

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

Relazione annuale, A.A: 2003-2004
III anno

**RUOLO DELL'AUTOFAGIA NELLA PATOGENESI DEL
DIABETE INSIPIDO**
**studio di un modello 'in vitro' costituito da cellule di neuroblastoma
adenovirus-infettate che iper-esprimono vasopressina mutata**

Tutor: Prof. Ciro Isidoro

Candidata: Roberta Castino

INTRODUZIONE

I lisosomi e l'autofagia

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

L'autofagia è un complesso processo cellulare che coinvolge riarrangiamenti dinamici delle membrane. Originariamente fu descritta come la risposta cellulare alla mancanza di nutrienti. In cellule di mammifero private di siero e aminoacidi appaiono rapidamente vescicole nel citosol. Queste vescicole dette autofagosomi hanno una vita media di pochi minuti in quanto rapidamente fondono con i lisosomi. L'autofagia è probabilmente il meccanismo principale per la degradazione di proteine a lunga vita e il solo meccanismo per il turnover di organuli quali mitocondri e perossisomi. Sebbene il turnover di organuli avvenga generalmente in modo non selettivo, la degradazione dei perossisomi attraverso un processo noto come "pexofagia" può essere altamente selettivo. Il meccanismo di pexofagia dei perossisomi è stato mostrato nei lieviti così come nelle cellule di mammifero. L'autofagia inizia con l'intrappolamento di una porzione di citoplasma che può includere un intero organello in una vescicola a doppia membrana, che generalmente deriva dal reticolo endoplasmatico (Dunn, 1990; Bohley e Seglen, 1992) e probabilmente anche dal Trans

Golgi Network (TGN) (Kihara et al., 2001) per formare il vacuolo autofagico (fig. 1). Il passaggio successivo prevede la fusione del vacuolo autofagico con il lisosoma e rilascio del corpo autofagico. Il processo autofagico è finemente regolato a vari livelli (Klionski e Emr, 2000, Kim e Klionski, 2000).

Autofagia e morte cellulare programmata

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

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

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

Autofagia e malattie neurodegenerative

Molte malattie neurodegenerative sono la conseguenza di neurodegenerazione e morte cellulare dei neuroni (Mattson, 2000). Un dato costante in malattie neurodegenerative quali la Sindrome di Alzheimer, il morbo di Parkinson o la Corea di Huntington è la presenza di vacuoli autofagici nei neuroni interessati dalla patologia (Anglade et al., 1997; Nixon et al., 2000; Kegel et

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

Diabete insipido familiare neuroipofisario

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

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

Nel laboratorio del Prof. Murphy, dove ho trascorso 10 mesi durante questo anno di Dottorato, abbiamo generato un modello in vitro che riproduce il fenotipo cellulare descritto nei neuroni di ratti transgenici FNFI. Questi ratti, prodotti nel laboratorio del Prof Murphy esprimono il gene 3-VCAT-3-Cys67Stop che codifica per una vasopressina troncata omologo a quella riscontrata in una forma di FNFI dell'uomo (Cys67stop), e presentano i sintomi del diabete insipido

neuroipofisario. L'ibridazione in situ ha dimostrato l'espressione cellula-specifica del transgene nei neuroni ipotalamici magnocellulari sopraottici (SON) e paraventricolari (PVN) dei ratti FNDI. L'RNA transgenico è tradotto in un peptide che viene rilevato nei corpi cellulari di SON e PVN, ma non nei prolungamenti neuritici di ratti deidratati usando uno specifico anticorpo che riconosce unicamente un epitomo inserito al carbossiterminale della vasopressina Cys67Stop troncata. L'induzione della proteina Cys67Stop determina nei neuroni la comparsa di strutture vescicolari dilatate nel corpo cellulare che sono riconosciute da anticorpi specifici per il reticolo endoplasmico. La microscopia elettronica evidenzia una tipica morfologia riconducibile alla presenza di vescicole autofagiche.

SCOPO DEL LAVORO

Il principale obiettivo di questo progetto è l'identificazione delle molecole che regolano il processo autofagico nelle cellule neuronali e che sono responsabili in caso di malfunzionamento della morte cellulare autofagica nelle malattie neurodegenerative e la correlazione con la morte cellulare. Durante il mio terzo anno di dottorato nel laboratorio del Prof. Murphy abbiamo messo a punto in vitro un modello di FNDI e

abbiamo ipotizzato che

- 1) i sistemi di trasduzione del segnale che regolano l'autofagia nei lieviti sono omologhi a quelli che mediano il processo autofagico nell'FNDI;
- 1) l'autofagia è un meccanismo di sopravvivenza per la cellula esprimente una vasopressina mutata Cys67 stop;
- 2) l'espressione di Cys67Stop determina cambiamenti nell'espressione di geni che regolano l'autofagia e la morte cellulare.

RISULTATI

Il sistema ipotalamico-neuroipofisario (HNS) comprende i neuroni magnocellulari (MCNs) dei nuclei sopraottici (SON) e paraventricolari (PVN). L'HNS è la fonte dell'ormone antidiuretico vasopressina (VP). È stato proposto che l'FNDI sia dovuto all'intrappolamento della VP nel reticolo endoplasmatico e successiva degradazione per via autofagica nei lisosomi. Per verificare questa ipotesi abbiamo valutato l'espressione di proteine marker della via endosomica-lisosomica e autofagica nei topi transgenici che esprimono la proteina mutata Cys67Stop. È stato

precedentemente dimostrato dal gruppo di David Murphy che la proteina mutata Cys67Stop accumula a livello del reticolo endoplasmatico. Nel corso del mio precedente soggiorno a Bristol (Feb-Luglio 2003) abbiamo caratterizzato i vacuoli autofagici nel modello *in vivo* valutando l'espressione delle proteine Beclin, Rab24 e VPs34, noti marcatori dell'autofagia. Per contro la presenza della proteina mutata nei ratti transgenici Cys67Stop non è stata evidenziata nel Trans Golgi Network così come nei ratti normali.

1) Nel modello in vitro la proteina vasopressina mutata Cys67stop accumula in compartimenti derivati dal reticolo endoplasmatico e catepsina D positivi

Abbiamo costruito vettori adenovirali (Ads) che esprimono i geni che codificano la vasopressina mutata (Ad-VCAT-Cys67stop; Fig. 3A) e la proteina wild-type riconosciuta al carbossi-terminale da una sequenza di 16 aminoacidi evidenziati dall'epitopo DR-12-EK (Ad-VCAT).

Abbiamo infettato cellule di neuroblastoma murino Neuro2a con questi vettori virali, e abbiamo esaminato la morfologia delle cellule al microscopio a contrasto di fase (Fig 3B).

Le cellule infettate con Ad-VCAT appaiono indistinguibili dalle cellule non infettate (sham), entrambe mostrano processi neuritici caratteristici (Fig 3B). Per contro, le cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop mostrano un aspetto arrotondato, e presentano pronunciate inclusioni citoplasmatiche (Fig 3B).

Le cellule sono state colorate con Arancio di Acridina (AO), un colorante fluorescente che identifica i compartimenti acidi vacuolari (Fig 3C). Nelle cellule non infettate e infettate con Ad-VCAT, il colorante rivela una colorazione diffusa in tutto il citoplasma, come ci si attende per il lisosomi. Per contro, l'infezione con Ad-VCAT-Cys67stop determina un accumulo e una ridistribuzione, in zona prevalentemente perinucleare, di compartimenti acidi di volume notevolmente aumentato.

Abbiamo, successivamente, utilizzato anticorpi specifici che riconoscono o la proteina mutata Cys67stop o l'epitopo VCAT DR-12-EK. Nelle cellule N2a, similmente ai ratti transgenici di controllo, la proteina wild type riconosciuta da DR-12-EK si localizza nel corpo cellulare, lungo i processi neuritici e accumula nei terminali nervosi (Fig 3D). Per contro, la proteina troncata, similmente a quanto accade nei ratti transgenici FNDI, e' confinata nel corpo cellulare e prevalentemente in grosse vescicole (Fig 3D) che derivano dal reticolo endoplasmatico come dimostrato dalla colocalizzazione con calnexin e con la proteina disulfide isomerasi (PDI), due marcatori del reticolo endoplasmatico (Fig 4).

La proteina vasopressina troncata non colocalizza con TGN38, un marker dell'apparato di Golgi, e colocalizza con il marker lisosomico catepsina D (Fig 4). Questi dati suggeriscono che nelle cellule Neuro 2a la proteina mutata Cys67stop accumula nel reticolo endoplasmatico e dopo essere inclusa in vescicole viene trasportata in compartimenti lisosomici per essere degradata. Per verificare la natura verosimilmente autofagica di queste vescicole abbiamo eseguito una immunofluorescenza di colocalizzazione della vasopressina troncata con Rab24, una GTPasi presente sulla membrana dei vacuoli autofagici. La figura 6 mostra in effetti la colocalizzazione della vasopressina troncata con la proteina Rab24.

2) L'espressione della vasopressina mutata Cys67stop conduce all'autofagia.

Abbiamo voluto verificare l'ipotesi che la presenza di vasopressina troncata induce effettivamente l'atg e a questo scopo abbiamo utilizzato marker specifici dell'autofagia nel modello in vitro costituito da cellule N2a infettate con Ad-VCAT e con Ad-VCAT-cys67stop.

In primo luogo abbiamo utilizzato la monodansilcadaverina (MDC), un marker specifico del processo autofagico. Nelle cellule non infettate e nelle cellule infettate con Ad-VCAT, l'MDC mostra una caratteristica positività puntiforme e diffusa (Fig 5A). Per contro, nelle cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop l'infezione risulta in un accumulo di grosse vescicole MDC positive (Fig. 5A), fatto che suggerisce una iper-regolazione dell'autofagia. Questo dato è stato confermato dall'analisi dell'espressione di Beclin-1, l'omologo in mammiferi della controparte in lievito Atg6, un regolatore della via autofagica che associa con l'inibitore apoptotico bcl -2. Il western blotting mostra una significativa iperespressione di Beclin-1 nelle cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop (Fig. 5B e C), in accordo con l'iper-regolazione del processo autofagico.

Successivamente abbiamo caratterizzato la distribuzione intracellulare di regolatori chiave dell'autofagia. Abbiamo esaminato Beclin-1, la fosfatidilinositolo 3-chinasi di classe 3 (PI3K) Vps34 e Rab24. Beclin-1 interagisce con la fosfatidilinositolo 3-chinasi di classe 3 (PI3K) Vps34 e, insieme, queste molecole controllano l'autofagia formando un complesso a livello del TGN. Si pensa che Rab24 sia coinvolto nella regolazione del trasporto vescicolare associato con l'autofagia. Nelle cellule N2a infettate con il vettore virale Ad-VCAT-Cys67stop. (Fig. 6A), l'espressione della proteina mutata altera drammaticamente la distribuzione di questi markers, che in questa condizione colocalizzano con la proteina Cys67stop o con i markers del reticolo endoplasmatico all'interno di grosse vescicole.

3) Nelle cellule che esprimono la proteina Cys67stop l'inibizione del processo autofagico-lisosomico conduce alla morte cellulare apoptotica

In una seconda serie di esperimenti ci siamo chiesti se l'espressione della proteina mutata Cys67stop e l'attivazione dell'autofagia potessero interferire con la vitalità cellulare nelle cellule N2a. Di per sé, Ad-VCAT-Cys67 non ha alcun effetto sulla vitalità cellulare come dimostrato dall'analisi visiva al microscopio (Fig. 7A), dalla conta cellulare fino a 2 giorni dall'infezione (Fig. 7B) o dall'incorporazione di tripan blue (Fig. 7C). Comunque, il trattamento delle cellule infettate con classici inibitori dell'autofagia quali la 3-metil adenina (3-MA), che blocca la formazione dell'autofagosoma, e l'asparagina (Asn), che blocca la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, drammaticamente induce la morte cellulare nelle cellule infettate con Ad-VCATCys67stop, ma non nelle cellule infettate con Ad-VCAT, come mostra l'immagine del monostrato al microscopio ottico (Fig. 8A), con la conta cellulare (Fig. 8B) e con il test di esclusione con tripan blue (Fig. 8C). E' molto interessante notare che anche la Pepstatina A (Pst A) un inibitore specifico della proteasi lisosomica catepsina D, induce morte cellulare nelle cellule che esprimono Cys67stop, suggerendo che la degradazione nei lisosomi della proteina mutata è mediata (principalmente) dalla catepsina D ed è importante per la sopravvivenza dei neuroni.

Per chiarire se la morte cellulare indotta dall'inibizione della degradazione autofagico-lisosomica nelle N2a infettate con Ad-VCAT-Cys67stop fosse apoptosi classica, abbiamo utilizzato il citofluorimetro a flusso per quantificare le cellule marcate con FITC-Annexin V, che identifica le cellule nelle prime fasi apoptotiche, o ioduro di propidio (PI), che identifica le cellule ipodiploidi nella fase sub G1. L'inibizione della via autofagico-lisosomica con 3-MA, Asn o Pst A non ha alcun effetto sul legame di Annexin-V FITC nelle cellule infettate con Ad-VCAT (Fig. 9A).

Nelle cellule che iper-esprimono la proteina Cys67stop l'inibizione della proteolisi autofagica con Asn, 3-MA o Pst aumenta significativamente la quota di cellule nella fase sub G1 e non ha effetto sulle cellule infettate con Ad-VCAT (Fig. 9B). La presenza della caratteristica alterazione della cromatina e' evidenziata anche dalla colorazione con il DAPI che mostra condensazione nucleare e frammentazione nelle cellule trattate infettate con Ad-VCAT-Cys67stop, ma non nelle cellule infettate con Ad-VCAT (Fig. 9C).

L'apoptosi è associata all'attivazione delle caspasi e al rilascio del citocromo c. Per dimostrare che l'apoptosi indotta dal blocco dell'autofagia e' apoptosi classica abbiamo verificato la permeabilità della membrana mitocondriale (Fig. 9D), il rilascio del citocromo c dai mitocondri (Fig. 9E) e l'attivazione delle caspasi (Fig. 9F). Il trattamento con Asn e Pst induce una alterazione dell'integrità mitocondriale come dimostrato dalla colorazione con rodamina 123 (Fig. 9D) e

dall'immunofluorescenza del citocromo c (Fig. 9E) nelle cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop, ma non nelle cellule infettate con Ad-VCAT. Inoltre il trattamento con 3-MA, Asn and Pst attiva le caspasi nelle cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop e non le cellule infettate con Ad-VCAT (Fig. 9F).

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati fin qui riportati possiamo concludere che:

- 1) Il modello in vitro riproduce sostanzialmente il fenotipo dell' FNDI dei ratti transgenici e pertanto è un buon modello per studiare le basi molecolari di questa malattia.
- 2) la proteina Cys67stop localizza in grosse vescicole che originano dal reticolo endoplasmatico e colocalizza con markers dell'autofagia quali Beclin-1, Rab 24 e Vps34.
- 3) l'espressione di una vasopressina mutata induce l'autofagia in cellule in neuroblastoma N2a infettate con Ad-VCAT-Cys67stop così come nei neuroni di ratti transgenici FNDI. Il diabete insipido neuroipofisario (FNDI) puo' dunque essere aggiunto alla lista delle malattie neurodegenerative associate all'iper-regolazione dell'autofagia, insieme con le malattie di Parkinson (Anglade et al., 1997; Jellinger et al., 2000), Alzheimer (Cataldo et al., 1996; Nixon et al., 2000) e Huntington (Kegel et al., 2000).
- 4) L'inibizione del processo autofagico-lisosomico con 3-MA, Asn e Pst aumenta in modo significativo la morte cellulare apoptotica e quindi l'autofagia è un meccanismo di sopravvivenza cellulare.

OBIETTIVI FUTURI

Analisi della relazione esistente tra autofagia e morte cellulare nelle cellule infettate con Ad-VCAT e Ad-VCAT-cys67stop sottoposte a stress excito-tossici.

Verrà utilizzata la dopamina come sostanza per indurre la morte cellulare e verrà verificato se l'autofagia indotta da Cys67stop possa rendere le cellule di neuroblastoma piu' sensibili alla morte cellulare indotta da Dopamina

Analisi dei profili di espressione genica modificati dalla presenza di VPcys67stop nelle cellule.

Microchip (forniti da NIA, Baltimora) contenenti in duplicato un Neuroarray di 1152 cDNA di geni espressi nel cervello sono stati utilizzati per uno studio preliminare di profili di espressione genica in neuroni ipotalamici di ratti di controllo e FNDI e N2a. Si sono ottenute interessanti

indicazioni riguardo l'espressione di alcuni geni coinvolti nell'autofagia e nell'apoptosi. L'analisi dei profili di espressione genica sarà approfondita, utilizzando anche chip Affymetrix e utilizzando il software gene spring per l'analisi dei dati

BIBLIOGRAFIA

Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C., Agid Y. 1997. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol* 12 :25-31

Ballard F.J. Regulation of protein breakdown by epidermal growth factor in A431 cells. 1985 *Exp. Cell. Res* 157 (1) 172-80

Barlow C., Ribaut-Barassin C., Zwingman T.A., Pope A.J., Brown K.D., Owens J.W., Larson D., Harrington E.A., Haerberle A.M., Mariani J., Eckhaus M., Herrup K., Bailly Y. 2000. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *PNAS* 97:871-876

Bohley P., Seglen P.O. 1992. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*. 48: 151-7

Bursch W., Ellinger A., Gerner C., Frohwein U., Schulte-Hermann R. 2000. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann. Y. Acad. Sci.* 926: 1-12.

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

Castino R., Pace D., Demoz M., Gargiulo M., Ariatta C., Raiteri E., Isidoro C. 2000. Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas. *Int J Cancer* 97:775-779.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGURE

Figura 1. Autofagia in cellule di mammifero. Nell'autofagia possiamo distinguere quattro fasi: l'induzione, il sequestro, la fusione e la degradazione. Il processo inizia con l'intrappolamento di materiale citoplasmatico per evaginazione di membrane nel RE liscio(1). L'autofagia è regolata a vario livello da PI3k e GTPasi e può essere bloccata nelle diverse tappe da inibitori specifici. La funzione delle molecole indicate in figura è esplicitata nel testo. Successivamente si forma l'autofagosoma (2) che contiene il materiale sequestrato; l'autofagosoma fonde con il lisosoma a formare l'autolisosoma degradativo (3) all'interno del quale il materiale intrappolato viene digerito da idrolasi lisosomiche.

Figura 2. L'FNDI si manifesta con un'eccessiva sete e diuresi come conseguenza di una progressiva perdita dell'ormone vasopressina dai terminali nervosi post pituitary. La vasopressina è sintetizzata nei neuroni magnocellulari i cui corpi cellulari sono localizzati nei nuclei sopraottici (SON) e nei nuclei paraventricolari (PVN) del sistema ipotalamico. Dopo la traslocazione nel RE, il propeptide viene trasferito all'apparato di Golgi e nel TGN viene incluso in densi granuli della via secretoria. Un ulteriore step di maturazione avviene quando i granuli sono trasportati lungo gli assoni dal corpo cellulare ai terminali nervosi. Qui, il peptide viene mantenuto e mobilizzato solo quando viene fisiologicamente richiesto per essere secreto.

Figura 3. Modello in vitro per l'FNDI. (A) Diagramma schematico dei vettori virali Ad-VCAT e Ad-VCATCys67stop descritti in questo studio e delle proteine che codificano. VCAT è formato dai tre esoni (I, II e III) del gene strutturale della Vasopressina (VP) di ratto contenente la cloramfenicolo acetil transferasi (CAT) nell'esone III. VCAT codifica un precursore della VP che consiste, dall'ammino terminale, del peptide segnale (SP), dell'ormone VP, della neurofisina (NP II), una glicoproteina troncata (GP) e un esadecapeptide unico (DRSAGYYGLFKDRKEK, abbreviato DR-12-EK) al carbossiterminale con funzione di epitopo antigenico (Waller et al., 1996). DR-12-EK è riconosciuto da un antisiero specifico (DR-12-EK; Walzer et al., 1996). Nel transgene VCAT-Cys67stop, il codone TGC per Cys 67 nell'esone II è mutato in un codone di stop TGA. La proteina troncata è specificatamente riconosciuta da un antisiero CX67 (Si-Hoe et al., 2000; Davies and Murphy, 2002).

(B) L'infezione delle cellule Neuro2a con Ad-VCAT non ha effetti sulla morfologia; per contro, l'espressione di Ad-VCAT-Cys67stop provoca l'arrotondamento delle cellule e la perdita dei neuriti associata alla comparsa di inclusioni intracitoplasmatiche di notevoli dimensioni (immagine a contrasto di fase). Il grafico sulla destra mostra la quantificazione del fenomeno di arrotondamento. Le cellule sono state contate sotto il microscopio a contrasto di fase e la percentuale di cellule tondeggianti espresso come percentuale del totale.

(C) Le cellule adesive su vetrino da immunofluorescenza e incubate con il colorante Arancio di Acridina, un fluorocromo che accumula nei compartimenti acidi. Nelle cellule non infettate o infettate con Ad-VCAT, il colorante rivela una colorazione diffusa e puntinata in tutto il citoplasma. Per contro le cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop mostrano un accumulo di compartimenti acidi di notevoli dimensioni in zona perinucleare.

(D) Cellule cresciute su vetrino sono state incubate con un anticorpo primario e poi con un appropriato anticorpo secondario marcato con FITC o Texas-red. L'espressione di Ad-VCAT rivela la presenza di VP nel corpo cellulare, lungo i neuriti e nei terminali nervosi. Per contro la proteina troncata è confinata nel corpo cellulare all'interno di compartimenti vacuolari visibilmente ingrossati.

Figure 4. La vasopressina troncata accumula nel reticolo endoplasmatico e in compartimenti catepsina D positive. Cellule N2a infettate e cresciute su vetrini sono state fissate e poi incubate con anticorpi specifici sia per l'epitopo DR-12-EK che per il Cys67stop (fluorescenza verde).

L'espressione della proteina transgene è stato comparata a quella di specifici markers di compartimenti intracellulari (fluorescenza rossa). Le strutture che contengono la proteina Cys67stop nel corpo cellulare sono originate dal reticolo endoplasmatico, come rivela la colocalizzazione con calnexina e con PDI. La proteina troncata non raggiunge l'apparato di Golgi (TGN) e colocalizza con il marker lisosomico catepsina D.

Figure 5. L'espressione della vasopressina troncata Cys67stop induce l'autofagia. (A) Cellule infettate sono state incubate con MDC per 6, 24, e 48 h e poi analizzate con il microscopio a fluorescenza (eccitazione: 380-420). Nelle cellule Neuro 2a non infettate e infettate con Ad-VCAT, il marker specifico degli autofagosomi MDC mostra un caratteristico aspetto diffuso e puntinato. L'infezione con Ad-VCAT-Cys67stop determina l'accumulo di grosse vescicole MDC positive. (B) 30 µg di omogenato cellulare sono stati separati su di un gel di Acrilamide al 12,5% (w/v) e poi trasferiti mediante western blotting su di una membrana PDVF. Beclin è stata rivelata con una reazione di chemiluminescenza usando un anticorpo primario policlonare specifico seguito da un secondo anticorpo coniugato a perossidasi. La membrana è stata sottoposta a "stripping" e re-incubata con anticorpo monoclonale anti tubulina per verificare l'eguaglianza di caricamento. (C) Espressione di beclin in tre diversi esperimenti normalizzata rispetto l'espressione della tubulina. L'esperimento dimostra un significativo aumento dell'espressione di Beclin-1 in seguito all'infezione con Ad-VCAT-Cys67stop

Figure 6. Co-localizzazione della proteina transgene con specifici markers del sistema autofagico Nelle cellule infettate con Ad-VCAT, si osserva una lieve colocalizzazione di DR-EK-12 con beclin-1, rab 24 e Vps34. Per contro l'espressione di Cys67 stop altera drammaticamente la distribuzione di questi markers che ora localizzano fortemente sia con la proteina Cys67stop e sia con PDI in grosse vescicole.

Figure 7. Vitalità delle cellule infettate con Ad-VCAT o Ad-VCAT-Cys67. L'infezione da parte di Ad-VCAT ne' Ad-VCAT-Cys67stop altera la crescita delle cellule N2a.

(A) Le cellule sono state infettate con Ad-VCAT o Ad-VCAT-Cys67stop. La crescita cellulare è stata seguita per 6, 24 e 48 h e le cellule fotografate al microscopio a contrasto di fase. (B) Alle date indicate, le cellule di controllo (sham) o infettate sono state raccolte e contate con l'emocitometro. (C) La proporzione di cellule necrotiche è stimato mediante test di esclusione al colorante tripan blue.

Figure 8. L'inibizione del processo autofagico-lisosomico induce morte cellulare nelle cellule infettate con Ad-VCAT-Cys67stop.

Il trattamento di cellule infettate con gli inibitori di autofagia Asn e 3-MA, e con l'inibitore della catepsina D lisosomica, Pst A, induce la morte cellulare nelle cellule Ad-VCATCys67stop, ma non nelle cellule infettate con Ad-VCAT, come dimostrato dall'osservazione al microscopio a contrasto di fase(A), dalla conta cellulare(B) e dalla stima delle cellule necrotiche colorate con Tripan blue(C).

Figure 9. L'inibizione del processo autofagico-lisosomico in cellule che iperesprimono la proteina troncata Cys67stop conduce alla morte cellulare per apoptosi.

(A) L'apoptosi è stata accertata mediante analisi citofluorimetrica dell'espressione di Annessina V sulla superficie cellulare. Il trattamento con inibitori della via autofagico-lisosomica in cellule N2a infettate con Ad-VCAT-Cys67stop, ma non con Ad-VCAT, aumenta la percentuale di cellule Annessina V positive. (B) La presenza di una popolazione ipodiploide (subG1) è stata valutata mediante analisi al citofluorimetro a flusso della popolazione totale (cioè' monostrato piu' cellule recuperate dal terreno). Il trattamento con inibitori della via autofagico-lisosomica aumenta in modo significativo la popolazione subG1 dopo infezione con Ad-VCAT-Cys67stop ma non Ad-VCAT.

(C) Alterazioni della cromatina sono evidenziate anche dalla colorazione con DAPI. Si osservano cellule frammentate e con DNA condensato.

(D) Valutazione della perdita di integrità della membrana mitocondriale con Rodamina 123.

L'inibizione del sistema autofagico-lisosomico con Asn o Pst mostra una colorazione diffusa tipicamente citoplasmatica se paragonata con le cellule di controllo in cui il colorante è confinato nei mitocondri. (E) Rilascio nel citosol di citocromo c rivelato attraverso immunofluorescenza

usando un anticorpo monoclonale specifico. (F) L'attivazione delle caspasi è stata valutata mediante colorazione delle cellule con FITC-VAD-FMK. Le cellule così marcate sono state osservate al microscopio a fluorescenza e poi analizzate al citofluorimetro a flusso. In presenza di 3-MA, Asn o Pst A, si osserva un significativo aumento della percentuale di cellule positive in cui sono attivate le caspasi.

ATTIVITA' FORMATIVA

(Anno 2003-2004)

SEMINARI

30/09/03 Dr. Anne Boullerne, University of Chicago. **“Multiplex role of nitric oxide in multiple sclerosis”**.

Non sono stati seguiti i seminari e le lezioni nei periodi di soggiorno all'estero. Sono stati comunque seguiti i seminari e i meeting nel Dipartimento ospitante.

SOGGIORNI ALL'ESTERO

7 Ottobre 2003- 15 Luglio 2004 University of Bristol, Bristol, UK (David Murphy).

WORKSHOP E CORSI SEGUITI DURANTE L'ANNO ACCADEMICO 2003-2004

Gene Spring workshop
Bristol – November 2003

The Proteomics Alliance Presents: New Tools and Techniques for Protein Research
London – 1 June 2004

Corso abilitazione all'uso del radioattivo
Bristol – April 2004

PUBBLICAZIONI

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

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

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

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

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

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

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

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

M. Lkhider, **R. Castino**, C. Isidoro and M. Ollivier-Bousquet.
Cathepsin D secreted by lactating rat mammary epithelial cells processes Prolactin in physiological conditions. In press *J. Cell Sci.* 2004.

R. Castino, J. Davies, S. Beaucourt, C. Isidoro and D. Murphy
Autophagy is a pro-survival mechanism in mouse neuroblastoma cells expressing a familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene. In sottomissione *FASEB J.* 2004.

R. Castino, C. Isidoro and D. Murphy. Autophagy –dependent cell survival and cell death in a Familial Neurohypophyseal Diabetes Insipidus *in vitro* model. In sottomissione *FASEB J.* 2004.

CONGRESSI anno 2003-2004

