

Fig.1. Analisi citofluorimetrica delle cellule DLD-1 con Annessina V-FITC.

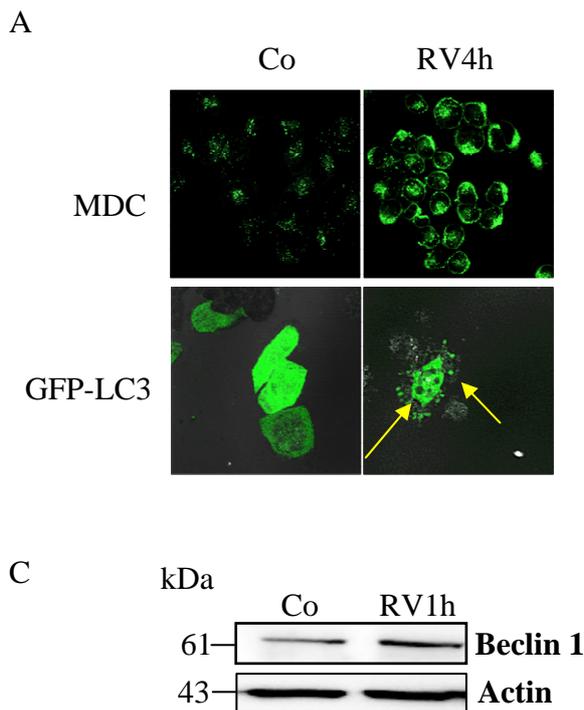


Fig.2: **RV induce iper-regolazione dell'ATG nelle DLD-1** A) Marcatura dei vacuoli autofagici mediante MDC. B) Trasfezione con GFP-LC3 e in seguito trattamento con RV 100mM: si può notare l'evidente formazione di vacuoli autofagici LC3-positivi a 4h dal trattamento. C) Espressione di Beclin-1 in cellule DLD-1 di controllo e trattate con RV (1h).

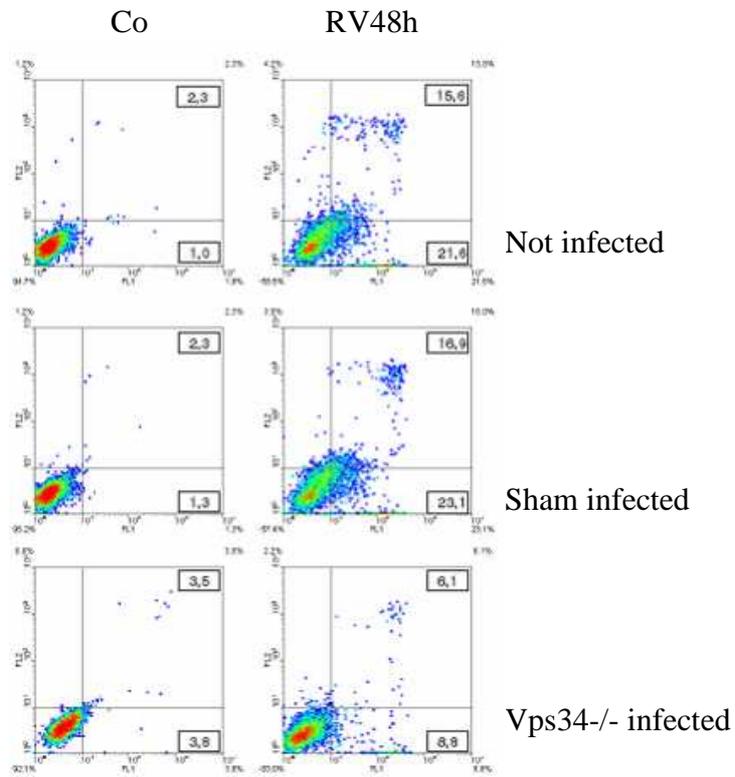


Fig.3 Analisi citofluorimetrica delle cellule incubate a fresco con Annessina V-FITC e PI.

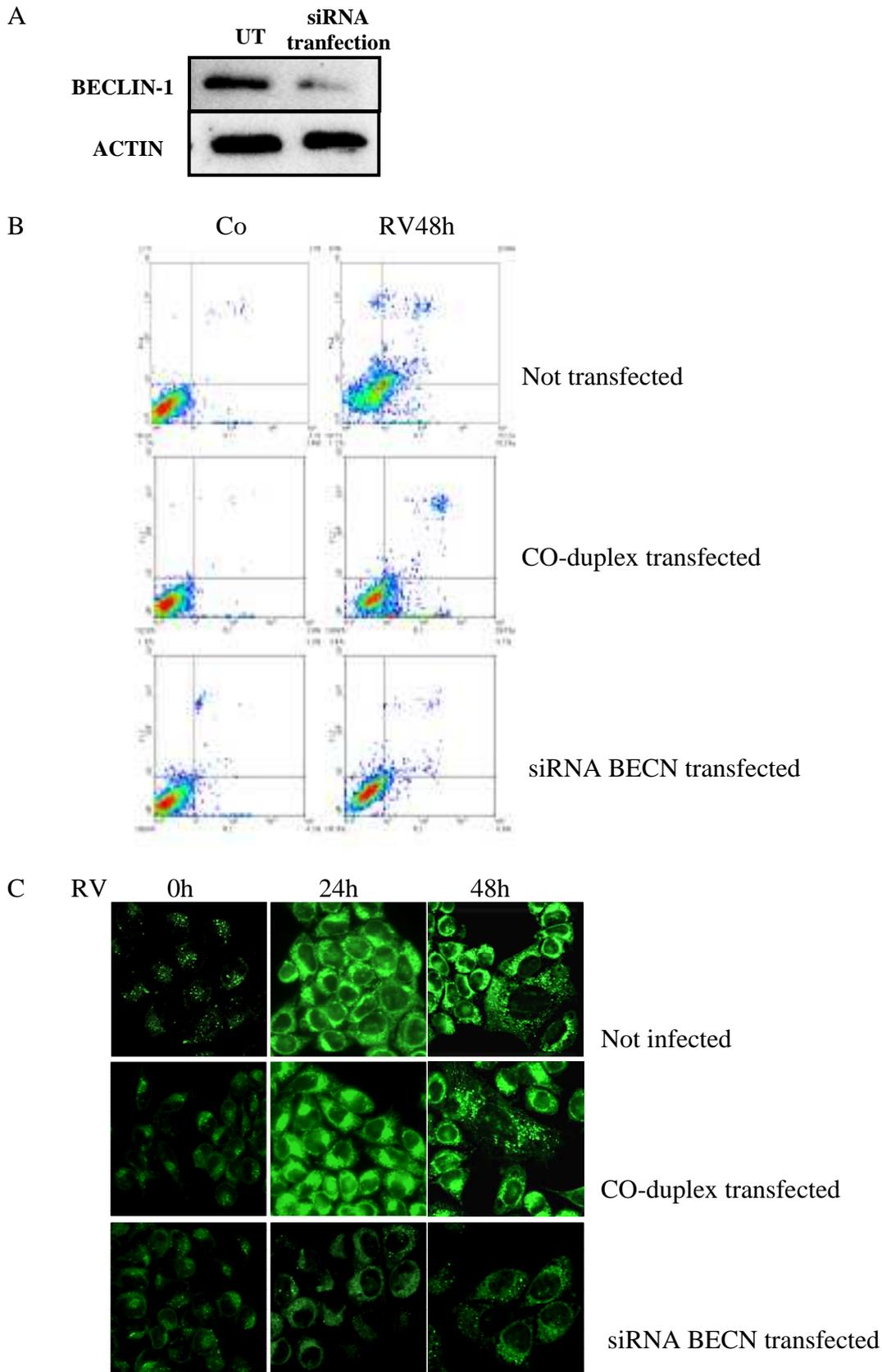


Fig.4: Il silenziamento genico di Beclin-1 protegge dalla morte indotta da RV.

A) Western Blot delle cellule DLD-1 incubate con l'anticorpo per la rilevazione di Beclin-1. B) Analisi citofluorimetrica delle cellule trasfettate incubate con Annessina V-FITC e PI. C) Marcatura dei vacuoli autofagici mediante MDC delle cellule trasfettate

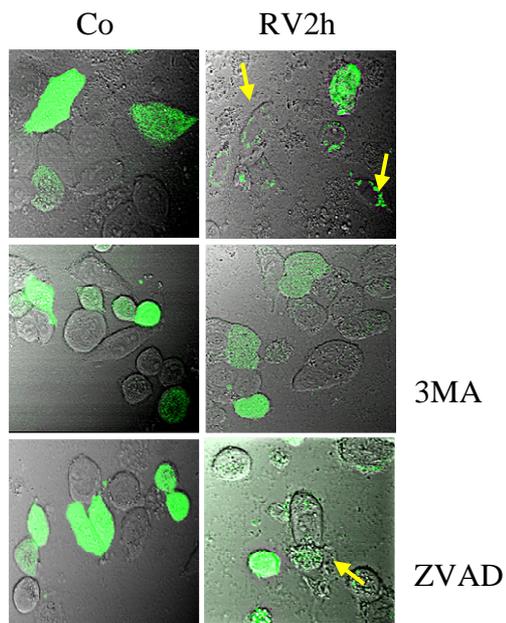
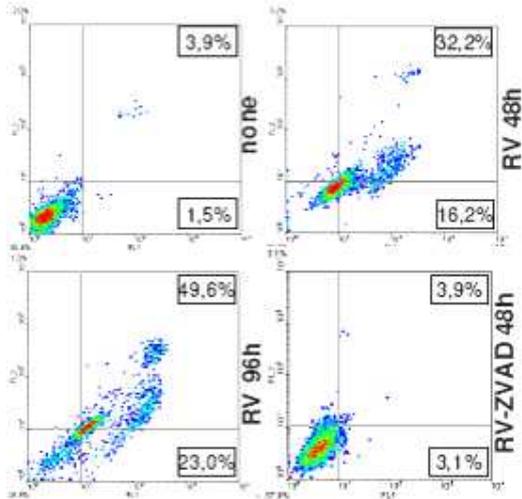


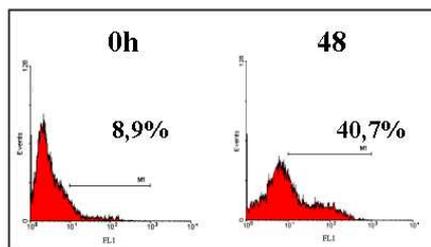
Fig.5: Effetto di 3-MA e ZVAD sulla delocalizzazione di LC3 indotta da RV.

A) Le cellule sono state trasfettate con GFP-LC3 ed in seguito trattate con RV: si può notare l'evidente formazione di vacuoli autofagici LC3-positivi a 2h dal trattamento. Nelle cellule pre-incubate con 3-MA non sono più presenti i vacuoli autofagici.

A



B



C

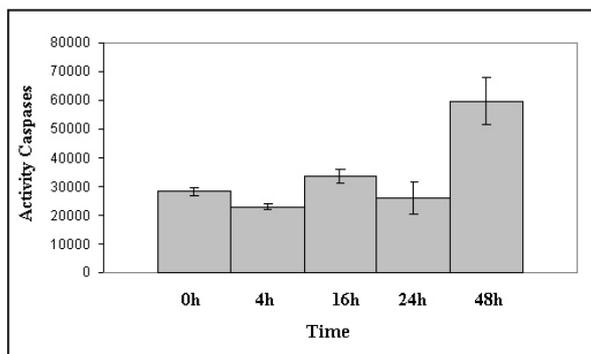
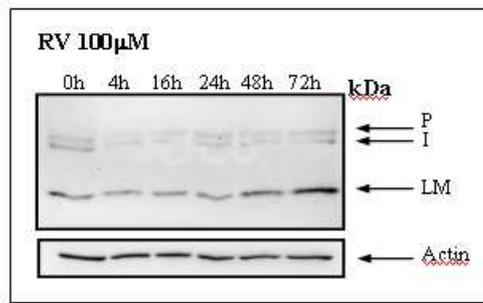


Fig.6: Il RV induce morte cellulare caspasi dipendente in cellule di colon-carcinoma. A) Analisi citofluorimetrica delle cellule incubate con Annexina V-FITC e PI. B) Dosaggio delle caspasi totali mediante lo ZVAD-FMK-FITC e lettura al citofluorimetro. C) Dosaggio della caspasi-3 e lettura allo spettrocount

A



B

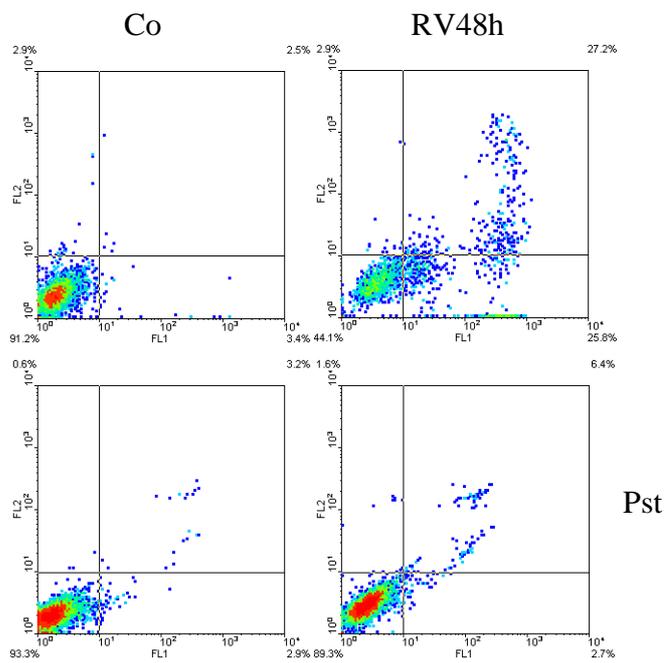
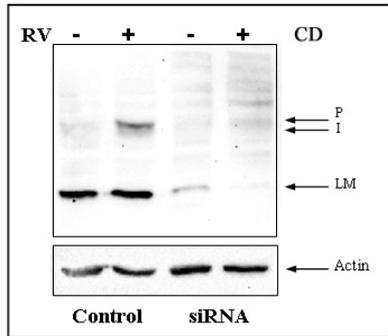


Fig.7: **Effetto del RV sull'espressione di CD.** A) Western Blot delle cellule DLD-1 incubate con l'anticorpo per la rilevazione della Catepsina D. B) Analisi citofluorimetrica delle cellule incubate con Annessina V-FITC e PI.

A



B

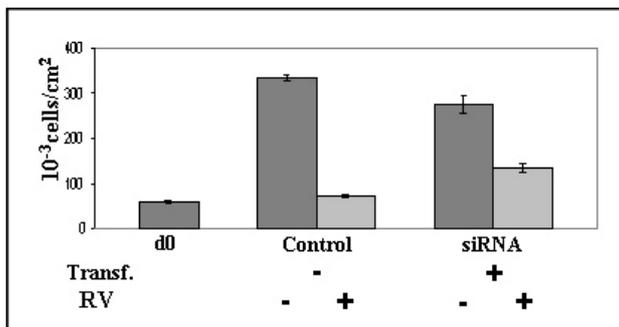


Fig.8: **Il silenziamento genico di CD protegge la linea cellulare DLD-1 dalla morte indotta da RV.** A) Western Blot per la rilevazione della Catapsina D. B) Istogramma della conta cellulare a 48h dal trattamento con RV 100 μ M.

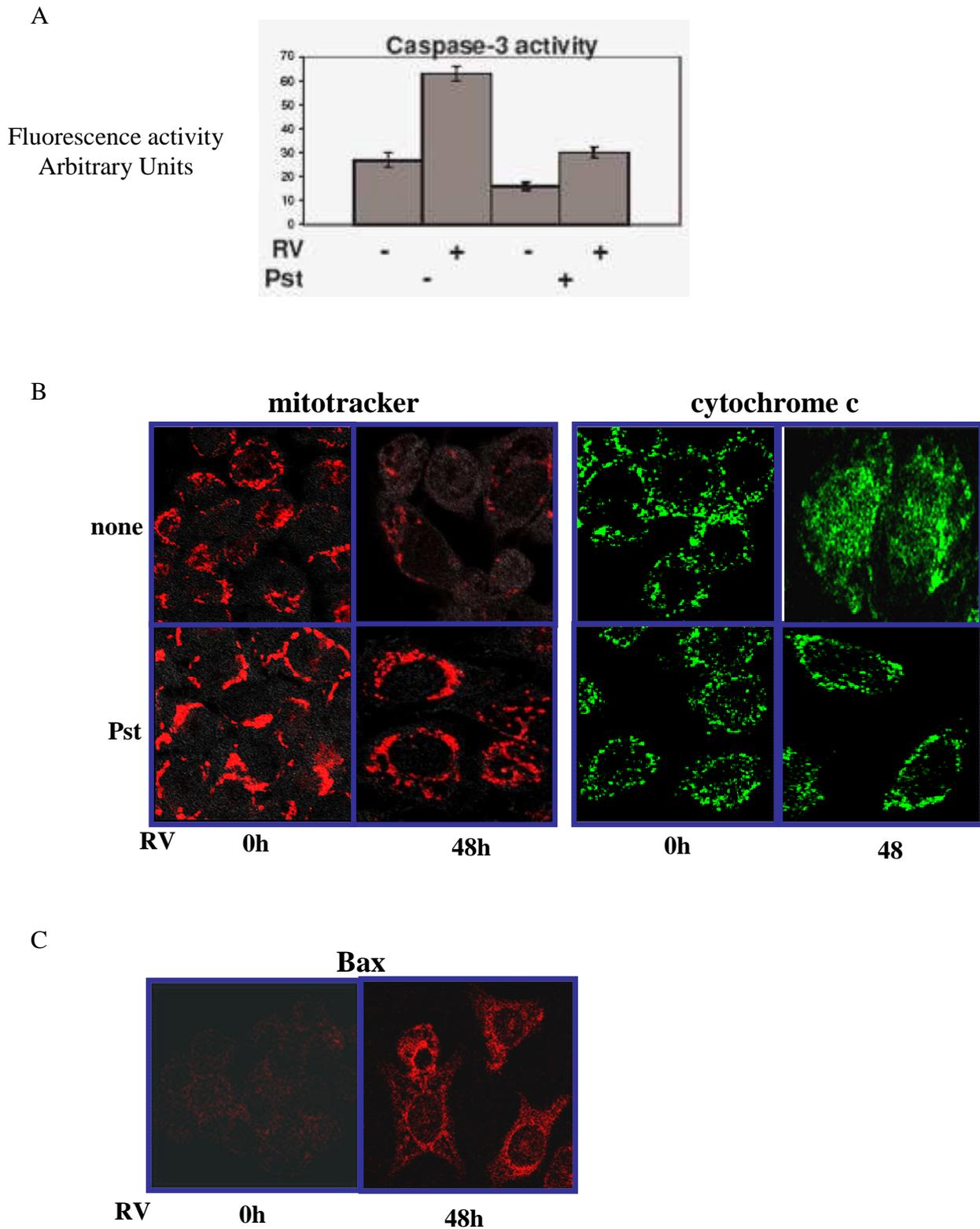


Fig.9 **La morte cellulare caspasiica è mediata dall'attività di CD.**A) Dosaggio della caspasi-3 delle cellule DLD-1 incubate con RV 100 μ M e Pst 100 μ M. Lettura mediante spettrocount. B) Immunofluorescenza in rosso con il mitotraker, in verde il citocromo c. C) Immunofluorescenza in rosso di Bax.