'arte)

**17 Giugno 2005 LA TOSSINA DELLA PERTOSSE ED IL SUO B-OLIGOMERO: NUOVI FARMACI
IMMUNOSTIMOLANTI E ANTI-HIV**

Guido Poli (DIBIT, Istituto San Raffaele, Milano)

24 Giugno 2005 MOLECULAR MECHANISMS OF PARKINSON'S DISEASE

Prof. Stefano Gustincich (SISSA di Trieste)

**12 Settembre 2005 CARATTERISTICHE E POTENZIALITA' DELLE CELLULE ISOLATE DALLE MEMBRANE
FETALI UMANE: AMNION E CORION**

Ornella Parolini (centro di Ricerche E. Menni, Brescia)

**13 Settembre 2005 FUNCTIONS OF RIBOSOMAL PROTEIN S19: IMPLICATIONS FOR DIAMOND
BLACKFAN ANEMIA**

Steven R. Ellis (Dept of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville)

20 Settembre 2005 REGOLAZIONE DELL' APOPTOSI DA PARTE DI GLUCOCORTICOIDI AD ANNESSINA-1

Prof. Luca Parente (Ordinario di Farmacologia, Dip.Sienze Farmaceutiche, Università di Salerno)

CONGRESSI (anno 2004-2005)

IPS (International Proteolysis Society) Meeting : 14-19 Ottobre 2005 (Quebec City, Canada)

I Congress of Physiological Sciences of Serbia and Montenegro with international participation: 9-
12 Novembre 2005

PUBBLICAZIONI

Ulrike Bening, **Roberta Castino**, Norbert Harth, Ciro Isidoro, and Andrej Hasilik. Lysosomal Segregation of a mannose- rich glycoprotein imparted by the prosequence of myeloperoxidase. J. Cell. Biochem. 71(2): 158-68 (1998).

Marina Demoz, **Roberta Castino**, Antonella Dragonetti, Francesco M. Baccino e Ciro Isidoro.
Transformation by oncogene Ras-p21 alters the processing and subcellular localization of the lysosomal protease cathepsin D. *J. Cell. Biochem.* 73: 370-378 (1999).

A. Dragonetti, M. Baldassarre, **R. Castino**, M. Demoz, A. Luini, R. Buccione, C. Isidoro
The lysosomal protease Cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the Rat Basophilic/Mast cell Line RBL.
J. Cell Science 2000, 113:3289-3298

P. Cesaro, E. Raiteri, M. Demoz, **R. Castino**, F.M. Baccino, G. Bonelli and C. Isidoro.
Expression of Protein Kinase C α 1 confers resistance to TNF α - and taxol-induced apoptosis in HT-29 coloncarcinoma cells.
Int. J. Cancer 2001, 93:179-184

R. Castino, D. Pace, M. Demoz, M. Gargiulo, C. Ariatta, E. Raiteri e C. Isidoro.
Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human Neuroblastoma.
Int. J. Cancer 2002, 97:775-779

M. Demoz, **R. Castino**, P. Cesaro, F.M. Baccino, G. Bonelli and C. Isidoro.
Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNF α , not by etoposide in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of Cathepsin D.
Biol. Chem 2002, 383: 1237-1248.

R. Castino, M. Demoz and C. Isidoro.
Destination "lysosome": a target organelle for tumour cell killing?
J. Mol. Recognition 2003, 16:1-13.

R. Carini, **R. Castino**, M. G. De Cesaris, R. Splendore, M. Demoz, E. Albano and C. Isidoro
Preconditioning-induced cytoprotection in hepatocytes requires Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes. *J. Cell Sci.* 2003, 1065-1077.

M. Lkhider, **R. Castino**, C. Isidoro and M. Ollivier-Bousquet.

Cathepsin D secreted by lactating rat mammary epithelial cells processes Prolactin in physiological conditions. *J. Cell Sci.* 2004, 117: 5155-64.

R. Castino, J. Davies, S. Beaucourt, C. Isidoro and D. Murphy

Autophagy is a pro-survival mechanism in mouse neuroblastoma cells expressing a familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene. <http://www.fasebj.org/cgi/reprint/04-3162fjev1?ijkey=K2Dc9Gi3nmRgI&keytype=ref&siteid=fasebj> *FASEB J.* 2005.

R. Castino, C. Isidoro and D. Murphy. Autophagy –dependent cell survival and cell death in a Familial Neurohypophyseal Diabetes Insipidus *in vitro* model. <http://www.fasebj.org/cgi/reprint/04-3163fjev1?ijkey=VCXLqVfV5bDSs&keytype=ref&siteid=fasebj> *FASEB J.* 2005.

Demoz M., **Castino R.**, Follo C., Hasilik A., B.F. Slogane and Isidoro C. High Yield synthesis and characterisation of phosphorylated recombinant human procathepsin D expressed in mammalian cells. *Prot. Exp. Purif.* 2005. in Press.

Valente G., Manfroi F., Peracchio C., Nicotra G., **Castino R.**, Nicosia G., Kerim S. and Isidoro C. cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in Non Hodgkin's Lymphomas of low-grade malignancy. *British J. Haematol.* 2005. Accettato per la pubblicazione.

Carini R., N.F. Trincheri, E. Alchera., M.G. De Cesaris., **Castino R.**, Splendore R., E. Albano and Isidoro C. Nitric oxide protects hepatocytes from hypoxic damage through stimulation of PI3K-dependent exocytosis of lysosomes: involvement of Ras-and Guanylate Cyclase pathways. 2005. *Free Radicals*, (in sottomissione).