

**Università degli Studi del Piemonte Orientale**

*“A. Avogadro”*

Facoltà di Medicina e Chirurgia

**Dottorato in Medicina Molecolare-ciclo XX**

**Relazione annuale, A.A: 2005-2006**

II anno

**RELAZIONE COMPLESSA TRA AUTOFAGIA, PROTEOLISI  
LISOSOMICA E MORTE CELLULARE**

Relatore: Prof.Ciro Isidoro

Dottoranda: Nicol Trincheri

## **INTRODUZIONE**

### **Omeostasi tissutale e neoplasia: il ruolo della morte cellulare nella patogenesi e nella progressione del cancro**

Il tumore è una condizione in cui l'omeostasi tissutale è irreversibilmente perduta.

Negli ultimi venti anni le ricerche hanno definitivamente chiarito che il costante accrescimento di volume del tumore, associato all'aumento del numero di cellule, è da attribuirsi a due fattori: l'aumento del tasso proliferativo e la riduzione di quello di morte cellulare.

L'importanza della morte cellulare programmata nell'accrescimento della massa tumorale è facilmente apprezzato nei tumori solidi (ad esempio nell'osteosarcoma o nel cancro del colon-retto). Il corretto avvio del programma di "suicidio cellulare" (rappresentato dall'apoptosi o dalla morte autofagica) nella cellula neo-trasformata gioca un ruolo protettivo nelle prime fasi della cancerogenesi.

### **Morte cellulare programmata di tipo I e II: apoptosi e autofagia**

**L'apoptosi** (o morte cellulare programmata di tipo I) contribuisce alla regressione dei tumori in risposta a vari interventi terapeutici quali la chemioterapia, la radioterapia e l'ipertermia (Barry et al. 1990). Sono state descritte tre vie di innesco:

**1-** la via "intrinseca", che coinvolge direttamente i mitocondri; il rilascio di proteine tossiche nello spazio intermedio mitocondriale provoca la permeabilizzazione della membrana esterna degli stessi organelli. Questo è definito "punto di non-ritorno". Alcune proteine della famiglia Bcl-2 controllano questo processo (Green et al., 2002): tra queste proteine vi sono Bax e Bak. L'attività di queste due proteine è contrastata da Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, che impediscono la dimerizzazione delle proteine pro-apoptotiche. La prima proteina ad essere rilasciata dal mitocondrio è il citocromo c che interagisce con Apaf-1 e caspasi-9 per formare l'apoptosoma.

**2-** la via "estrinseca", che dipende dall'attivazione di recettori di membrana (recettori di morte) e che attiva la cascata caspatica. Infatti la pro-caspasi 8 possiede un dominio simile al DED (Death Effector Domain), sito di legame comune a tutti i recettori della famiglia TNF. In seguito vengono attivate le caspasi 3 e 7 con la conseguente manifestazione delle modificazioni biochimiche e strutturali tipiche del processo apoptotico ( Su et al., 1999).

**3-** nel caso di stimolazione del TNFR1 (recettore p55 del TNF $\alpha$ ), in aggiunta alla via di traduzione del segnale che direttamente coinvolge la pro-caspasi 8 attraverso l'interazione DED, è stata dimostrata l'esistenza di una via di segnalazione che origina in seguito all'endocitosi del complesso TNFR1- TNF $\alpha$  (Heller et al., 1994). La traslocazione negli endosomi di questo complesso avvierebbe l'attivazione della sfingomielinasi acida con conseguente produzione di ceramide (Wiegmann et al., 1994; Monney et al., 1998) e successivo coinvolgimento della catepsina D, una proteasi lisosomica acida che pure ha un ruolo nell'innescare dell'apoptosi (Deiss et al., 1996; Dèmoz et al., 2002). Negli ultimi anni si è studiato un meccanismo che correla le catepsine con le caspasi: tale meccanismo coinvolge il rilascio del citocromo c dai mitocondri a seguito del taglio proteolitico di Bid ad opera della Catepsina B (Guicciardi et al., 2000; Stoka et al., 2001) oppure un'azione diretta della Catepsina D su Bad (Kronke et al., 2004) o, ancora, un'attivazione conformazionale in via diretta della proteina Bax (Bidère et al., 2003).

Anche la **morte cellulare autofagica** (o morte cellulare programmata di tipo II) ha un ruolo importante nel contrastare lo sviluppo del tumore, soprattutto in quelle condizioni di innesco del processo autofagico in risposta a stress metabolici (da privazione di nutrienti) o ossidativi. Nelle cellule eucariote l'autofagia rappresenta il meccanismo degradativo principalmente coinvolto nel recupero di subunità molecolari e nel turnover dei vari costituenti cellulari, incluse le membrane e gli organuli, ed è il solo meccanismo per mezzo del quale interi organuli come mitocondri e perossisomi vengono riciclati.

Essa è regolata da numerosi fattori incluse le purine (Kovacs et al., 1981), i fattori di crescita (Xue et al., 1999), il siero (Amenta et al., 1978), agonisti adrenergici (Seglen et al., 1990) e secondi messaggeri (Codogno et al., 1997).

L'autofagia è caratterizzata dalla comparsa di vescicole, o vacuoli autofagici o autofagosomi, che aumentano di numero e di dimensioni nella cellula interessata dal processo; tali vescicole sono costituite da una doppia membrana, contenenti porzioni di citoplasma e/o organelli citoplasmatici, come mitocondri e reticolo endoplasmatico.

Il processo autofagico può essere suddiviso in almeno quattro fasi:

I) induzione; II) formazione dell'autofagosoma: ha origine da una estroflessione del reticolo endoplasmatico liscio (Dunn et al., 1990) e dal TGN( trans Golgi network) (Stromhaug et al., 1998). Questo processo è regolato dalle GTPasi, fosfatidilinositolo chinasi e fosfatasi; III)

fusione dell'autofagosoma con il lisosoma: il contenuto viene rilasciato nel lume del lisosoma ed è soggetto all'azione delle idrolisi di diverse classi; IV) degradazione del corpo autofagico. Nel processo autofagico vi è l'intervento sia della PI3-kinasi di classe III che della PI3-kinasi di classe I che agiscono in direzioni opposte per l'attivazione (Petiot et al., 2000).

La PI3-kinasi di classe III (PI3K III) ha la funzione di attivare l'autofagia e determina l'accumulo di fosfatidilinositolo-fosfato PIP<sub>2</sub> e PIP<sub>1</sub>, due messaggeri lipidici che segnalano l'innesco dell'autofagocitosi. Beclin 1 è una proteina che forma complessi con la PI3K-III favorendone l'attivazione e conseguentemente promuove l'avvio del sequestro autofagico (Kihara et al., 2001).

La PI3-kinasi di classe I (PI3K-I) inibisce la macroautofagia e favorisce la sintesi proteica, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (Kim and Klionsky, 2000; Petiot et al., 2000). Infatti, dopo la stimolazione da parte dei fattori di crescita la PI3K-I promuove l'attivazione di PKB/Akt e di conseguenza di mTOR, che favorisce la sintesi delle proteine.

In condizioni di stress, PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten), una lipide proteasi, interviene riducendo i livelli di PIP<sub>3</sub> che si riflette in una diminuzione dell'attività di Akt e di conseguenza di mTOR (Arico et al., 2001).

### **La catepsina D**

La catepsina D (CD) è una endopeptidasi presente in tutte le cellule eucariote, localizzata prevalentemente negli endosomi e nei lisosomi. E' stata considerata come maggiore componente lisosomica in tutte le cellule e tessuti di mammifero. La catepsina D è attiva solitamente nei lisosomi ed endosomi, solo occasionalmente negli spazi extracellulari in seguito a danneggiamenti cellulari. Il suo ruolo principale è la degradazione delle proteine all'interno dei lisosomi ("turnover" o ricambio metabolico). La CD esiste nella forma di:

- precursore (P), rilevabile in western blot con il peso molecolare di 53kDa
- intermedio (I), 47kDa
- matura, costituita dalla catena leggera e catena pesante.

La CD svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, nella proliferazione, nel differenziamento, nella morte cellulare ed anche nella degradazione della matrice extracellulare e metastatizzazione.

## **Il Resveratrolo: un nuovo anti-tumorale**

Il resveratrolo (3,4',5-trans-tri-idrossi-stilbene) è un polifenolo di origine vegetale presente in alcune spermatofite, principalmente nell'uva rossa, nelle noccioline americane e nei pinoli.

Questa molecola è implicata nell'inibizione della proliferazione e nell'induzione dell'apoptosi in linee cellulari tumorali umane (Lee et al., 2004).

Il resveratrolo (RV) può provocare la morte cellulare di tipo apoptotico in cellule di colon carcinoma.

In queste cellule il resveratrolo provoca l'attivazione delle caspasi e accumulo delle proteine apoptotiche Bax e Bak. (Delmas et al., 2003).

L'induzione dell'apoptosi da parte del resveratrolo è stata dimostrata sulla linea cellulare di adenocarcinoma del colon Caco-2 mediante misurazione dell'attività della caspasi-3, che aumenta dopo 24 e 48h di trattamento con 200 µM di resveratrolo. Inoltre è stato osservato un arresto in fase S, ma tale inibizione del ciclo da parte della molecola è indipendente dall'inibizione della cicloossigenasi. Inoltre, concentrazioni comprese nel range di 10-100µM di resveratrolo attivano le caspasi e conducono le cellule SW480 di carcinoma coloretale all'apoptosi. L'attivazione delle caspasi è associata con l'accumolo delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak.

Negli ultimi anni alcuni studi hanno, però, dimostrato che il resveratrolo può indurre anche la morte cellulare autofagica; infatti, trattando una linea cellulare del tumore all'ovaio con tale molecola si è notato il rilascio del citocromo c, la formazione dell'apoptosoma e l'attivazione delle caspasi, apparentemente tutte caratteristiche tipiche della morte apoptotica, ma in realtà associate anche alla formazione di autofagosomi, rilevati al microscopio elettronico. È stata analizzata la progressione del ciclo cellulare dopo trattamento con resveratrolo, e dimostrato che a solo 24h, usato ad una concentrazione di 50µM, può indurre un arresto cellulare in fase S; invece, se utilizzato ad una concentrazione di 100µM le cellule si trovano in fase G<sub>0</sub>-G. Il dato interessante è che non si è notato alcun aumento, nelle cellule trattate, di DNA ipodiploide, suggerendo che la morte apoptotica non è stata attivata (Opipari AW Jr et al., 2004).

## **SCOPO DELLA RICERCA**

L'obiettivo del mio secondo anno di dottorato è stato analizzare l'effetto citotossico e il meccanismo molecolare d'azione del RV sulle cellule di carcinoma coloretale.

In un primo momento abbiamo studiato le caratteristiche morfologiche e biochimiche della morte cellulare indotta dal RV per verificare che fosse caspasi-dipendente o caspasi-indipendente. Dopo aver messo a punto le condizioni sperimentali di citotossicità del RV nelle DLD-1 mediante valutazione della morte cellulare programmata con Annessina V<sup>Fitc</sup>, sono stati fatti esperimenti per valutare le vie di traduzione al segnale di morte coinvolte nel pathway. Abbiamo visto che in tempi precoci di trattamento con RV e attivava il processo autofagico, valutato con la colorazione mediante monodansilcadaverina, le trasfezioni con GFP-LC3 e con il western blot per valutare l'espressione della proteina Beclin 1.

In seguito abbiamo valutato il ruolo attivo di Beclin 1 nell'attivazione del processo autofagico con metodi biochimici (incubazione con 3 Metiladenina), molecolari (Infezione con il virus Vps34<sup>-/-</sup> e Knock-down con siRNA appropriati) e analisi citofluorimetriche con Annessina V<sup>fitc</sup> e Propidio Ioduro (PI).

In seguito abbiamo studiato il coinvolgimento della catepsina D (CD) e valutato l'effetto del RV sull'espressione della CD stessa e il suo ruolo attivo durante la morte indotta dal farmaco alle 48h, con metodi biochimici (incubazione con Pepstatina A) e molecolari (knock-down con siRNA appropriati). Infine abbiamo valutato a quali tempi fosse elevata l'attività delle caspasi, in particolar modo l'attività della caspasi-3, e il rilascio del citocromo c e l'oligomerizzazione di Bax per poter meglio comprendere il ruolo della CD nell'attivazione a morte cellulare programmata di tipo I e la sua funzione di inibitore della crescita del nostro modello cellulare dopo trattamento con RV.

## **MODELLO SPERIMENTALE**

La linea cellulare DLD-1 deriva da un adenocarcinoma colo-rettale umano di stadio C, secondo la classificazione di Dukes, isolato da un uomo di origine caucasica (Dexter et al., 1979). Queste cellule hanno proprietà invasive, metastatiche e sono tumorigeniche in topi nudi (Dexter et al., 1979). Esse esprimono la forma mutata oncogenica di diversi proto-oncogeni tra cui il c-myc, K-Ras, N-Ras, H-Ras, myb, sis e fos (Trainer et al., 1988). Sono, inoltre, positive per l'espressione di p53 mutata (Rodrigues et al., 1990).

## MATERIALI E METODI

### Colture cellulari

Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule di colon-carcinoma umano DLD-1.

Queste cellule sono state coltivate in un terreno composto da DMEM, 10% siero fetale bovino, 4mM di glutammina e 1% di una soluzione di penicillina e streptomina.

Per gli esperimenti descritti le cellule sono state piastrate in multiwell da 6 o da 12 pozzetti ad una determinata densità utile per l'esperimento.

### Trattamenti farmacologici

Per tutti gli esperimenti le cellule sono state incubate con il Resveratrolo (RV) ad una concentrazione di 100µM e veniva riaggiunto al terreno di coltura ogni 24h.

In alcuni esperimenti le cellule prima di essere trattate con il RV sono state pre-incubate 2h prima con sostanze inibitorie della via autofagica-lisosomica:

-3-metiladenina (3-MA) 10mM, inibitore della PI3-K di classe III (2h prima)

-ZVAD 30µM, inibitore sintetico che corrisponde al peptide substrato non idrolizzabile delle caspasi 9 e 3 (2h prima)

-Asparagina (Asn) 50mM, inibisce la fusione del lisosoma con l'autofagosoma

-Pepstatina A (PstA) 100µM (inibitore specifico di catepsina D, un'aspartico-proteasi lisosomica) pre-incubata circa 8h prima.

### Immunoblotting

I campioni (30-50µg di proteine totali) sono stati denaturati a 95C° per almeno 5minuti in tampone Laemmli (20 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerolo in Tris-Hcl 50mM pH 6,8 e blu di bromofenolo) e poi separati mediante elettroforesi verticale SDS-PAGE su gel di acrilamide e bis-acrilamide.

Dopo essere stata saturata, con PBS/BSA 5% per 1h a temperatura ambiente, la nitrocellulosa è incubata con l'anticorpo primario diluito in PBS/BSA 2,5% .

Al termine dell'incubazione la nitrocellulosa è sottoposta ad una serie di lavaggi in PBS/triton 0,05% e incubata per 1h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario diluito in una soluzione di PBS/BSA 2%.

### Valutazione della morte cellulare attraverso la positività all'Annexina V-FITC e PI

L'Annexina V è una proteina che si lega alla fosfatidilserina traslocata dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica durante le prime fasi dell'apoptosi e durante la

morte autofagica, mentre il propidio Ioduro è un intercalante fluorescente del DNA che non permea le membrane integre e pertanto evidenzia la cromatina soltanto della cellula morta per necrosi. Le cellule presenti nel terreno di coltura e quelle adese, raccolte e risospese in terreno fresco, sono state colorate con Annexina V-FITC e PI per 15 minuti. Al termine dell'incubazione la fluorescenza è stata rilevata mediante analisi citofluorimetrica.

### MDC

La presenza di vacuoli autofagici può essere messa in evidenza utilizzando la monodansilcadaverina (Munafò D.B, Colombo M.I. 2001).

La monodansilcadaverina (MDC) è una sostanza lipofila ad alta affinità per le membrane dei lisosomi/vacuoli autofagici. L'MDC se colpita da luce ultravioletta emette una fluorescenza verde rilevabile con un microscopio a fluorescenza.

Le cellule adese su vetrino sono incubate con MDC 0,05mM per 10min a 37°.

Dopo i 10min le cellule sono lavate con terreno 1-2 volte e osservate (vitali, non fissate) al microscopio a fluorescenza.

### Trasfezione transiente con GFP-LC3

LC3 è l'omologo in mammifero della proteina Atg 8 del lievito. Recentemente, è stato dimostrato che LC3 viene incorporato nelle vescicole autofagiche in condizioni che inducono l'autofagia ed è quindi considerato un buon marcatore degli autofagosomi (Kabeya et al.,2000; Mizushima et al., 2004).

Le cellule sono state piastrate su vetrini da immunofluorescenza (Ø 2mm), ad una determinata densità in modo che al momento della trasfezione siano al 50% della confluenza.

Come lipide cationico abbiamo utilizzato la Lipofectamina seguendo il protocollo suggerito dalla ditta.

### Immunofluorescenza

Le cellule piastrate su vetrini sterili vengono fissate in metanolo 95% freddo per 20min, permeabilizzate per 10minuti con 0,2% PBS/Triton e incubate per 16h in camera umida con anticorpi primari anti-Beclin-1 (1:50), anti-Bax (1:50), e per 1h con un anticorpo mouse monoclonale anti-catepsina D (1:100), diluiti in una soluzione di PBS/Triton 0,1% e siero 4%.

Dopo un ciclo di lavaggi in PBS/Triton 0,1% le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario fluoresceinato (1:200) e un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con Texas Red (1:200).

I vetrini vengono successivamente montati su vetrini portaoggetto e osservati al microscopio confocale (Leica).

## TUNEL

Questo metodo che è detto TUNEL - acronimo di "TdT mediato dUTP nick end labelling" - ha permesso la visualizzazione in situ della frammentazione del DNA a livello di singole cellule. Le estremità 3'-OH possono essere "nick end labelled" con dUTP biotinilato mediante TdT e poi evidenziate usando FITC coniugata ad avidina per consentire la colorazione specifica.

## Mitotracker

E' una sonda utilizzata per monitorare il cambiamento del potenziale di membrana dei mitocondri. E' una colorazione a fresco e viene utilizzato nelle cellule alla concentrazione di 250nM.

## Attivazione delle caspasi

In seguito all'induzione del processo apoptotico si ha l'attivazione di proteasi specifiche, dette caspasi.

Abbiamo valutato l'attivazione delle caspasi mediante citofluorimetria a flusso utilizzando un kit: Caspase Detection Kit (FITC-VAD-FMK).

Questo kit utilizza un peptide costituito dalla sequenza VAD-FMK e coniugato ad un fluorocromo. Il complesso FITC-VAD-FMK permeabilizza la membrana plasmatica, non è tossico e il suo legame alle caspasi è irreversibile.

Le cellule al termine del trattamento vengono raccolte (vedi Annexina) e incubate con 1µl di FITC-VAD-FMK e incubate per 1h a 37°.

Per l'analisi al citofluorimetro il pellet viene risospeso in 300µl di buffer e l'analisi dei campioni viene fatta in FL1.

## Trasfezione con siRNA

Le cellule vengono piastrate in multiwell da 12 pozzetti ad una densità di 20000 cell/cm<sup>2</sup>.

Come lipide cationico abbiamo utilizzato la Lipofectamina.

Si preparano, per condizione, parallelamente 2 provette da 1,5ml con 100µl di terreno Optimen serum free.

## Infezione con virus adenovirale

L'adenovirus da noi utilizzato in questo lavoro è stato ottenuto in collaborazione con il laboratorio del prof. Murphy a Bristol ed esprime la forma dominante negativa del Vps34p (Vps34<sup>-/-</sup>). In base alla titolazione ottenuta abbiamo utilizzato 1ml di adenovirus purificato in 1ml di terreno. 24h ore dopo si ha il 90% di cellule infettate.

## **RISULTATI**

### **1. Il Resveratrolo induce morte cellulare sia ATG-dipendente che caspasi-dipendente**

Le cellule sono state piastrate ad una densità di 23000cell/cm<sup>2</sup> e lasciate aderire almeno 24h prima dell'inizio del trattamento (d0). Al tempo zero (d0) è stata valutata la densità cellulare, per accertarsi che le cellule fossero in condizioni di attiva proliferazione. Le cellule sono state preincubate (2h) con Asn 50mM e ZVAD 30μM e successivamente con RV 100μM(48h).

Al termine del trattamento, la morte cellulare è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica di cellule non fissate colorate con Annessina V<sup>Fitc</sup> per quantificare la morte cellulare programmata ( morte cellulare apoptotica o morte autofagica).

Nelle prime 24h dal trattamento non si ha nessun effetto citotossico indotto dal RV ma solo un arresto della crescita cellulare (dati non mostrati).

In Fig.1 è mostrata l'analisi citofluorimetrica di cellule DLD-1 trattate per 48h con RV 100μM: nella coltura cellulare trattata, oltre il 50% delle cellule risulta positivo all'Annessina V<sup>Fitc</sup>, mentre nelle colture trattate sia con RV che con gli inibitori la positività ha un valore di circa 11%; questo dato indica una protezione dalla morte autofagica (da parte dell'Asparagina) e dalla morte apoptotica (da parte dello ZVAD) a 48h dal trattamento con il farmaco. Il dato indica che il Resveratrolo induce morte cellulare programmata sia di tipo apoptotica o che autofagico.

### **2. Il Resveratrolo induce l'attivazione del processo autofagico in cellule di colon-carcinoma DLD-1**

In seguito abbiamo analizzato l'effetto del RV sulle cellule di colon-carcinoma nelle prime ore dal trattamento. A 4h si è visto un accumulo di autofagolisosomi positivi alla monodansilcadaverina (MDC) (Fig.2A).

In altri esperimenti le cellule sono state trasfettate con il plasmide GFP-C2-LC3 e poi, a 24h dalla trasfezione, trattate con RV per 4h; nelle cellule di controllo, come atteso, la fluorescenza appare citosolica, mentre nelle cellule trattate si è osservata una precoce redistribuzione della fluorescenza che assume un aspetto puntiforme, ad indicare la traslocazione della proteina LC3 sulla membrana del nascente vacuolo autofagico (Fig.2B).

A conferma dei dati sin qui riportati abbiamo analizzato, mediante western blot, i livelli di espressione di Beclin-1, una proteina regolatrice dell'autofagia che forma il complesso con la PI3K-III e UVRAG( Liang C. et al., 2006).

L'analisi è stata effettuata in cellule esposte a RV con un esperimento "time course"; il dato riportato in Fig.2C mostra un aumento dell'accumulo di Beclin-1 ad 1h dal trattamento.

### **3.La morte cellulare programmata di tipo II indotta dal Resveratrolo è protetta dall'espressione ectopica della PI3K-III dominant negative.**

La PI3K di classe III è necessaria per l'innescamento della macroautofagia, formando il complesso con Beclin-1 e UVRAG.

In questa serie di esperimenti abbiamo utilizzato il vettore adenovirale ricombinante per la sintesi della forma "dominant negative" di Vps34 ( l'omologo in lievito della PI3K-III) e per verificare il coinvolgimento della chinasi nella via di segnalazione autofagica innescata dal RV.

Le cellule sono state piastrate ad una densità tale da avere una confluenza del 50% al momento dell'infezione. A 24h dall' infezione con il vettore adenovirale vuoto e il vettore contenente Vps 34-/-, sia le cellule non infettate che quelle infettate sono state incubate con Rv.

Dopo 48h di trattamento il monostrato cellulare è stato incubato con Annessina V<sup>Fitc</sup> e PI. Dall'analisi citofluorimetrica è stato verificato che il Resveratrolo induce morte cellulare nelle cellule sia di controllo che quelle infettate con il vettore vuoto; nelle cellule, invece, che esprimono la forma di Vps34-/- è evidente un effetto protettivo e non viene raggiunta la stessa percentuale di morte indotta da RV.

Da questi dati si può asserire che l'espressione della forma mutant negative della PI3 chinasi di classe III previene la morte cellulare indotta dal farmaco (Fig.3).

### **4.Il silenziamento di Beclin-1 previene l'induzione dell'autofagia e la morte cellulare.**

Per supportare le nostre ipotesi abbiamo effettuato il silenziamento genico della proteina Beclin-1 nelle cellule DLD-1 ed in seguito, a 24h della trasfezione, abbiamo trattato le cellule con RV per 48h. In esperimenti preliminari abbiamo messo a punto le condizioni ottimali di trasfezione del siRNA specifico per ottenere il massimo effetto di iporegolazione di Beclin-1, senza che ciò risultasse tossico per le cellule.

L'immunoblotting, mostrato in Fig.4A, mostra la differenza di espressione della proteina tra le cellule "wild-type" (wt) e le cellule trasfettate con siRNA specifico ed è evidente una "down-regulation" quasi del 90%.

Dalla Fig.4B si evince un effetto protettivo dalla citotossicità indotta dal farmaco; questo supporta maggiormente l'ipotesi che nelle prime 48h si ha una attivazione della morte autofagica indotta da Beclin-1 con l'attivazione della PI3K di classe III.

La Fig.4C dimostra che a 48h dal trattamento si ha l'accumulo dei vacuoli MDC positivi nelle cellule di controllo (non trasfettate e trasfettate con il co-duplex), mentre nelle cellule trasfettate con le siRNA di BECN i vacuoli positivi diminuiscono in modo significativo e non si osserva attivazione della morte cellulare, dimostrata con la TUNEL (dati non mostrati).

### **5.L'inibizione farmacologia della PI3K previene l'attivazione dell'autofagia.**

Per verificare, ulteriormente, il coinvolgimento attivo del processo autofagico nell'induzione della morte cellulare da parte del RV, abbiamo eseguito esperimenti di incubazione con Rv 2h dopo la trasfezione con il plasmide GFP-LC3. Le cellule, inoltre, a 24h dalla trasfezione sono state preincubate con 3-metiladenina (3-MA), inibitore della PI3K e la sua azione si esplica nelle fasi iniziali del processo autofagico, ed in seguito trattate con Rv 2h. La Fig.5 mostra l'assenza di vacuoli autofagici nelle cellule trattate con Rv e 3MA e quindi sembra essere inibita la formazione dei vacuoli LC3 positivi. Nello stesso esperimento le cellule sono state pre incubate con lo ZVAD ma non si è visto alcuna differenza dalle cellule trattate solo con il farmaco. Questo dato conferma che il Resveratrolo nelle prime ore attiva un processo autofagico, inibito farmacologicamente dalla 3-MA, ma non attiva ancora alcun meccanismo di morte apoptotica (non si ha protezione con lo ZVAD a 2h). Questi dati confermano che nelle cellule di colon-carcinoma si ha un'attivazione precoce dell'autofagia indotta dal Resveratrolo e solo alle 48h si ha effetto citotossico.

### **6.Il resveratrolo induce l'attivazione delle caspasi**

Dai dati sin qui riportati si evince che il Resveratrolo è in grado di attivare il processo autofagico nelle prime ore del trattamento e di avere un comportamento citotossico solo alle 48h. Come abbiamo già asserito in Fig.1, dalle 48h in poi si ha una protezione dalla morte pre-trattando le cellule con ZVAD. Per meglio comprendere a livello molecolare il meccanismo dell'azione citotossica del RV, abbiamo valutato la quota di morte cellulare

indotta per apoptosi caspasi-dipendente utilizzando ZVAD (Wang et al., 2002), inibitore sintetico che corrisponde al peptide substrato non idrolizzabile delle caspasi 9 e 3.

A questo scopo le cellule trattate con RV sono state incubate contemporaneamente con ZVAD e abbiamo valutato gli effetti mediante analisi citofluorimetrica. A conclusione del periodo di incubazione (96h) abbiamo marcato le cellule a fresco con Annessina V<sup>Fitc</sup> e PI.

Il dato ottenuto riportato in Fig.6A rivela che lo ZVAD esercita un effetto protettivo nei confronti della citotossicità da resveratrolo soprattutto tra le 72h e le 96h.

In seguito abbiamo eseguito un esperimento di “time course” con RV 100µM in cui abbiamo valutato a quale tempo la cascata caspasi fosse attiva. Dai nostri risultati si è visto un aumento di attività caspasi mediante incubazione dei campioni cellulari con ZVAD-FITC-FMK e analisi al citofluorimetro per valutare l’attivazione delle caspasi totali.

In Fig.6B viene rilevata una notevole attività caspasi del 40,7%. L’aumento di attività non viene trovato nei campioni trattati con RV a tempi inferiori.

In seguito ci siamo proposti di valutare l’attività della caspasi-3, effettrice della morte cellulare apoptotica. L’istogramma, rappresentato in Fig.6C, mostra l’esperimento di “time course” dove è visibile l’aumento dell’attività di caspasi-3 solo alle 48h dal trattamento.

## **7.Effetti del resveratrolo sull’espressione di catepsina D**

Tenuto conto del coinvolgimento della proteolisi lisosomica mediata da catepsina D (CD) nella morte cellulare programmata sia di tipo I che di tipo II, abbiamo valutato gli effetti del Resveratrolo sull’espressione di questa proteasi lisosomica.

Abbiamo eseguito esperimenti di “time course” per valutare l’espressione della CD in funzione del tempo di trattamento con RV. L’analisi mediante immunoblotting in Fig.7A mostra un accumulo di CD nei lisosomi (forma matura bicaenaria, solo il peptide LM di 32kDa è visibile sul gel) già dopo 48h di esposizione al RV; l’accumulo è ancora più evidente dopo 72h, tempi che coincidono con l’innesco della morte cellulare.

L’attivazione caspasi, pertanto, coincide con l’aumentare dell’espressione della forma matura della CD.

In una prima serie di esperimenti abbiamo utilizzato l’inibitore specifico della catepsina D, la Pepstatina A (Pst) (Isidoro C. et al., 1997).

Le cellule sono state preincubate (8h) con Pst A 100µM e successivamente con RV 100µM(48h). Al termine del trattamento, la morte cellulare è stata valutata mediante conta cellulare e analisi citofluorimetrica di cellule non fissate colorate con Annessina V<sup>Fitc</sup> e ioduro

di Propidio. Questo esperimento ha mostrato che la CD ha un ruolo attivo nell'innesco della morte apoptotica RV-dipendente: la sua inibizione, infatti, determina nelle culture trattate con RV un aumento delle proporzioni delle cellule vitali dal 43,5% al 68% (riquadro in basso a sinistra), come è evidente dal grafico Annessina V<sup>fitc</sup>/PI (Fig.7B).

### **8.La catepsina D ha un ruolo attivo nella morte cellulare indotta dal resveratrolo:effetti protettivi della Pepstatina A e del Knock-down mediante siRNA**

Al fine di dimostrare inequivocabilmente il ruolo di CD nel meccanismo di citotossicità del RV, ci siamo avvalsi della tecnica di “knock-down” dell'espressione proteica mediante “piccoli RNA interferenti”. L'immunoblotting, mostrato in Fig.8A, mostra la differenza di espressione della catena pesante (LM) tra le cellule “wild-type” (wt) e le cellule trasfettate con siRNA specifico.

Dopo le 24h dalla trasfezione, le cellule sono state incubate con il RV per 48h. Nelle cellule wt si ha un aumento della forma a 32 kDa.

Per quanto riguarda i campioni trasfettati è evidente una “down-regulation” quasi del 90% della proteina.

Il dato interessante è che il campione trasfettato e trattato con il resveratrolo non presenta alcun aumento della catena pesante, ma anzi una diminuzione ulteriore di tale espressione, come se la sintesi di catepsina D fosse bloccata dopo il trattamento con la molecola (Fig.8A).

Dalla conta cellulare, effettuata mediante il test di esclusione con il Tripan Blu, si osserva che il silenziamento di CD mediante l'uso di siRNA specifici protegge le cellule dalla morte indotta da RV (Fig.8B).

Questo dato è giusto confrontarlo con quello precedente per poter comprendere che è proprio a 48h che si ha protezione dalla morte apoptotica e che non si ha nessun aumento della forma matura della CD dopo il trattamento con il RV. L'aspartico-proteasi ha, quindi, un ruolo fondamentale durante l'innesco della cascata apoptotica indotta dal Resveratrolo.

### **9.La catepsina D media l'apoptosi indotta dal resveratrolo con il rilascio di citocromo c**

Al fine di verificare l'effetto protettivo di CD sulla morte cellulare indotta da RV ci siamo proposti di valutare l'attività della caspasi-3 a 48h trattando le cellule con RV e con Pst A.

In Fig.9A è rappresentato l'istogramma dell'attività della caspasi-3: a 48h, il controllo con Pst A presenta una bassa attività caspasi-3, addirittura inferiore al controllo non trattato. Nelle cellule, invece, incubate con il RV si riscontra lo stesso aumento di attività già verificatasi in

precedenza (Fig.6C), mentre nelle cellule incubate sia con RV che con Pst A l'attività subisce una notevole diminuzione ed infatti si ha una minore percentuale di morte verificata anche con la TUNEL (dati non mostrati).

I dati sin qui riportati dimostrano che l'azione citotossica del Resveratrolo è mediata dall'azione della CD, in un primo tempo, e delle caspasi. La Fig.9B mostra la colorazione con il Mitotracker e il suo rilascio solo nelle cellule trattate con RV, mentre cellule trattate anche con l'inibitore, PstA, questo fenomeno non avviene (segno che i mitocondri rimangono integri). Inoltre abbiamo cercato di capire se nelle stesse condizioni sperimentali oltre alla permeabilizzazione dei mitocondri, si potesse avere anche il rilascio di citocromo c mediante un'immunofluorescenza. In Fig.9B si osserva che, nel controllo la fluorescenza verde appare distinta e puntiforme, mentre dopo il trattamento appare diffusa a causa del rilascio di citocromo c nel citosol. In presenza di PstA la fluorescenza rimane distinta e puntiforme.

Bax, una proteina appartenente alla famiglia Bcl-2, è coinvolta nella permeabilizzazione e nella ricollocazione citosolica del citocromo c e di altre proteine. Nelle cellule di coloncarcinoma trattate con RV si ha iperespressione di Bax (Heinrich M. et al., 2004) che viene attivata dalla catepsina D (Bidere N et al., 2003) con conseguente oligomerizzazione di Bax stesso. Nei nostri esperimenti, mediante immunofluorescenza (Fig.9C), a 48h dal trattamento si ha un cambiamento nella distribuzione cellulare di Bax (in rosso), come ci aspettavamo nel caso della sua oligomerizzazione sulle membrane mitocondriali.

## **CONCLUSIONI**

Dai dati riportati in questo lavoro possiamo asserire che il Resveratrolo induce un'azione citotossica a 48h dal trattamento, la formazione, in tempi precoci, di vacuoli GFP-LC3 positivi e l'attivazione dell'autofagia protetta con la "down-regulation" di Beclin-1 e con l'inibizione della PI3K di classe III. Inoltre il Resveratrolo induce l'aumento e l'accumulo lisosomale di catepsina D tempo-dipendente (dimostrato in western blot). Abbiamo visto l'inibizione dell'attività delle caspasi totali con ZVAD, maggiormente alle 72h e 96h, e l'aumento sia dell'attività di tutte le caspasi che quella della caspasi-3, inibita però dalla Pepstatina A.

Questo lavoro ha permesso di chiarire i “pathways” proteolitici coinvolti nella citotossicità indotta dal Resveratrolo nelle cellule di colon-carcinoma. Beclin-1 ha un ruolo essenziale nell’attivazione dell’autofagia nelle cellule DLD-1 che precede la morte apoptotica mediata dalle caspasi e dalla catepsina D e la sua attivazione sembra precedere la cascata caspatica citosolica (oligomerizzazione de Bax e rilascio nel cytosol di citocromo c).

I nostri dati indicano che le condizioni metaboliche o farmacologiche modulano l’espressione della catepsina D e potrebbero, dunque, influenzare le cellule di carcinoma coloretale alla sensibilità indotta dal Resveratrolo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Amenta JS, Sargus MJ, Baccino FM. *J. Cell Physiol.* 97:267-283, 1997
- Arico S, Petiot A, Bauvy C et al. *J.Biol.Chem.* 38:35243-35246, 2001
- Barry MA, Behnke CA, Easrman A, *Biochem. Pharmacol.* 40:2353-2362,1990
- Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A, *J.Biol.Chem.* 278:31401-11
- Bos JL, *Nature* 327:293-297, 1987
- Codogno P, Ogier-Denis E, Hourii JJ. *Cell Signal.* 9:125-130, 1997
- Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dibrez-Daloz L, La truffe N, Solary E, *J. Biol. Chem.* 278:41482-90, 2003
- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A, *EMBO J.* 15:3861-3870, 1996
- Démoz M, Castino R, Cesaro P, Baccino FM, Monelli G, Isidoro C, *Biol. Chem.* 383:1237-1248, 2002
- Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P, *Cancer Res.* 39:1020-1025, 1979
- Dunn WA Jr. *J. Cell Biol.* 110:1923-1933, 1990
- Green DR, Evan GI, *Cancer Cell* 1:19-30, 2002
- Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ, 106:1127-1137, 2000
- Heller RA, Kronke M, *J.Cell Biol.* 126:5-9, 1994
- Holen I, Gordon PB, Seglen PO, *Biochem.J.* 284: 633-636, 1993

Isidoro C, De Stefanis D, Démoz M, Ogier-Denis E, Codogno P, Baccino FM, Cell Growth Differ 8:1029-37, 1997

Kim J, Klionsky D.J. Annu.Rev.Biochem. 69:303-342, 2000

Kronke J, Kittler R, Buccholz F, Windisch MP, Pietschmann R, Frese M, J. Virol. 7:3436-46, 2005

Kovacs AL, Molnar K, Molnar K, Seglen PO. FEBS Lett. 16:134:194-196, 1981

Lee EJ, Min HY, Joo Park H, Chung HJ, Kim S, Nam Han Y, Lee SK, Life Sci. 75(23):2829-2839, 2004

Lockshin RA, Zakery Z, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36:2405-2419, 2004

Monney L, Oliver R, Otter I, Jansen B, Poirier GG, Borner C, E.J.B. 251:295-303, 1998

Opipari AW Jr, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR, Cancer Res. 64:696-703

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommart EF, Meijer AJ, Codogno P, J. Biolog. Chem. 275:992-998, 2000

Rodrigues NR, Proc. Natl. Sci U S A 87:7555-7559, 1990

Seglen PO, Gordon PB, Holen I. Semin. Cell Biol. 1:441-448, 1990

Shiratsuchi A, Watenabe L, Takeuki O, Akira S, Nakanishi Y, J. Immunol. 172:2039-47, 2004

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman Y, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS, J Biol. Chem. 276:3149-57. 2001

Stromhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO. Biochem J. 15:335-340, 1998

Su XM, Mac Farlene M, Zhung J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM, J.B.C. 274: 5053-5060, 1999

Tafari M, Cohn JA, Karpinich NO, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL, J.Biol.Chem. 277:49569-76, 2002

Trainer DL, Int.J. Cancer 41:287-296, 1988

Volgestein B, N. Engl. J. Med. 319:525-532, 1998

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Mol.Cell.Neurosci. 14:180-198, 1999

Wang Q, Li N, Wang X, Kim MM, Evers BM, Clin Cancer Res. 8:1940-7, 2002

## ATTIVITA' FORMATIVA

(Anno 2005-2006)

### SEMINARI

**18 Novembre 2005.** Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. Dr. Diego Cotella

**23 Novembre 2005.** HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications. Prof. Luigi Elio Adinolfi.

**25 novembre 2005.** Mechanism of transcriptional regulation and disease. Prof. Robert Tjian.

**19 Gennaio 2006.** Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. Prof.ssa Maria Grano.

**13 Febbraio 2006.** New perspectives in metabotropic glutamate receptors. Prof. Ferdinando Nicoletti.

**15 Febbraio 2006.** Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. Prof. Daniele Sblattero.

**13 Marzo 2006.** Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. Dr.ssa Atonia Follenzi.

**20 Marzo 2006.** The natural course of preclinical type 1 diabetes. Prof. Mikael Knip.

**23 Marzo 2006.** La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa sub sahariana. L'esperienza del programma dream. Dott.ssa Susanna Ceffa.

**30 marzo 2006.** Analisi spettrale dell'intervallo RR dell'elettrocardiogramma. Un moderno strumento per l'analisi digitale dell'attività elettrica cardiaca. Dott. Andrea Brunoni.

**6 Aprile 2006.** Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia". Dott. Francesco Forconi.

**20 Aprile 2006.** Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative. Dott.ssa Daniela Cilloni.

**3 Maggio 2006.** Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute. Dr. Claudio Jommi

**4 maggio 2006.** Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale. Dott. Luciano Mutti.

**15 maggio 2006.** Strategies to maintain oral food intake in patients with advanced malignant disease: success and failures. Prof. Vickie E. Baracos.

**18 Maggio 2006.** L'epatite autoimmune. Prof. Marco Lenzi.

**30 Maggio 2006.** Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni. Dott.ssa Marialuisa Lavitrano.

**15 Giugno 2006** Melusin: a stretch sensor molecule controllino adaptive cardiac remodeling to pressure overload. Prof. Guido Tarone.

**27 Giugno 2006.** Osteointegrazione e superfici implantari. Prof..sa Lia Rimondini.

**5 luglio 2006.** DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design. Dott.ssa Renata Grifantini.

**11 settembre 2006.** The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis. Prof.Dieter Bromm.

## CORSI DI INSEGNAMENTO

CORSO di INGLESE

## PUBBLICAZIONI

• **PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes.**

Carini R, **Trincheri NF**, Alchera E, De Cesaris MG, Castino R, Splendore R, Albano E and Isidoro C. Free Radic Biol Med 2006; 40(10):1738-48.

• **Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D.**

**Trincheri NF**, Nicotra G, Follo C, Castino R and Isidoro C. (accepted with revision)

• **Neurotoxicity by hydrogen peroxide depends on cathepsin D-mediated activation of Bax.**

Castino R, Bellio N, Nicotra G, Follo C, **Trincheri NF**, Peracchio C and Isidoro C. Submitted to Neurotoxicology

• **Folding, Activity and targeting of mutated human cathepsin D that cannot be processed into the double chain form.**

Follo C, Castino R, Nicotra G, **Trincheri NF** and Isidoro C.

Submitted to J Int Biochem Cell Biol.