

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XX***

Relazione 3° anno

TITOLO:

**L'APOPTOSI INDOTTA DAL RESVERATROLO
DIPENDE DALL'ATTIVITA' DELLA LIPIDE CHINASI DI
CLASSE III E DALLA FORMAZIONE DEGLI
AUTOFAGOLISOSOMI**

Candidato: Nicol Francesca Trincheri

Tutor: Ciro Isidoro

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

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_L, 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 caspasi. 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 α), 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 α (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'innesco 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.

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).

Essa è regolata da molecole che vengono racchiuse in due categorie: sensori ed effettori. Gli effettori possono essere ulteriormente definiti di tipo-I e di tipo-II. Gli effettori di tipo-I sono coinvolti nei passaggi del pathway autofagico che permettono la formazione degli autofagosomi (Nair et al. 2005). Tra queste abbiamo la PI3K-III, l'omologo in lievito di Vps34. La PI3-kinasi di classe III ha la funzione di attivare l'autofagia e determinare l'accumulo di fosfatidilinositolo-fosfato PIP2e PIP1, due messaggeri lipidici che segnalano l'innesco dell'autofagocitosi. Beclin 1 è

una proteina che forma complessi con la PI3K-III e UVRAG favorendone l'attivazione e conseguentemente promuove l'avvio del sequestro autofagico (Kihara et al., 2001; Liang et al.2005).

Gli effettori di tipo-II sono invece coinvolti nella maturazione degli autofagosomi (Lamp2, Rab, SNAREs, SKD1) (Nara et al. 2002; Eskelinen et al. 2004).

I sensori del processo autofagico sono i secondi messaggeri e le proteine chinasi che regolano gli steps della formazione degli autofagosomi dopo l'induzione degli effettori, tra questi si hanno PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted an chromosome Ten), una lipide proteasi che interviene riducendo i livelli di PIP3 e che porta ad una diminuzione dell'attività di Akt e di conseguenza di mTOR (Arico et al. 2001), TSC1-TSC2, complesso che agisce attivando la GTPasi Rheb, inibendo mTOR e favorendo il processo autofagico, p53, le proteine chinasi DAPk e gli oncogeni come Akt, Ras.

La chinasi mTOR è il maggior sensore nella regolazione del pathway autofagico. Quando è attivata promuove la sintesi delle proteine e di conseguenza l'inibizione dell'autofagia.

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 resvaratrolo (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. E' stata analizzata la progressione del ciclo cellulare dopo trattamento con resveratrolo, e dimostrato che a solo 24h, usato ad una concentrazione di 50 μ M, può indurre un arresto cellulare in fase S; invece, se utilizzato ad una concentrazione di 100 μ M le cellule si trovano in fase G₀-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 (Opirari AW Jr et al., 2004).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del mio terzo anno di dottorato è stato analizzare l'effetto citotossico e il meccanismo molecolare d'azione del RV sulle cellule di carcinoma coloretale. Dai dati ottenuti e pubblicati abbiamo dimostrato e analizzato le caratteristiche morfologiche e biochimiche della morte cellulare indotta dal RV per verificare che fosse caspasi-dipendente a 48h dal trattamento. Dopo aver messo a punto le condizioni sperimentali di citotossicità del RV nelle DLD-1 mediante valutazione della morte cellulare programmata con Annessina V^{Fitc}, sono stati fatti esperimenti per valutare le vie di traduzione al segnale di morte coinvolte nel pathway. Dai primi dati ottenuti nel corso del 3° anno abbiamo visto che in tempi precoci di trattamento con RV viene attivato il processo autofagico, valutato con la colorazione mediante monodansilcadaverina, le trasfezioni con GFP-LC3 e Beclin1-GFP e con il western blot per valutare l'espressione della proteina Beclin 1 e l'espressione della proteina LC3 II. In questo anno mi è sembrato interessante studiare l'induzione autofagica da parte del resveratrolo per enfatizzare il ruolo di tale pathway nella risposta alle sostanze chemioterapiche e nella stretta relazione tra autofagia e apoptosi nella morte cellulare. Abbiamo valutato il ruolo attivo di Beclin 1 nell'attivazione del processo autofagico con metodi biochimici (incubazione con 3 Metiladenina e Asparagina), molecolari (Infezione con il virus Vps34^{-/-} e Knock-down con siRNA appropriati) e analisi citofluorimetriche con Annessina V^{fitc}.

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

Immunoblotting

I campioni (30-50µg di proteine totali) sono stati denaturati a 95°C per almeno 5 minuti 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%. In seguito sono stati utilizzati gli anticorpi primari di interesse: anti-MapLC3, per verificare l'innescamento del meccanismo autofagico, anti-Beclin1 per valutare l'espressione della proteina durante il trattamento con il RV.

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

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. Le cellule presenti nel terreno di coltura e quelle adese, raccolte e risospese in terreno fresco, sono state colorate con Annexina V-FITC per 15 minuti. Al termine dell'incubazione la fluorescenza è stata rilevata mediante analisi citofluorimetrica e analizzate con il programma WinMDI.

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 le chimere GFP-LC3 e Beclin1-GFP

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-Rab24 (1:50), anti-LC3 (1:50). 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.

Trasfezione con siRNA

Le cellule vengono piastrate in multiwell da 12 pozzetti ad una densità di 20000 cell/cm2.

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^{-/-}). 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.L'Autofagia è un evento precoce e reversibile in risposta al Resveratrolo.

Le cellule sono state piastrate ad una densità di 40000cell/cm² e lasciate aderire almeno 24h prima della trasfezione con le chimere GFP-LC3 e Beclin-GFP. Alle 24h dalla trasfezione le cellule sono state incubate con il Resveratrolo (RV), monitorando in vivo l'attivazione dell'autofagia. In Fig.1A è mostrata l'immagine di fluorescenza e della trasfezione con GFP-LC3: entrambe mostrano che sia l'endogena proteina LC3 che la chimera GFP-LC3 assumono una localizzazione vacuolare nelle cellule trattate per 1h e 2h. Per affermare ulteriormente l'attivazione dell'autofagia è stata valutata, mediante immunoblotting, l'espressione della proteina LC3 II, presente già ad 1h dal trattamento con RV (Fig.1A). Inoltre è stata monitorata la localizzazione della proteina Beclin1 nelle cellule che esprimevano in modo transiente la chimera fluorescente Beclin-GFP. E' stato eseguito un esperimento di time course e sono stati osservati degli aggregati Beclin-positivi già a 15 minuti dal trattamento con il RV (Fig.1C). Infine per verificare se l'autofagia è un processo dovuto ad una breve esposizione al RV, le cellule sono state esposte al trattamento per 2h, ed in seguito sono state lavate e re-incubate con terreno fresco in assenza e presenza del RV e raccolte a 24h e a 48h. Dalla Fig.1D si può notare che con il trattamento con il RV si ha un aumento dei vacuoli MDC positivi già a 2h, evento che viene ripristinato nelle cellule non re-incubate con la sostanza. Da questi esperimenti si può asserire che il trattamento con il RV induce un processo autofagico rapido e reversibile.

2.L'Asparagina previene l'iper-regolazione dell'autofagia-Beclin dipendente indotta dall'esposizione cronica al Resveratrolo.

Per confermare ulteriormente la nostra ipotesi sull'induzione dell'autofagia Resveratrolo-dipendente abbiamo utilizzato l'inibitore 3-Metiladenina. Questa sostanza, ad appropriate concentrazioni (5-10mM), inibisce effettivamente la formazione dei macrocomplessi Beclin-positivi (dato non mostrato). Sono stati utilizzati anche altri amminoacidi per down-regolare l'autofagia. Dai nostri esperimenti l'asparagina (Asn), utilizzata ad una concentrazione di 50mM, previene la formazione dei macro-complessi Beclin-GFP positivi (Fig.2A) e la localizzazione vacuolare di GFP-LC3 (dato non mostrato) nelle cellule esposte a 2h di Resveratrolo. Le cellule

trattate per 24h e 48h con il Resveratrolo presentano l'accumulo di Beclin1, Rab24 ad LC3 (dato non mostrato). Inoltre è stata esaminata l'aumento di espressione di Beclin1 dopo l'esposizione a RV cronico che non viene osservato nelle cellule co-trattate con Asn (Fig.2B).

3.L'Asparagina previene l'apoptosi indotta da Resveratrolo.

E' stato dimostrato che l'esposizione cronica da RV induce a 24h dal trattamento un arresto della crescita cellulare, e a 48h induce morte apoptotica caspasi-dipendente nelle DLD1 mediata dalla Catepsina D e bax (Trincheri N. et al., 2006). In seguito abbiamo verificato se l'induzione dell'autofagia era finalizzata a proteggere le cellule o a indurre morte cellulare. L'iper-attivazione dell'autofagia di per sé è deleteria per le cellule (Bursh W. et al. 2001; Levine B. et al. 2005). Per affermare il reale contributo della morte autofagica e apoptotica nel meccanismo citotossico del RV, le DLD1 sono state esposte alla sostanza per 48h in presenza e assenza dell'inibitore delle caspasi ZVAD-fmk e dell'amminoacido Asn. Si è effettuata una conta cellulare e l'analisi al citofluorimetro delle cellule marcate con Annessina V-FITC, marcatore della morte apoptotica. In accordo con i dati recentemente da noi pubblicati (Trincheri N. et al. 2006), si è vista una positività all'annessina V-FITC di circa il 50% nelle esposte al RV; invece, la morte cellulare era completamente inibita dal co-trattamento con ZVAD-fmk e con l'Asn (Fig.3A). In seguito sono stati esaminati gli effetti di tali inibitori sulle proteine implicate nel processo autofagico. Dalle immagini della Fig.3B si può asserire che l'effetto inibitorio di ZVAD-fmk sulle cellule trattate con RV non riduce la delocalizzazione dell'LC3 e la positività alla marcatura con la monodansilcadaverina (MDC), mentre l'Asn previene la precoce formazione dei vacuoli autofagici.

4. Il silenziamento di Beclin-1 previene la formazione degli autofagosomi e l'apoptosi indotta dal Resveratrolo.

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 (trasfettate con il co-duplex), mentre nelle cellule transfettate con le siRNA di Beclin1 i vacuoli positivi diminuiscono in modo significativo e non si osserva attivazione della morte cellulare, dimostrata con la TUNEL (Fig.4D).

5.La tossicità indotta da Resveratrolo dipende dall'attività della chinasi di classe III.

La PI3K di classe III è necessaria per l'innescamento della macroautofagia, formando il complesso con Beclin-1 e UVRAG (Liang et al. 2005).

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^{Fitc}. Dall'analisi citofluorimetrica è stato verificato che il RV 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(Fig.5A). Inoltre l'espressione ectopica di Vps 34-/- previene completamente l'innescamento dell'autofagia, come dimostrato dalla marcatura con MDC (Fig.5B).

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.

6.Il silenziamento di Lamp2b previene la formazione degli autofagolisomi e la morte cellulare indotta da Resveratrolo.

Per supportare ulteriormente le nostre ipotesi, che la morte cellulare associata all'azione del RV è ATG-dipendente, è stato necessario valutare l'accumulo di vescicole e la formazione di autofagolisomi nella cellula. Entrambe le proteine Lamp1 e Lamp2 sono direttamente coinvolte nel processo di fusione delle vescicole autofagiche con gli endosomi e i lisosomi. In seguito abbiamo effettuato il silenziamento della proteina Lamp2b ed esaminati mediante l'immunofluorescenza delle proteine LC3 e Lamp1, che rispettivamente identificano le vescicole autofagiche e gli endosomi-lisosomi (Fig.6A). Inoltre dalla marcatura con MDC abbiamo osservato che la formazione degli autofagolisomi indotta da RV era inibita nelle cellule transfettate con le siRNA Lamp2b (Fig.6B). I dati citofluorimetrici (Fig.6D) e le conte cellulari (dato non mostrato) dimostrano che il silenziamento della proteina Lamp2b previene l'induzione della morte cellulare annessina V-positiva dovuta all'esposizione cronica del RV.

DISCUSSIONE

L'autofagia è un pathway degradativo mediato dai lisosomi ed è importante per il mantenimento e l'omeostasi tissutale nelle cellule. Un difetto del processo autofagico favorisce la tumori genesi ed i geni coinvolti in tale processo, come Beclin1 e PTEN sono frequentemente mutati nei carcinomi (Liang. Et al., 1999; Di Cristofano et al., 2000; Qu et al. 2003). L'autofagia, inoltre, permette alle cellule cancerose di sopravvivere in casi di mancata nutrizione, prevenendo la necrosi e l'infiammazione associata alla progressione del tumore (Degenhardt et al. 2006). E' importante chiarire il reale ruolo del processo autofagico nelle cellule in risposta al trattamento chemioterapico per definire le strategie farmacologiche. Dai nostri esperimenti l'attività pro-apoptotica del RV nelle cellule di colon carcinoma è mediata da proteine coinvolte nella regolazione e corretta esecuzione dell'autofagia. Nelle DLD1 il RV induce un'attivazione immediata, infatti già a 15 min dal trattamento si è osservata la formazione dei macro-complessi di Beclin-GFP. Inoltre la prolungata e reiterata incubazione con il RV induceva una morte cellulare apoptotica (analizzata mediante positività all'annessina V, positività alla TUNEL) dipendente dall'attività della lipide chinasi di classe III. Inoltre il silenziamento genico delle proteine Beclin1 e Lamp2b, che rispettivamente permettono l'inibizione dell'autofagia e la formazione degli autofagolisosomi, protegge le cellule dall'azione citotossica del RV. E' importante notare che la down-regolazione inibisce la formazione degli autofagolisosomi e determina l'accumulo di vescicole autofagiche nelle cellule trattate con RV. L'inibizione dell'autofagia previene la positività alla TUNEL, come dimostrato in Fig.6D.

Queste osservazioni suggeriscono che l'autofagia e l'apoptosi non sono indipendenti, ma che sono strettamente correlate e che l'azione delle caspasi è downstream l'innescò autofagico. In precedenza abbiamo dimostrato che il RV induce la rilocalizzazione citosolica della catepsina D, che induce la morte cellulare caspasi-dipendente mediante il pathway intrinseco mitocondriale dipendente da Bax (Trincheri N. et al., 2006). Dai dati ottenuti possiamo proporre un modello di citotossicità indotto dal RV, dove l'autofagia, inizialmente rappresenta una risposta con funzione pro-survival, e che se in seguito viene iper-stimolata permette una rielocazione delle catepsine pro-apoptotiche.

Questi risultati indicano che l'inattivazioni genetiche ed epigenetiche delle proteine coinvolte nella regolazione ed esecuzione autofagica conferiscono alle cellule di colon carcinoma una resistenza alla citotossicità mediata da RV.

BIBLIOGRAFIA

- Arico S, Petiot A, Bauvy C et al. *J.Biol.Chem.* 38:35243-35246, 2001
- Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A, *J.Biol.Chem.* 278:31401-11
- Bursh W. *Cell Death Differ.*, 8: 569-581, 2001
- 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
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudion B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. *Cancer Cell*, 10:51-64, 2006
- 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
- Di Cristofano A, Pandolfi PP. *Cell* 100:387-390, 2000
- Dunn WA Jr. *J. Cell Biol.* 110:1923-1933, 1990
- Eskelinen EL. *Mol. Aspects Med.*, 27: 495-502, 2004
- 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
- Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. *J. Cell Biol.*, 2: 330-335, 2001
- 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
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. *Nature*, 402:672-676, 1999
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. *Nat. Cell Biol.*, 8: 688-699, 2005
- Lee EJ, Min HY, Joo Park H, Chung HJ, Kim S, Nam Han Y, Lee SK, *Life Sci.* 75(23):2829-2839, 2004
- Levine B, Yuan J. *J. Clin. Invest.*, 116: 2679-2688, 2005
- Monney L, Oliver R, Otter I, Jansen B, Poirier GG, Borner C, *E.J.B.* 251:295-303, 1998
- Munafò DB, Colombo MI. *J. Cell Sci.*, 114: 3619-3629, 2001

Nair U, Klionsky DJ. *Autophagy*, 51: 41785-788, 2005

Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. *Cell Struct Funct* 1: 29-37, 2002

Opipari AW Jr, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR, *Cancer Res.* 64:696-703, 2003

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

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

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

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

Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. *Carcin.* 28: 922-931, 2006

ATTIVITA' FORMATIVA

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

Corso di Inglese
Corso di Statistica

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

Partecipazione al XLVI Congresso Nazionale SIC tenuto a Pisa dal 24 al 27 Ottobre 2004
Partecipazione a Prot 2006 tenuto a Novara dal 1 al 3 Giugno 2006.
Prossima partecipazione al IPS2007-Patrasso Grecia dal 20 al 24 Ottobre (Congresso Internazionale)

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

Presentate personalmente

2004

-**TRINCHERI NICOL**, NICOTRA GIUSEPPINA, MIRABELLI MARZIA, CARLO FOLLO, ROBERTA CASTINO AND CIRO ISIDORO.

Resveratrol induces growth arrest and cell in human colorectal cancer cells by Modulating autophagocytosis.

XLVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Pisa, 24-27 Ottobre 2004, Tumori, 4 (2), 2005, p.89

Poster

2004

-MIRABELLI MARZIA, **TRINCHERI NICOL**, NICOTRA GIUSEPPINA, MANFROI FEDERICA, CASTINO ROBERTA, VALENTE GUIDO AND ISIDORO CIRO.

Expression of lysosomal cathepsin D and of FLIP in human lymphomas: relationship with tumour progression.

XLVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Pisa, 24-27 Ottobre 2004, Tumori, 4 (2), 2005, p.89

2005

-**TRINCHERI N.**, NICOTRA G., PERACCHIO C., FOLLO C., BELLIO N., CASTINO R. and ISIDORO C. Resveratrol kills colon rectal cancer cells by activating both caspase-dependent and cathepsin-dependent death pathways. 4th General meeting of the international Proteolysis Society. Quebec City, Canada, October 15th -19th 2005. Abstract book p.141.

-**TRINCHERI NICOL**, NICOTRA GIUSEPPINA, PERACCHIO CLAUDIA, FOLLO CARLO, BELLIO NATASCIA, CASTINO ROBERTA AND ISIDORO CIRO.

Resveratrol kills colon cancer cells by activating both caspase-dependent and cathepsin-dependent death pathways.

4TH General meeting of the International Proteolysis Society. Quebec City, Canada, October 15TH-19TH,2005. Abstract book p.141.

2006

- CASTINO R., BELLIO N., NICOTRA G., **TRINCHERI N.**, FOLLO C., PERACCHIO C., and ISIDORO C. Regolazione della proteolisi lisosomica nello stress da perossido di idrogeno in cellule di neuroblastoma. XVIII Congresso Nazionale SIP 2006 Società Italiana di Patologia , Pavia 19-22 Settembre (Pag 72).

-PERACCHIO C., CASTINO R., NICOTRA G., **TRINCHERI N.**, FOLLO C., BELLIO N. and ISIDOR C. Ruolo della cathepsina D e degli oncosoppressori PTEN e Beclin nella risposta citotossica ai farmaci antitumorali. . XVIII Congresso Nazionale SIP 2006 Società Italiana di Patologia , Pavia 19-22 Settembre (Pag 131) .

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

Rita Carini, **Nicol Francesca Trincheri**, Elisa Alchera, Maria Grazia De Cesaris, Roberta Castino, Roberta Splendore, Emanuele Albano, Ciro Isidoro. PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2006 May 15;40:1738-48.

N. Trincheri, G. Nicotra, C. Follo, R. Castino, C. Isidoro. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. *Carcinogenesis.* 2007 May;28:922-31. Epub 2006 Nov 20.

C. Follo, R. Castino, G. Nicotra, **N.F. Trincheri**, C. Isidoro. Folding, activity and targeting of mutated human cathepsin D that cannot be processed into the double -chain form. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:638-49. Epub 2006 Nov 25.

R. Castino, N. Bellio, G. Nicotra, **N.F. Trincheri**, C. Isidoro. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2007 May 1;42:1305-16. Epub 2007 Jan 8.

Trincheri N.F., Follo C., Nicotra G., Peracchio C., Castino R., Isidoro C. Resveratrol-induced apoptosis depends on the lipid kinase activity of Vps34 and on the formation of autophagolysosomes. *Carcinogenesis*, In revision (2007).

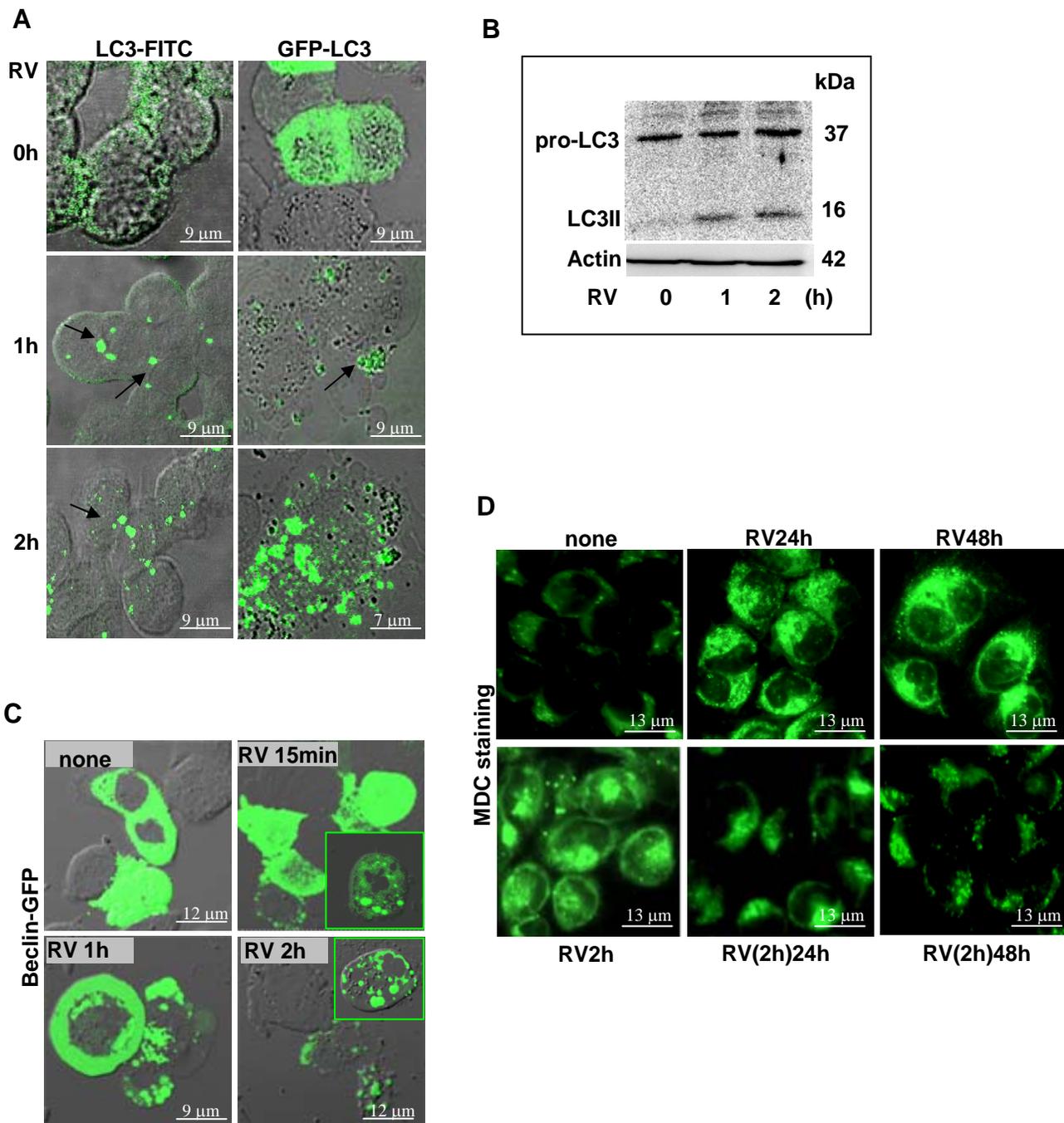


Fig.1: Il Resveratrolo induce una rapida risposta autofagica nelle DLD1. **A)** Immufluorescenza con LC3-Fitc e cellule trasfettate con la chimera GFP-LC3. Durante il trattamento con RV si osserva una rapida delocalizzazione della proteina LC3. **B)** immunoblotting per valutare l'espressione della proteina LC3 II. **C)** cellule trasfettate con la chimera Beclin-GFP e trattate con RV. **D)** Valutazione dell'attivazione dell'autofagia mediante valutazione dei vacuoli MDC-positivi.

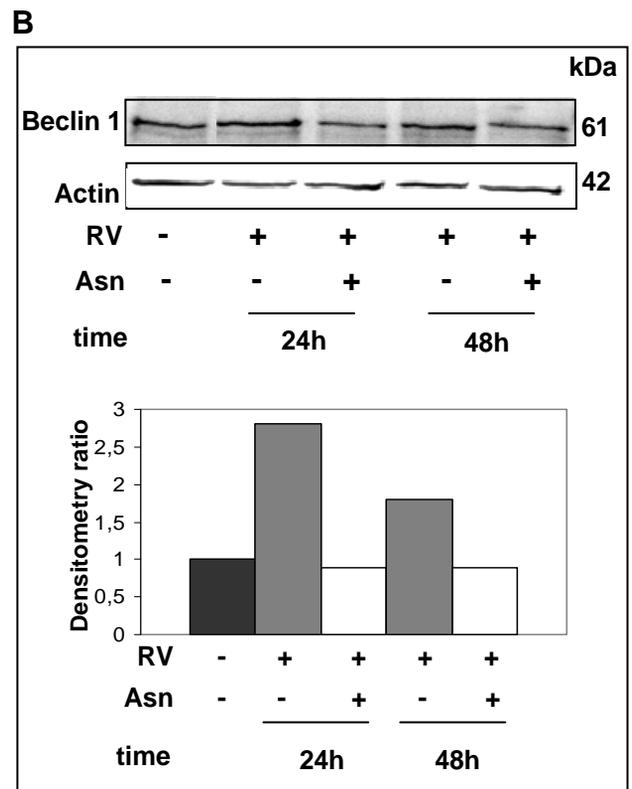
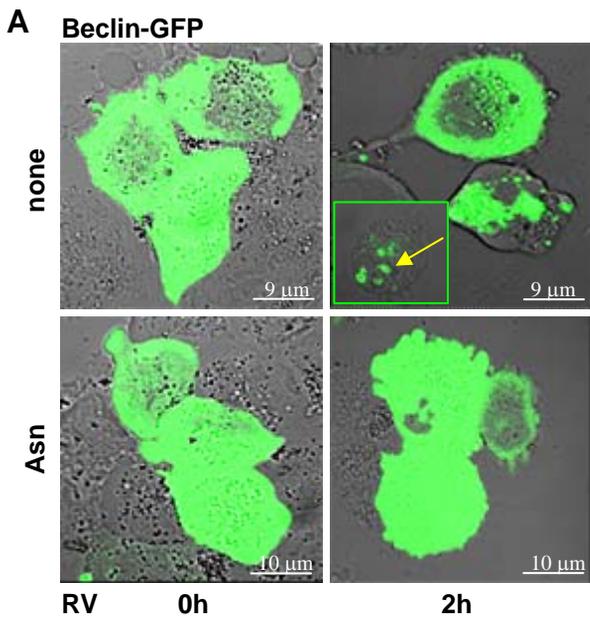


Fig.2: L'Asparagina previene l'induzione dell'autofagia beclin-dipendente. A) Cellule trasfettate con la chimera Beclin-GFP sono state esposte al RV in presenza ed assenza dell'Asn. B) Immunoblotting per la valutazione dell'espressione di Beclin-1 dopo trattamento con RV ed in presenza o assenza dell'Asn.

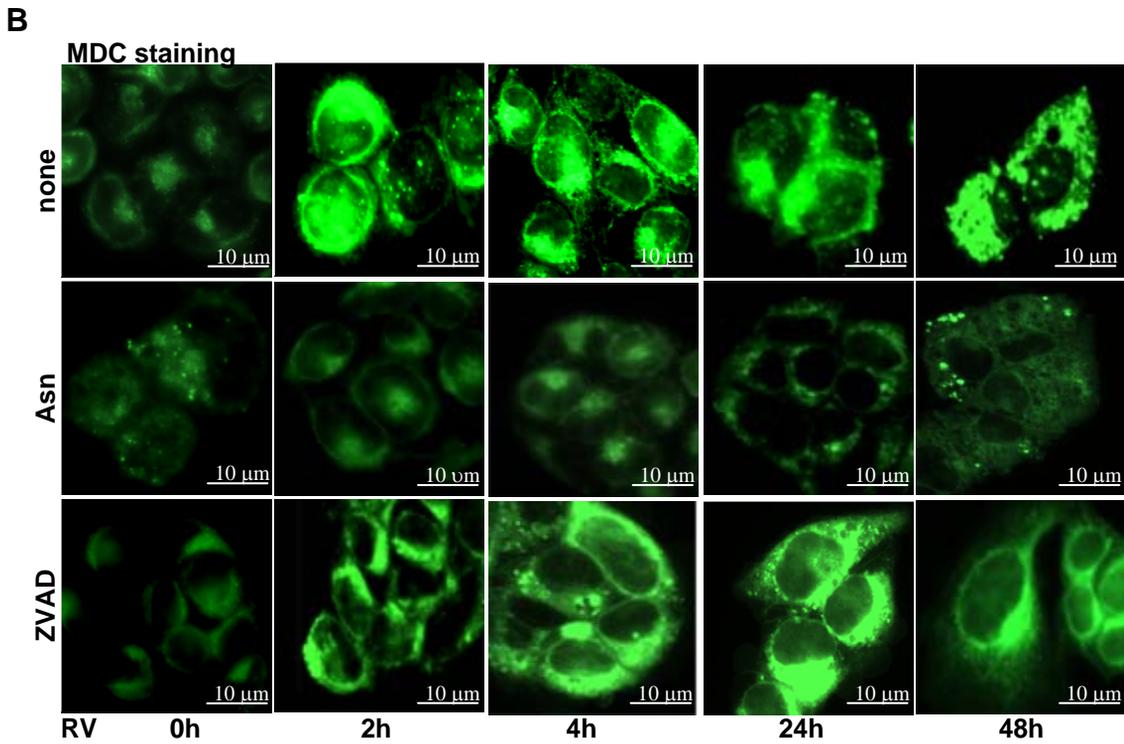
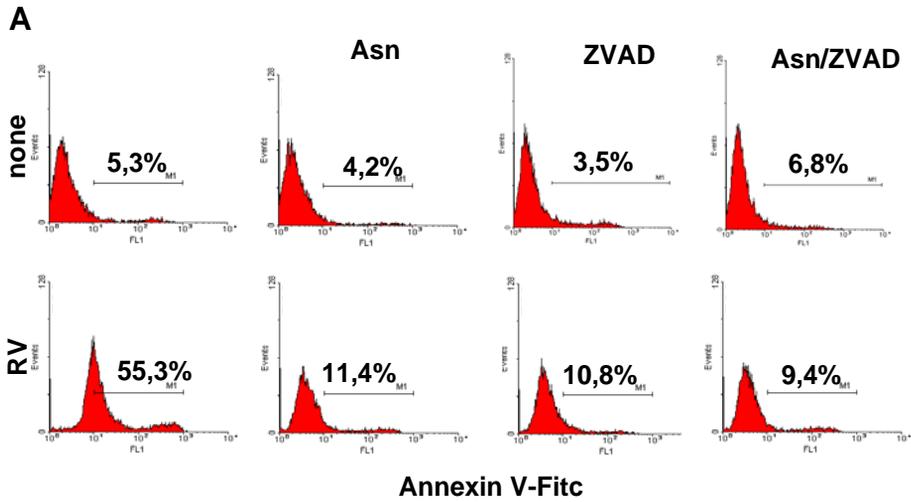


Fig.3: L'Asparagina previene l'effetto citotossico del Resveratrolo. A) Analisi citofluorimetriche delle cellule Annessina V-FITC Dopo il trattamento con RV, in presenza o assenza di ZVAD-fmk, inibitore delle caspasi e Asn, inibitore autofagico. B) Valutazione della formazione di vacuoli autofagici mediante MDC.

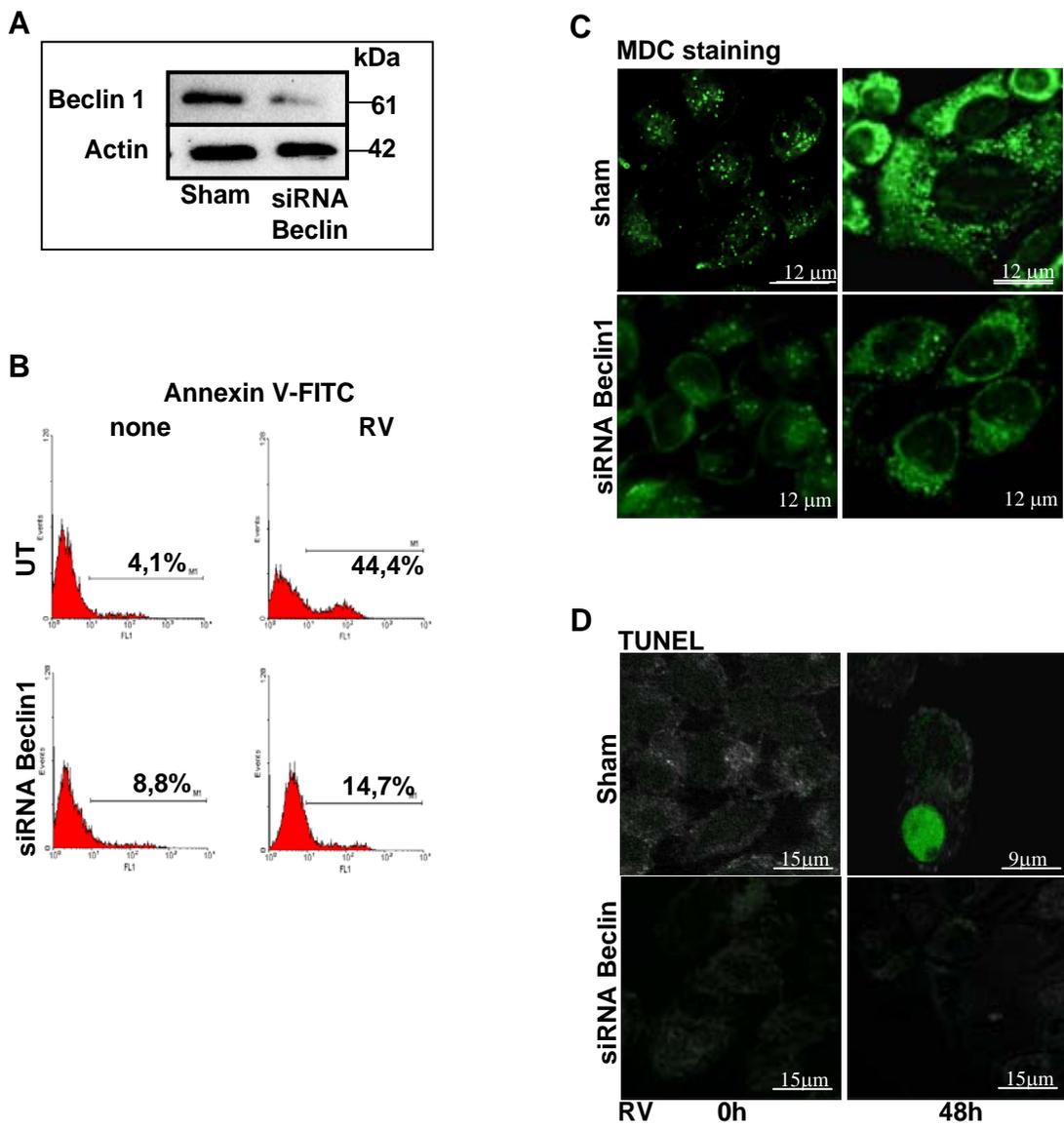


Fig.4: Il silenziamento di Beclin-1 previene la morte apoptotica indotta dal RV. A) Immunoblotting della proteina Beclin-1 dopo silenziamento genico. B) Analisi citofluorimetrica dopo il silenziamento genico di becli-1 e trattamento con RV. C) Valutazione della risposta autofagica con MDC. D) Valutazione della morte apoptotica con la tecnica TUNEL.

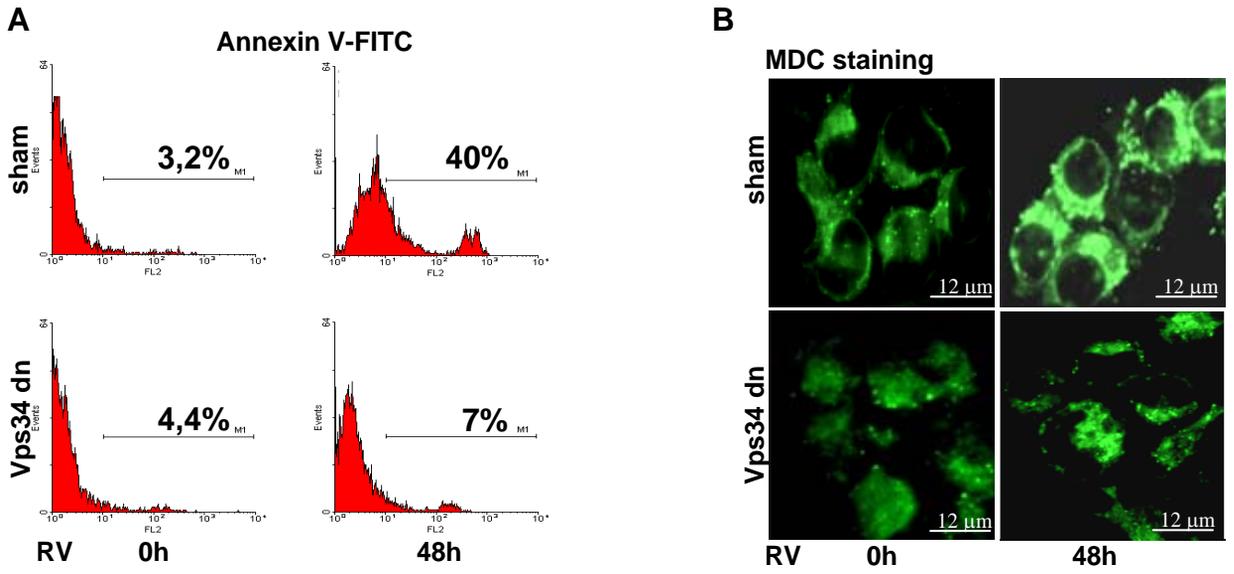


Fig.5: L'espressione ectopica della PI3K III dominant negative protegge le DLD1 dalla citotossicità indotta dal RV. A) Analisi citofluorimetrica delle cellule dopo trasfezione ed incubazione con RV. B) Valutazione della risposta autofagica al RV mediante MDC.

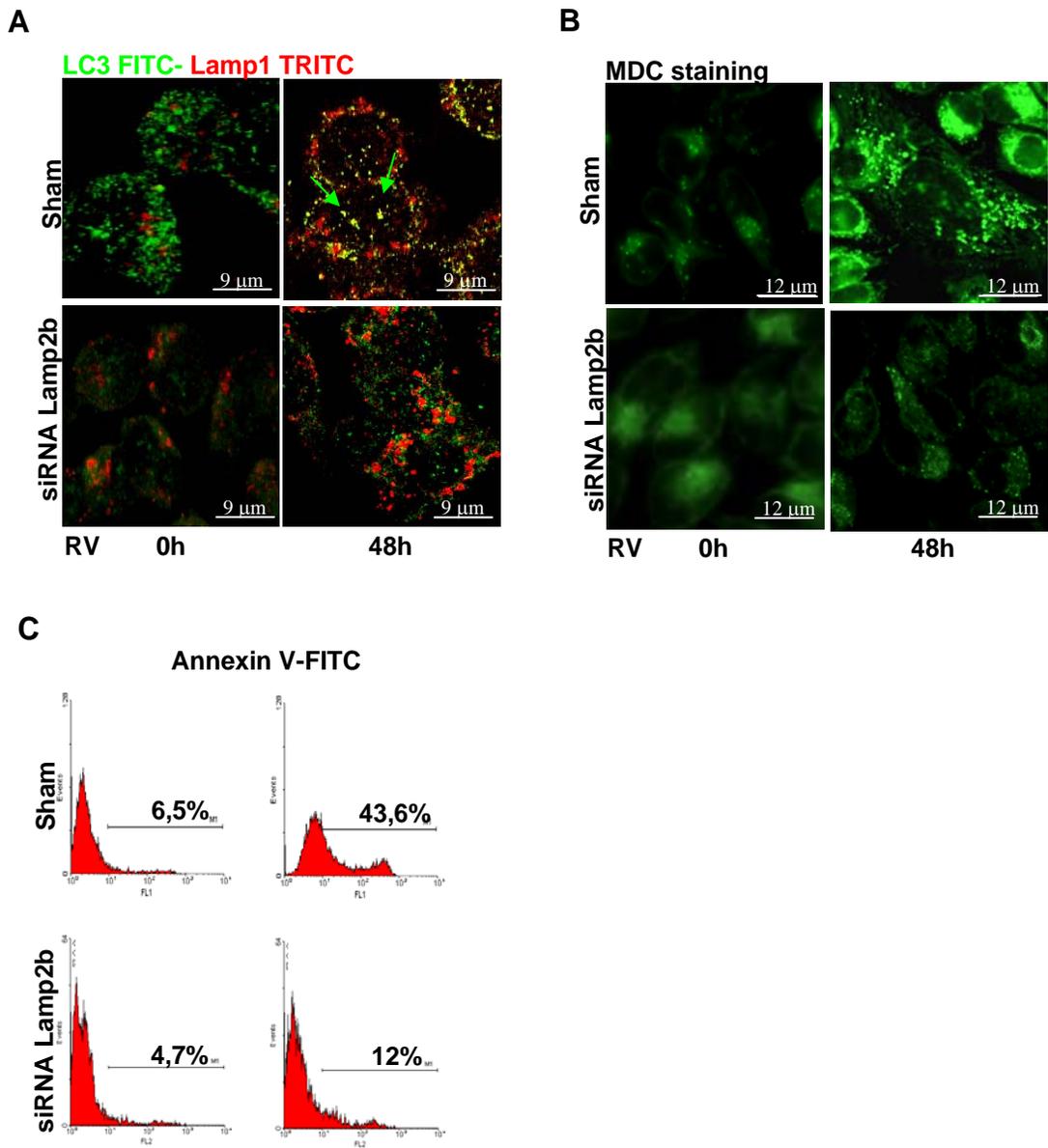


Fig.6: Il Knock-down di Lamp2b previene la formazione degli autofagolisosomi e la morte cellulare indotta dal RV. A) Immunofluorescenza di LC3-FITC e di Lamp1-TRITC. B) Valutazione dell'induzione autofagica mediante MDC. C) Analisi citofluorimetrica della morte Annessina V-positiva delle cellule silenziate con siRNA Lamp2b ed in seguito trattate con RV.