

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XX*

Relazione 4° anno

TITOLO:

**Il recettore CI-MPR e' coinvolto nella risposta
autofagica**

Candidato: Nicol Francesca Trincheri

Tutor: Ciro Isidoro

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

La morte autofagica (o morte cellulare programmata di tipo II) e' un fenomeno filogeneticamente molto antico che potrebbe essersi sviluppato prima dell'apoptosi. Nei vertebrati la morte autofagica sembra importante durante la morfogenesi di alcuni organi (formazione della cavit  intestinale, regressione delle ghiandole sessuali, etc.) (Beaulaton and Lockshin 1982; Schweichel and Marker 1973).

Le osservazioni morfologiche confermano la teoria secondo la quale la morte autofagica avrebbe caratteristiche diverse rispetto a quelle dell'apoptosi. Nelle cellule eucariote l'autofagia rappresenta il meccanismo degradativo principalmente coinvolto nel recupero di subunit  molecolari e nel turnover dei vari costituenti cellulari, incluse le membrane e gli organuli, ed   il solo meccanismo per mezzo del quale interi organuli come mitocondri e perossisomi vengono riciclati.

Il numero dei mitocondri diminuisce ma quelli presenti rimangono intatti e mantengono livelli di ATP necessari per completare il processo di autodigestione. La maggior parte del citoplasma viene degradato attraverso il processo autofagico prima che il nucleo incominci a collassare. Attraverso il sistema autofagico vengono rimossi organelli e membrane danneggiate con lo scopo di mantenere l'omeostasi cellulare. Questo processo potenzialmente ha un effetto di "salvaguardia" della cellula analogo all'apoptosi indotta da p53 in seguito ad un danno al DNA (Castino et al; 2003). In analogia con la definizione di p53 "guardiano del genoma", l'autofagia e' stata definita "guardiano del proteoma". L'apoptosi e la morte autofagica possono agire piu' o meno contemporaneamente, o essere la conseguenza di una e dell'altra , all'interno di uno stesso tessuto.

Inizialmente l'autofagia era stata descritta come la risposta della cellula alla privazione di siero e fattori trofici (affamamento). Una delle principali funzioni dell'autofagia e' infatti il recupero di substrati (aminoacidi, zuccheri, lipidi) dalla degradazione macromolecolare necessaria per la sopravvivenza della cellula quando i nutrienti scarseggiano.

A seconda del modo in cui il substrato viene trasportato nel lume lisosomiale, nelle cellule di mammifero sono state descritte tre principali forme di autofagia (Seglen and Bohely 1992; Kim and Klionsky 2000; Cuervo and Dice 2000):

-MACROAUTOFAGIA

-MICROAUTOFAGIA

-AUTOFAGIA MEDIATA DA CHAPERONE (CMA)

I substrati internalizzati possono essere di diversa natura: organuli citosolici e/o singole proteine.

Nella microautofagia il lisosoma ingloba direttamente le regioni citoplasmatiche da degradare attraverso un complesso sistema di invaginazioni ed evaginazioni tubuliformi della propria membrana.

La microautofagia partecipa al continuo turnover fisiologico dei costituenti cellulari (Ahlberg and Glaumann 1985) ed è responsabile della rimozione selettiva degli organelli in eccesso (Farre and Subramani 2004).

A differenza della macroautofagia, non si conoscono ancora i meccanismi molecolari che regolano questo tipo di autofagia.

Nell'autofagia mediata da chaperonine (CMA), proteine-bersaglio citosoliche recanti una specifica sequenza pentapeptidica (Dice 1990) vengono riconosciute e legate da una "chaperonina" citosolica, che le trasporta sulla membrana dei lisosomi (Massey et al. 2006).

Qui esse vengono riconosciute e legate da specifici recettori e, con l'intervento di altre "chaperonine", localizzate all'interno del compartimento lisosomiale, le proteine-bersaglio vengono traslocate attraverso la membrana e passano nel lume del lisosoma, dove vengono degradate (Kiffin 2004).

Ogni singola tappa di questo processo è caratterizzata da interazioni molecolari specifiche e per questo motivo la CMA viene considerata la forma di autofagia più selettiva.

La macroautofagia è un processo dinamico finemente regolato in cui le membrane cellulari subiscono un drammatico cambiamento morfologico. Regola l'equilibrio tra la formazione e degradazione di proteine e organelli garantendo la normale crescita e lo sviluppo cellulare. Permette il turnover di costituenti cellulari durante lo sviluppo ed in particolari condizioni di stress cellulare, come per esempio in situazioni di affamamento, quando la cellula scarseggia di nutrienti e di fattori di crescita. Le

proteine citosoliche vengono degradate principalmente attraverso due vie: una lisosomica e una non lisosomica.

La via non lisosomica prevede prevalentemente la degradazione selettiva di proteine cellulari in condizioni metaboliche basali. Avviene mediante il coinvolgimento dell'ubiquitina e la degradazione idrolitica attraverso il proteasoma.

Il processo che, invece, coinvolge i lisosomi porta alla degradazione di proteine extracellulari (introdotte per pinocitosi o endocitosi) e la degradazione all'interno di vescicole di proteine intracellulari e organelli, in condizioni di stress (macroautofagia o semplicemente autofagia).

Macroautofagia

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 on 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 sistema vacuolare acido risulta essenziale per la corretta funzione di tale morte cellulare. Tale sistema comprende, oltre ai lisosomi, anche gli endosomi precoci ed endosomi tardivi. Oltre che per il loro contenuto, gli endosomi precoci, tardivi ed i lisosomi possono essere discriminati grazie alla presenza od assenza di proteine integrali od associate alla membrana, come per esempio EEA1, Lamp1, Lamp2 MPR300, MPR46 e membri della famiglia di rab (Dunster et al. 2002; Griffiths et al 1998; Tikkanen et al. 2000; Meresse et al.1995; Pfeffer 2001; Novick and Zerial 1997). Questi compartimenti acidi si formano per gemmazione dall'apparato di Golgi che provvede anche al processamento degli enzimi litici prodotti dal reticolo endoplasmatico.

Questi enzimi, sintetizzati nel reticolo endoplasmatico (ER) vengono diretti nei lisosomi tramite fosforilazione a livello del versante *cis* del Golgi ad opera di una fosfotransferasi che forma un residuo di mannosio-6-fosfato e riconosciuti dai due recettori CD-MPR a CI-MPR. Gli enzimi marcati con questo motivo vengono diretti specificamente verso i pre-lisosomi (così definiti in quanto il pH non è sufficientemente acido) tramite vescicole endosomali dotate di pH più basso. Quindi, mano a mano che nuove vescicole apportanti nuovi enzimi si fondono al pre-lisosoma, il suo pH si abbassa attivando infine gli enzimi litici e trasformandosi in un vero e proprio lisosoma.

Quando la vescicola rilascia il contenuto nei lisosomi il recettore viene recuperato e riportato al TGN (tramite una struttura specifica "retromero") per ripetere il processo.

La N-glicosilazione e la formazione del Mannosio-6-fosfato

Gli oligosaccaridi che formano legami N-glicosidici contengono sempre mannosio, GlcNac, e di solito sono molto ramificati. Nel Reticolo Endoplasmatico ruvido viene aggiunto un grosso precursore oligosaccaridico ad un residuo di Asn su un polipeptide nascente ad opera di una transferasi che riconosce in modo specifico i motivi consenso Asn-X-Ser e Asn-X-Thr (dove X può essere un amminoacido qualsiasi tranne la prolina). Il precursore oligosaccaridico (contenente tre residui di glucosio, nove di mannosio e due di GlcNac) è legato, tramite un residuo di pirofosfato, al dolicolo, un lipide ancorato alla membrana del reticolo endoplasmatico che agisce da trasportatore dell'oligosaccaride. In uno step successivo, i tre residui di glucosio ed uno di mannosio vengono rimossi da tre enzimi diversi e la proteina ora può essere trasportata al Golgi; infatti nel reticolo endoplasmatico è presente una glucosiltransferasi che raggiunge un residuo di glucosio a glicoproteine non ripiegate o mal ripiegate. Proteine con funzione chaperone (es., Bip, calnexina e calreticulina) trattengono le glicoproteine nel reticolo endoplasmatico fino a quando esse non hanno raggiunto la corretta struttura 3D. A questo processo partecipa anche la protein-disulfato isomerasi che modifica continuamente i rapporti di legame disolfuro tra le cisteine fino a quando non si è raggiunta la stabilizzazione della struttura.

Successivamente le glicoproteine dotate di una o più catene Man₈ (Glc-Nac)₂ entrano nel complesso del Golgi, dove subiscono nuove trasformazioni grazie agli enzimi localizzati nelle cisterne golgiane, aggiungendo o rimuovendo specifici residui per formare un tipico complesso oligosaccaridico.

Nel caso dei pro-enzimi lisosomici, la presenza dell'oligosaccaride nel contesto di una specifica sequenza amminoacidica viene riconosciuta dagli enzimi che operano la fosforilazione dei mannosio per formare il M6P. Questo avviene in due tappe distinte:

- 1- nelle cisterne prossimali del Golgi opera una transferasi che trasferisce sui mannosio più esterni un gruppo di P-GlcNac (fosfo-N-acetil-glucosammina, donato da UDP-GlcNac) con formazione del cosiddetto M6P "coperto";
- 2- nelle cisterne distali del Golgi una fosfodiesterasi idrolizza il legame con il GlcNac e rende "scoperto" il M6P.

Il trasporto M6P-dipendente e indipendente

Il trasporto delle idrolasi lisosomiche dal sito di sintesi (il reticolo endoplasmatico) al sito di destinazione (endosomi precoci, tardivi e lisosomi) può avvenire secondo due modalità:

- mediante recettori specifici per il M6P
- mediante la “via alternativa”, ovvero indipendente dal M6P.

Le due vie possono essere agevolmente discriminate alcalinizzando (ad esempio con le basi deboli). I compartimenti prelisosomici in cui il recettore per il M6P dissocia il proprio ligando (Gonzalez-Noriega et al. 1982; Maxfield 1982). In alternativa, viene inibita (von Figura and Hasilik 1986).

Nelle cellule eucariotiche esistono due recettori distinti capaci di legare il M6P presente sui proenzimi lisosomici (Dahms et al 1989; Kornfeld 1992; Ludwig et al 1995). Si tratta di glicoproteine integrali di membrana di tipo I (il carbossi terminale è rivolto verso il citoplasma), con caratteristiche strutturali simili, l'una di 300 kDa e l'altra di 46kDa, e perciò denominate MPR300 (CI-MPR) e MPR46 (CD-MPR) rispettivamente.

Il primo recettore (MPR300) è in grado di legare il M6P indipendentemente dalla presenza di cationi divalenti e lega, il fattore di crescita insulino di tipo II (IGFII) (Kornfeld 1992; Ludwig et al 1995). Il secondo recettore (MPR46) lega efficacemente il M6P solo in presenza di cationi divalenti (es. Mg^{3+}) (Hoflack and Kornfeld 1985). I recettori per il M6P sono distribuiti tra alcuni compartimenti cellulari della via secretoria ed endocitica, ovvero il Trans-Golgi Network (TGN), gli endosomi e la plasmamembrana, ma non nei lisosomi. A livello del TGN essi legano selettivamente i proenzimi lisosomici, smistandoli dalla via secretoria (sorting) e li trasportano agli endosomi (Kornfeld and Mellman 1989). Tuttavia il monomero di MPR300 può legare con maggiore efficienza un oligosaccaride con due residui di M6P oppure due oligosaccaridi monovalenti, mentre l'MPR46 in forma monomericale lega esclusivamente oligosaccaridi monovalenti e può legare quelli bivalenti solo quando si trovano nella forma dimerica (Kornfeld 1992). Ciò spiega la diversa efficienza dei due recettori nel traffico degli enzimi lisosomici che espongono quantità variabili di gruppi M6P (Munier-Lehmann et al. 1996). I due recettori competono a livello del TGN per il legame degli enzimi lisosomici, ma l'MPR300 trasporterebbe i ligandi negli endosomi tardivi, dove essi vengono rilasciati e successivamente da qui

trasferiti ai lisosomi; mentre l'MPR46 trasporterebbe i ligandi agli endosomi precoci o alla plasmamembrana.

Alcune idrolasi lisosomiche vengono secrete soprattutto dalle cellule deficienti per l'uno o per l'altro recettore alter, tra cui la Catapsina D, vengono secrete soprattutto dalle cellule deficienti di MPR300 (Ludwig et al 1994). Inoltre, l'iperespressione mediante trasfezione di cDNA specifico di un solo tipo di recettore nelle cellule deficitarie di entrambi non è sufficiente a compensare l'assenza dell'altro, con ciò dimostrando che i due recettori cooperano e si completano per assicurare la segregazione delle idrolasi presenti nei lisosomi (Munier-Lehmann et al.1996).

Il trasporto dei proenzimi lisosomici ai lisosomi indipendente dal recettore M6P può avvenire in vario modo.

Il primo meccanismo descritto è quello della ricattura per endocitosi mediata da recettori per il mannosio e la successiva traslocazione nei lisosomi del proenzima secreto.

Un altro meccanismo di trasporto prevede l'interazione transiente del proenzima lisosomico con un'altra proteina associata alle membrane destinate ai lisosomi.

PACS-1, GGA-3 e CK2 formano un complesso multimerico coinvolto nella regolazione del traffico degli enzimi destinati ai compartimenti acidi, tramite i recettori CD-MPR e CI-MPR. Questo avviene tramite la formazione di vescicole che trasportano materiale attraverso il sistema delle endomembrane, circondata da un rivestimento proteico.

Studi recenti hanno identificato diversi tipi distinti di vescicole rivestite:

-vescicole rivestite da COPII (cop è una sigla che indica le proteine del rivestimento dall'inglese coat proteins) che mediano la prima tappa del percorso biosintetico, spostando i materiali in avanti dal reticolo endoplasmatico al complesso di Golgi. Il rivestimento da COPII contiene 5 subunità proteiche che selezionano e concentrano determinati componenti c

-Vescicole rivestite da COPI che spostano il materiale in un senso retrogrado dal Golgi al reticolo endoplasmatico. Questo processo è necessario perché vengono riportate indietro tutte le subunità proteiche che erroneamente sono state incluse nel trasporto e i recettori coinvolti in tale traffico.

-vescicole rivestite da clatrina che smistano gli enzimi idrolitici e proteine di membrana che si accumulano nel TGN agli endosomi e lisosomi

L'autofagia viene indotta da una grande varietà di stimoli intra- ed extra-cellulari quali starvation (affamamento), infezioni virali, aggregati proteici e come sopra descritto da organelli cellulari danneggiati o da sostanze chimiche.

Il Resveratrolo

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 $200\mu\text{M}$ 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 $10\text{-}100\mu\text{M}$ di resveratrolo attivano le caspasi e conducono le cellule SW480 di carcinoma coloretale all'apoptosi. L'attivazione delle caspasi è associata con l'accumulo 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 $50\mu\text{M}$, può indurre un arresto cellulare in fase S; invece, se utilizzato ad una concentrazione di $100\mu\text{M}$ 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 quarto anno di dottorato (trascorso all'estero nel laboratorio di Sharon Tooze, Cancer research, Londra) è analizzare il meccanismo molecolare d'azione del RV rispetto all'azione del terreno d'affamamento EBSS nell'induzione autofagica. Dai dati ottenuti abbiamo dimostrato e analizzato le caratteristiche morfologiche indotte dal RV e da EBSS. Dopo aver messo a punto le condizioni sperimentali sono stati fatti esperimenti per valutare i meccanismi coinvolti nei due trattamenti e le proteine coinvolte durante l'attivazione dell'autofagia. Dai primi dati ottenuti nel corso del 4° anno abbiamo visto che in tempi precoci di trattamento con RV viene attivato il processo autofagico come con EBSS, valutato mediante la formazione di vacuoli LC3-GFP positivi in cellule stabili per tale proteina (2GL9). Inoltre sono state effettuate immunofluorescenze per analizzare il movimento del recettore CI-MPR nei due diversi trattamenti e il coinvolgimento di esso nella risposta autofagica dopo silenziamento.

MODELLO SPERIMENTALE- Negli esperimenti sono state utilizzate le cellule che esprimono stabilmente la chimera LC3-GFP (2GL9) (Chan et al.) che derivano dalle HEK293, cellule epiteliali umane di Rene.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule epiteliali umane HEK293 e il clone stabile che esprime GFP-LC3, 2GL9.

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 streptomicina.

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 100 μ M e con EBSS (terreno d'affamamento) per 2h dopo aver lavato il monostrato cellulare con PBS.

Immunoblotting

I campioni (30-50 μ g di proteine totali) sono stati denaturati a 65C° 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 latte 5% . In seguito sono stati utilizzati gli anticorpi primari di interesse: anti-LC3, per verificare l'innesco del meccanismo autofagico, anti-CIMPR per valutare l'espressione della proteina dopo silenziamento.

Al termine dell'incubazione la nitrocellulosa è sottoposta ad una serie di lavaggi in PBS/tween 0,1% e incubata per 1h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario diluito in una soluzione di latte 5%.

Immunofluorescenza

Le cellule piastrate su vetrini sterili vengono fissate in metanolo 95% freddo per 20min, permeabilizzate per 10minuti con PFA 3% e incubate per 16h in camera umida con anticorpi primari anti-CIMPR (1:250), anti-Catepsina D (1:100), anti-EEA1 (1:100). Dopo un ciclo di lavaggi in PBS/Triton 0,1% le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario fluoresceinato (1:1000) e un anticorpo secondario coniugato con Texas Red (1:1000).

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

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 Oligofectamina.

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

RISULTATI

-L'induzione dell'autofagia con RV ed EBSS e' caratterizzata da una diversa distribuzione del recettore CI-MPR.

Le cellule 2GL9, stabili per l'espressione della chimera LC3-GFP sono state piastrate ad una densità di 40000cell/cm² e lasciate aderire almeno 24h prima del trattamento con Resveratrolo (RV) e con EBSS (terreno senza nutrienti).

Le cellule sono state incubate con RV e con EBSS per 2h, lavate con PBS e fissate con Paraformaldeide al 3% per Immunofluorescenza. In Fig.1A è mostrata l'immagine di immunofluorescenza. Sono stati utilizzati anticorpi per rilevare la posizione del recettore CI-MPR (in rosso) e il compartimento di Golgi (in blu). Le cellule dopo trattamento di 2h mostrano una diversa localizzazione sia del recettore che del compartimento Golgiano; come e' evidente dalla Fig.1A, le cellule dopo trattamento con RV 100µM mostrano una distribuzione golgiana frammentata e distribuzione del recettore CI-MPR in cluster. L'attivazione dell'autofagia e' dimostrata dalla distribuzione vacuolare della proteina LC3-GFP. Non si ha colocalizzazione del recettore CI-MPR con i vacuoli GFP positivi, ma la loro distribuzione e' molto simile. Inoltre, sempre in figura, si puo' notare che invece il trattamento con EBSS induce una risposta autofagica, ma la disposizione del recettore CI-MPR e del Golgi e' molto diversa dal trattamento con RV.

Dalla figura si puo' osservare il movimento del recettore dal compartimento golgiano agli endosomi (Munier-Lehmann et al. 1996) ed il Golgi non subisce alcuna frammentazione rispetto alle cellule non trattate.

Le cellule trattate con RV ed EBSS hanno una risposta autofagica gia' a 2h dal trattamento, ma presentano una diversa distribuzione del recettore CI-MPR e del TGN.

Da questo esperimento si puo' asserire che il trattamento con il RV induce una risposta autofagica come il trattamento con EBSS dovuta alla traslocazione della proteina LC3-GFP sulla membrana dei vacuoli GFP positivi; la diversa localizzazione recettoriale del MPR300 dimostra un diverso coinvolgimento del recettore stesso nei due trattamenti.

-I trattamenti RV ed EBSS inducono la formazione dell'autofagolisosoma

Le cellule 2GL9, stabili per l'espressione della chimera LC3-GFP sono state piastrate ad una densità di 40000cell/cm² e lasciate aderire almeno 24h prima del trattamento con Resveratrolo (RV) e con EBSS (terreno senza nutrienti).

In fig.2A e' riportata un'immagine di immunofluorescenza dove e' stata rilevata la posizione del recettore CI-MPR rispetto ai lisosomi (marcati con catepsina D, idrolasi presente nel lisosoma, in rosso) e agli endosomi marcati con EEA1 (in blu), proteina presente sulla membrana degli endosomi precoci, fig.2B.

Dopo il trattamento si ha la traslocazione della proteina LC3-GFP sui vacuoli autofagici e alcune parziali colocalizzazioni tra vacuoli GFP positivi con le vescicole catepsina D positive; questo afferma l'attivazione del processo autofagico e la conseguente fusione dell'autofagosoma (LC3-GFP vacuoli positivi) con il lisosoma per la formazione dell'autofagolisosoma, grande vescicola dotata di doppia membrana con in ruolo di idrolizzare il materiale contenuto nell'autofagosoma, grazie all'azione delle proteasi presenti gia' nel lisosoma (Surmacz et al. 1987) gia' a 2h dal trattamento.

In fig.2B si ha la colocalizzazione del vacuolo LC3-GFP positivo con la vescicola endosomica.

Da questi esperimenti si evince che i due trattamenti, RV ed EBSS, inducono l'attivazione autofagica e seguente fusione dell'autofagosoma con il lisosoma per la degradazione finale del materiale catturato.

-Il silenziamento del recettore CI-MPR previene la formazione dei vacuoli autofagici

In seguito ci siamo domandati se il recettore per M6P potesse essere coinvolto nella risposta autofagica dopo trattamento con RV ed EBSS. E' stato cosi' effettuato il silenziamento genico del recettore CI-MPR nelle cellule 2GL9 ed in seguito, a 48h della trasfezione e due hit di trasfezione, abbiamo trattato le cellule con RV ed EBSS per 2h. In esperimenti preliminari abbiamo messo a punto le condizioni ottimali di trasfezione del siRNA specifico per ottenere il massimo effetto di iporegolazione di CI-MPR, senza che ciò risultasse tossico per le cellule.

Sono state effettuate varie prove di silenziamento e come si può vedere in Fig.3A dopo due hit di trasfezione e 48h in terreno completo è stato ottenuto un silenziamento di circa il 70% (FIG.3A). L'immunoblotting, mostrato in Fig.3B, mostra la differenza di espressione della proteina tra le cellule "wild-type" (siC) e le cellule trasfettate con siRNA specifico. Dalla Fig.3C si evince un effetto protettivo dell'induzione autofagica indotta dal farmaco e dal terreno privo di nutrienti. Infatti come si può notare dove non vi è il recettore si ha una diminuzione della formazione di vacuoli LC3-GFP positivi (vedi frecce).

DISCUSSIONE

Nel corso dei miei quattro anni di dottorato è stato studiato il meccanismo autofagico in cellule di colon-carcinoma. 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). È stato importante chiarire il reale ruolo del processo autofagico nelle cellule in risposta al trattamento chemioterapico per definire le strategie farmacologiche. Queste osservazioni hanno suggerito che l'autofagia e l'apoptosi non sono indipendenti, ma sono strettamente correlate e 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-apoptiche.

In seguito è stato dimostrato che il Resveratrolo induceva una risposta autofagica mediante il complesso della PI3K- Beclin1 e la formazione di autofagolisosomi positivi per la catepsina D. 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 (Trincheri et al. 2008).

In questo ultimo anno di dottorato trascorso all'estero, invece, sono stati iniziati degli studi su un ipotetico coinvolgimento del recettore CI-MPR nella risposta autofagica. Sono state osservate, da studi preliminari, una diversa collocazione del recettore dopo trattamento con RV ed EBSS.

Ed inoltre il silenziamento di tale recettore sembra essere coinvolto nella formazione dei vacuoli LC3-positivi. Inoltre dalla letteratura è stato dimostrato un coinvolgimento della caseina-kinasi 2 (CK2) per la fosforilazione del recettore e il corretto trasporto dal TGN agli endosomi precoci per il trasporto delle idrolasi lisosomiche (Scott GK. et al. 2006). Saranno dunque effettuati nuovi esperimenti con l'utilizzo di inibitori specifici per tale kinasi TBB, DMAT (Pagano MA. et al. 2008) e verrà osservato il reale coinvolgimento del recettore CI-MPR nel pathway autofagico.

BIBLIOGRAFIA

Ahlberg J, Glaumann H. Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol.* 42:78-88, 1985.

Arico S, Petiot A, Bauvy C et al. *J.Biol.Chem.* 38:35243-35246, 2001.

Beaulaton J, Lockshin RA. The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol.* 79:215-35, 1982.

Castino R, Démoz M, Isidoro C. Destination 'lysosome': a target organelle for tumour cell killing? *J Mol Recognit.* 16:337-48, 2003.

Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem.* 282:25464-74, 2007.

Cuervo AM, Dice JF. When lysosomes get old. *Exp Gerontol.* 35:119-31, 2000.

Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem.* 264:12115-8, 1989.

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.

- Di Cristofano A, Pandolfi PP. *Cell* 100:387-390, 2000
- Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Dunn WA Jr. *J. Cell Biol.* 110:1923-1933, 1990.
- Dunster K, Toh BH, Sentry JW. Early endosomes, late endosomes, and lysosomes display distinct partitioning strategies of inheritance with similarities to Golgi-derived membranes. *Eur J Cell Biol.* 81:117-24, 2002.
- Eskelinen EL. *Mol. Aspects Med.*, 27: 495-502, 2004.
- Farre JC and Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol* 14:515-23, 2004.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. 52:329-41, 1988.
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 15:4829-40, 2004.
- 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.
- Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem.* 61:307-311, 1992.
- Lee EJ, Min HY, Joo Park H, Chung HJ, Kim S, Nam Han Y, Lee SK, *Life Sci.* 75(23):2829-2839, 2004.
- 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.
- Ludwig T, Munier-Lehmann H, Bauer U, Hollinshead M, Ovitt C, Lobel P, Hoflack B. Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J.* 13:3430-7, 1994.
- Maxfield FR. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol.* 95:676-81, 1982.
- Méresse S, Gorvel JP, Chavrier P. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci.* 108 :3349-58, 1995.
- Munier-Lehmann H, Mauxion F, Bauer U, Lobel P, Hoflack B. Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting.

- J Biol Chem. 271:15166-74, 1996.
- Munier-Lehmann H, Mauxion F, Bauer U, Lobel P, Hoflack B. Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. 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.
- Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* 9:496-504, 1997.
- Opiari AW Jr, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR, *Cancer Res.* 64:696-703, 2003.
- Pagano MA, Bain J, Kazimierczuk Z, Sarno S, Ruzzene M, Di Maria G, Elliot M, Orzeszko A, Cozza G, Meggio F, Pinna LA. The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2. An update. *Biochem J.* 2008. [Epub ahead of print]
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommart EF, Meijer AJ, Codogno P, *J. Biolog. Chem.* 275:992-998, 2000.
- Pfeffer SR. Constructing a Golgi complex. *J Cell Biol.* 10:873-5, 2001.
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7:253-66, 1973.
- Scott GK, Fei H, Thomas L, Medigeshi GR, Thomas G. A PACS-1, GGA3 and CK2 complex regulates CI-MPR trafficking. *EMBO J.* 25:4423-35, 2006.
- 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.
- Surmacz CA, Pösö AR, Mortimore GE. Regulation of lysosomal fusion during deprivation-induced autophagy in perfused rat liver. *Biochem J.* 242:453-8, 1987.
- Tikkanen R, Obermüller S, Denzer K, Pungitore R, Geuze HJ, von Figura K, Höning S. The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic.* 1:631-40, 2000.
- Trincheri NF, Nicotra G, Follo C, Castino R, Isidoro C. *Carcin.* 28: 922-931, 2006
- Trincheri NF, 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.* 29:381-9, 2008.

ATTIVITA'FORMATIVA
SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

Corso di Inglese
Corso di Statistica

SEMINARI

- | | |
|---------------------------------|--|
| October, 4 th 2007 | Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non-alcolica
Prof. F. Marra |
| January, 14 th 2008 | Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e
Sviluppo delle nuove tecniche
Dr Ten. G. Portera |
| January, 21 st 2008 | K+ channels in the heart: in and out of control
Dr S. Radicke |
| January, 23 rd 2008 | Integrin trafficking and tumour cell invasiveness
Dr Jim Norman |
| January, 24 th 2008 | Applicazioni biologiche della microscopia a forza atomica: dallo studio della
Morfologia allo studio delle interazioni
Prof. M. Raspanti |
| February, 06 th 2008 | Next generation sequencing –principi e applicazioni-
Prof. G. De Bellis |
| February, 21 st 2008 | New treatment strategies for multiple myeloma
Prof. A. Palombo |
| February, 05 th 2008 | Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human
monoconal
antibodies as tools to identify novel antigens for protective
vaccination
PhD A. Macagno |
| March, 13 rd 2008 | Histone-deacetylase 4: how cells modulate gene repression
Prof. C. Brancolini |
| April, 15 th 2008 | Metodiche per analisi di mutazioni e per analisi in espressione
genica tramite
Real Time PCR |

Roche Diagnostics

April, 16th 2008 The Herpesvirus DNA Polymerases: a model for new antiviral drug discovery
Prof. Palù

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.
- Partecipazione al IPS2007-Patrasso Grecia dal 20 al 24 Ottobre (Congresso Internazionale)
- Partecipazione al Symposium tenuto a Novara Giovedì 20 dicembre 2007 NANOTECHNOLOGY AND BIOIMAGING, novel approaches in diagnosis and drug delivery

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 ISIDORO 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) .

2007

-THE CATHESIN-CASPASE AXIS IN CHEMOTHERAPY CYTOTOXICITY.

Isidoro C., **Trincheri N.F.**, Peracchio C., Follo C., Nicotra G., Bellio N., Castino R. International Proteolysis Meeting in Patras (Greece) 20/27 October, 2007 p. 272

-ROLE OF LYSOSOMAL CATHEPSINS IN APOPTOTIC CELL DEATH INDUCED BY ETOPOSIDE AND PACLITAXEL IN CHEMOSENSITIVE AND CHEMORESISTANT OVARIAN CANCER CELLS.

Nicotra G., Peracchio C., Castino R., Salini A., **Trincheri N.F.**, Démoz M., Bellio N., Valente G., Isidoro C. International Proteolysis Meeting in Patras (Greece) 20/27 October, 2007 p. 280

-LYSOSOMAL CATHEPSIN D TRIGGERS RESVERATROL-INDUCED CELL DEATH IN COLORECTAL CANCER CELLS.

Trincheri N.F., Nicotra G., Follo C., Peracchio C., Bellio N., Castino R., Isidoro C. International Proteolysis Meeting in Patras (Greece) 20/27 October, 2007 p.281

-TARGETING AND MATURATION OF HUMAN PRO-CATHEPSIN D MUTATED IN THE PROCESSING REGION.

Follo C., Nicotra G., **Trincheri N.F.**, Peracchio C., Bellio N., Castino R., Isidoro C. International Proteolysis Meeting in Patras (Greece) 20/27 October, 2007 p.380

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 NF**, 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. 2008 Feb;29(2):381-9. Epub 2007 Nov 28

-CHEMOTHERAPY DRUG RESPONSE IN OVARIAN CANCER CELLS
STRICTLY DEPENDS ON A CATHEPSIN D – BAX ACTIVATION LOOP

Roberta Castino, Claudia Peracchio, Alessandra Salini, Giuseppina Nicotra, **Nicol F. Trincheri**, Marina Démoz, Guido Valente and Ciro Isidoro. Journal of Cellular and Molecular Medicine

-HIGH EXPRESSION OF CATHEPSIN D PREDICTS POOR PROGNOSIS IN
PATIENTS BEARING AGGRESSIVE NON HODGKIN'S LYMPHOMAS

Giuseppina Nicotra, Federica Manfroi, Francesca Mercalli, **Nicol F. Trincheri**, Roberta Castino, Simonetta Kerim, Guido Valente and Ciro Isidoro. 2008 in submission.

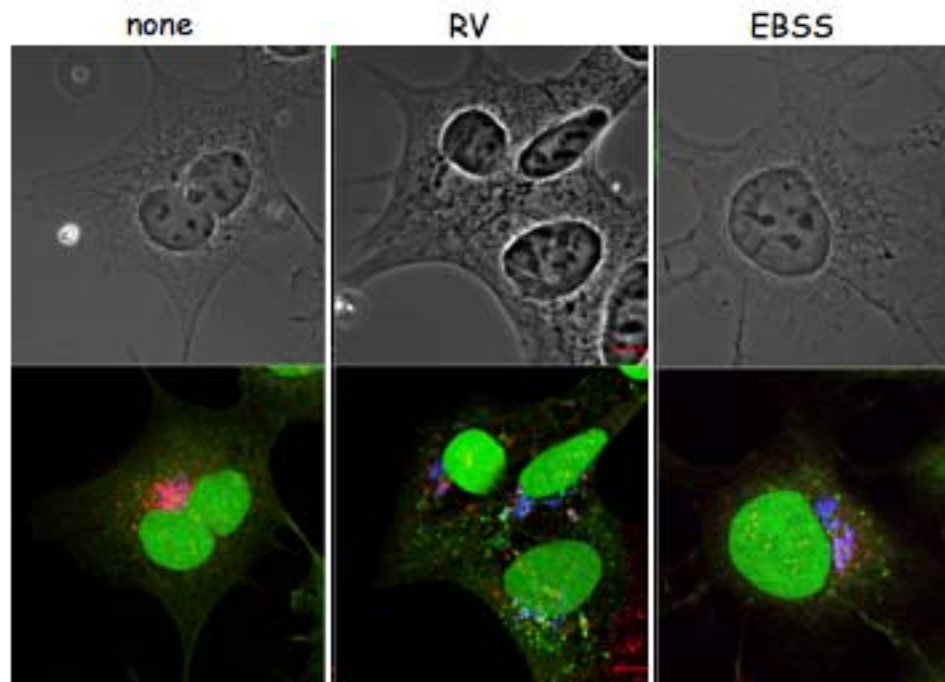


Fig.1 Immagine di immunofluorescenza. Le cellule 2GL9 (LC3-GFP stabili) sono marcate con anti-CIMPR(in rosso) e anti-TGN46(in blu) per il trans Golgi Network.

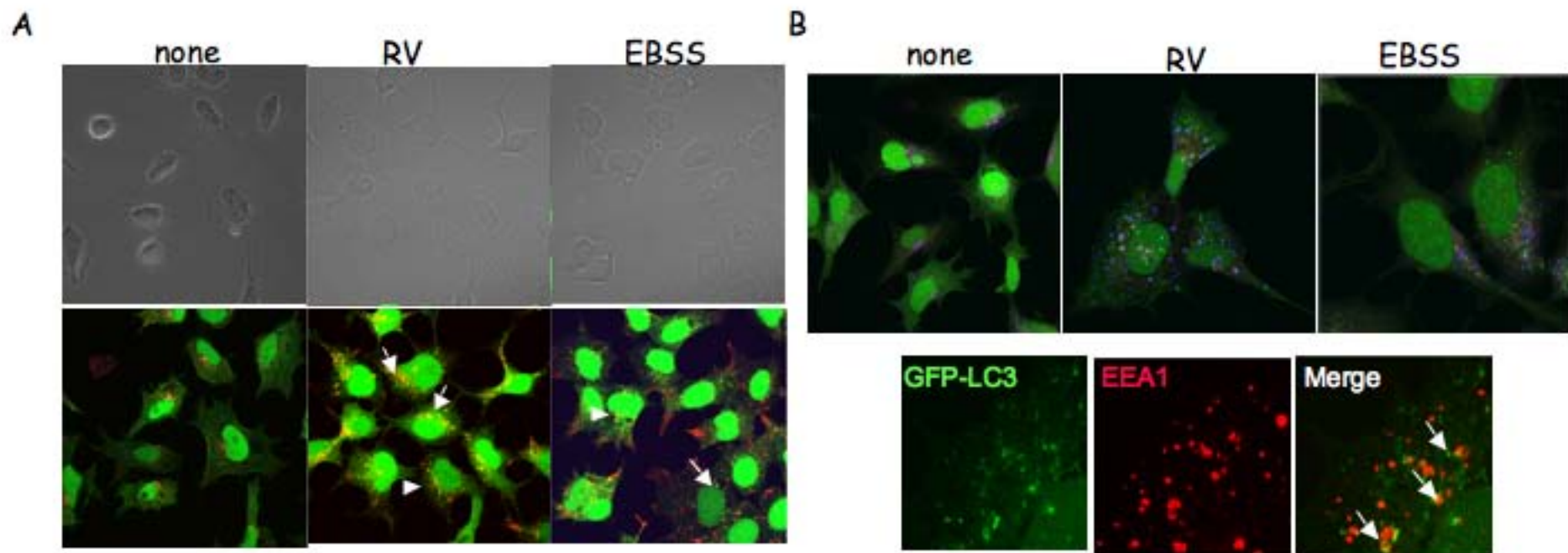


Fig.2 A: Immagine di immunofluorescenza. Le cellule 2GL9 (LC3-GFP stabili) sono marcate con anti-Catepsina D(in rosso).B: Immagine di immunofluorescenza. Le cellule 2GL9 (LC3-GFP stabili) sono marcate con anti-EEA1(in rosso).

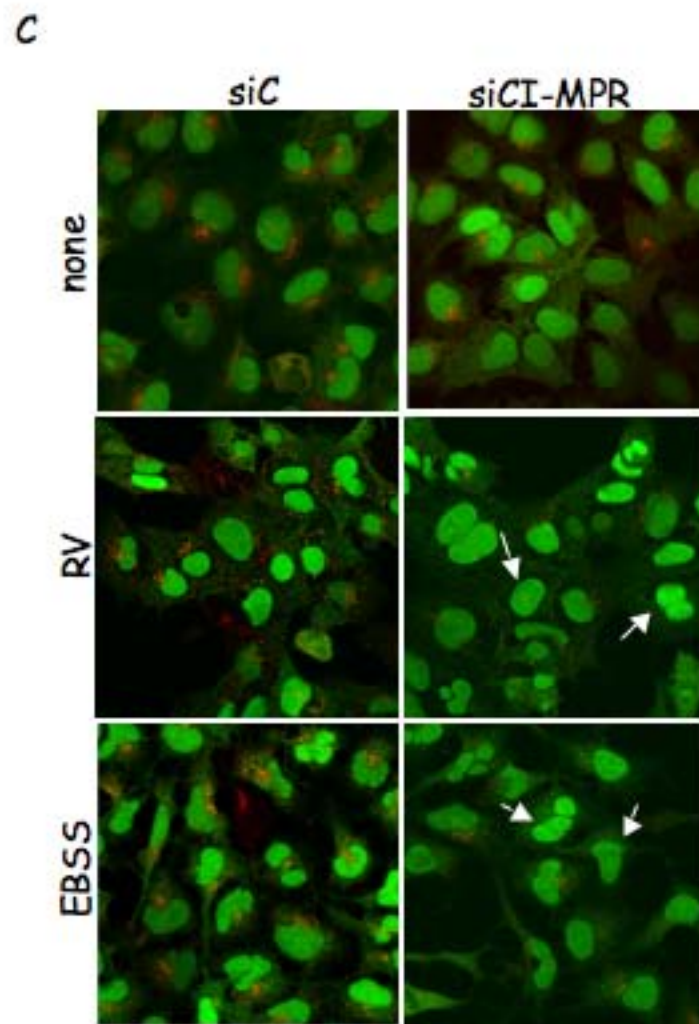
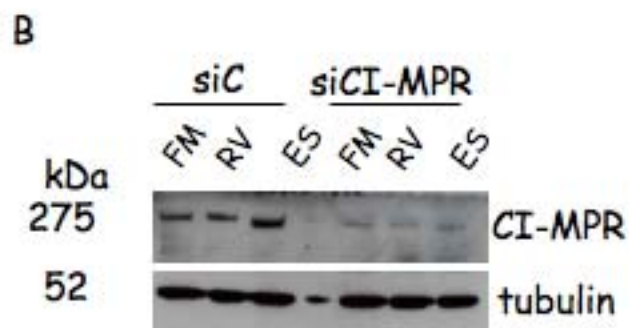
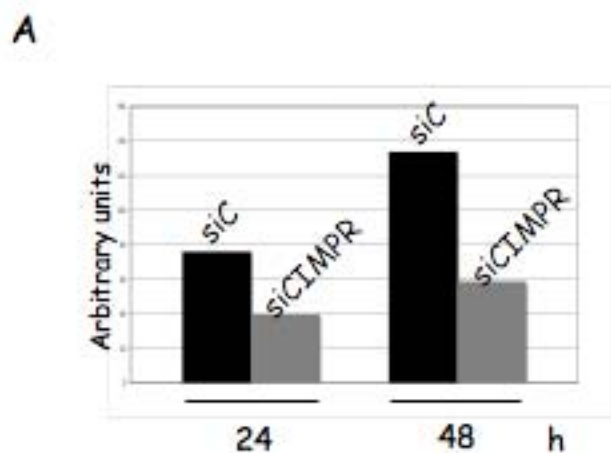


Fig.3 A: Istogramma per densitometria. B: Immunoblotting per il recettore CI-MPR e tubulina C: Immagine di immunofluorescenza. Le cellule 2GL9 sono state marcate con anti CI-MPR (in rosso).