



Università degli Studi di Cagliari

**SCUOLA DI DOTTORATO IN**

*Tossicologia-Oncologia e Patologia Molecolare*

Ciclo XXIII

**RUOLO DELLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO (ER)  
NEL PROCESSO APOPTOTICO INDOTTO DALL'ACIDO LIPOICO  
IN LINEE CELLULARI DI EPATOMA**

Settore Scientifico Disciplinare di Afferenza: **MED/04**

Presentata da: Dott.ssa Tania Camboni

Direttore: Prof. Gaetano Di Chiara

Tutor: Dott.ssa Gabriella Simbula

**Esame finale anno accademico 2009 - 2010**

# Indice

## **LISTA DELLE ABBREVIAZIONI** **Pag.3**

## **INTRODUZIONE** **Pag.6**

Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER) e Apoptosi.....	Pag.7
Fase di iniziazione:.....	Pag.9
■ PERK.....	Pag.9
■ ATF6.....	Pag.10
■ IRE1.....	Pag.11
Fase di attivazione:.....	Pag.12
■ CHOP.....	Pag.13
Fase d'esecuzione.....	Pag.15
Apoptosi mediata dallo Stress del ER e Acido lipoico.....	Pag.16

## **SCOPO DEL LAVORO** **Pag.20**

## **MATERIALI E METODI** **Pag.23**

Reagenti.....	Pag.24
Linee e colture cellulari.....	Pag.24
Vitalità cellulare.....	Pag.24
Analisi della frammentazione del DNA mediante colorazione con Hoechst 33258.....	Pag.25
Estrazione RNA totale.....	Pag.26
Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA.....	Pag.26
RT-PCR (Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction).....	Pag.27
Analisi di espressione dei geni GRP78 e CHOP mediante Real-Time PCR.....	Pag.27
Analisi di GRP78 e CHOP mediante immunofluorescenza.....	Pag.27
Analisi dell'espressione delle proteine (Western Blot).....	Pag.28
Analisi dello splicing dell'XBPI.....	Pag.29
Analisi statistica.....	Pag.31
Analisi densitometrica.....	Pag.31

**RISULTATI E DISCUSSIONE** **Pag.32**

Effetto dell'acido lipoico (LA) e di un noto induttore dello stress del reticolo, la taspigargina (TG) sulla vitalità delle cellule di epatoma di ratto FaO ..... Pag.33

Analisi della morfologia nucleare nelle cellule FaO dopo trattamento con LA e TG... Pag.33

Variazione dell'espressione genica del marker di stress del reticolo GRP78 in seguito al trattamento con LA..... Pag.34

Analisi dell'espressione della proteina GRP78 nelle cellule FaO in seguito al trattamento con LA ..... Pag.35

Variazioni nell'espressione genica di CHOP in seguito al trattamento con LA..... Pag.36

Variazione dell'espressione della proteina CHOP e della proteina GADD34 in seguito al trattamento con LA..... Pag.37

Attivazione della pathway PERK-eIF2 $\alpha$  dopo trattamento con LA..... Pag.39

Attivazione della pathway IRE1-XBP1 e JNK dopo trattamento con LA..... Pag.39

Attivazione della pathway ATF6 mediata da LA..... Pag.41

**CONCLUSIONI** **Pag.42**

**FIGURE INTRODUZIONE: 1-9** **Pag.45**

**FIGURE RISULTATI: 10-29** **Pag.54**

**BIBLIOGRAFIA** **Pag.74**

## ***LISTA DELLE ABBREVIAZIONI:***

**ATF-6:** Activating Transcription Factor-6

**ATF-4:** Activating Transcription Factor-4

**ASK1:** Apoptosis Signal Regulated Kinase

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**CARD:** Caspase Activation Recruitment Domain

**cDNA:** complementary DNA

**DHLA:** Dihydrolipoic Acid

**D-MEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** Dimetisolfossido

**DR5:** Death-Receptor 5

**ER:** Endoplasmic Reticulum

**eIF2 $\alpha$ :** Eucariotic Initiation Factor 2

**ERAD:** Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

**ERO1:** ER Oxidoreductin 1

**ERSE:** ER Stress Response Element

**FCS:** Fetal Calf Serum

**GADD34:** Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein

**GADD153:** Growth-Arrest and DNA Damage-inducible gene 153

**GRP78:** Glucose Regulated Protein 78

**GRP94:** Glucose Regulated Protein 94

**HCC:** Hepatocellular Carcinoma

**HSP40<sup>IPK</sup>:** Heat Shock Protein 40

**IP3:** Inositol-3-Phosphate

**IRE1:** Inositol Requiring Enzyme 1

**JNK:** c-Jun-N-terminal kinase

**LA:** Lipoic Acid

**Lip-DH:** Lipoamide Dehydrogenase Mitochondrial

**MAM:** Mitochondrial Associated Membranes

**MAPKKK:** Activated Protein Kinase Kinase Kinase

**MEM:** Minimum Essential Media

**NRU:** Neutral Red Uptake

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**PERK:** Pancreatic er kinase (pkr)-like er kinase

**PDI:** Protein Disulfide Isomerase

**PMSF:** Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**S1P:** Serine Protease Site-1

**S2P:** Metalloprotease Site-2

**TG:** Thapsigargin

**TRAF2:** TNF Receptor Associated Factor 2

**UPR:** Unfolded Protein Response

**XBP1:** X-Box Binding Protein 1



# **Introduzione**

## **Stress del Reticolo Endoplasmatico (ER) e Apoptosi**

Il reticolo endoplasmatico (ER), un organulo presente sia nelle cellule animali che vegetali, svolge un ruolo preminente in numerosi processi di fondamentale importanza per la sopravvivenza e per il normale funzionamento cellulare. L'ER occupa circa il 10% del volume della cellula e presenta un'estensione variabile a seconda del tipo e dell'attività cellulare. L'ER è la sede della sintesi, del ripiegamento (“*folding*”) e delle modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e secrete (Ma Y, Hendershot LM, 2004). La maturazione delle proteine nascenti nel reticolo endoplasmatico è monitorata da molteplici disolfuro-isomerasi (ad es. PDI) che catalizzano la formazione dei ponti disolfuro e da una classe funzionale di famiglie proteiche le “*chaperones molecolari*” calcio-dipendenti (come GRP78, GRP94 e calreticulina), che si associano alle proteine neosintetizzate in modo da prevenirne l'aggregazione e consentire il loro corretto ripiegamento sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche (Kaufman RJ, 1999). Pertanto, il ER rappresenta un preciso sistema di controllo di qualità atto ad assicurare che solo le proteine correttamente ripiegate e funzionanti possano essere rilasciate dall'ER e raggiungere la loro destinazione finale, mentre le proteine malripiegate o non funzionanti sono trattenute nel ER e, in seguito, traslocate nel citosol per la degradazione da parte del proteosoma 26S, processo mediato dall'attivazione del sistema ***ER Associated Degradation (ERAD)*** (Fig.1).

L'azione del ER sul folding delle proteine è altamente sensibile a stimoli che inducono modificazioni dei livelli di energia intracellulari, dello stato redox o della concentrazione del  $Ca^{2+}$ . Tali stimoli sono in grado di modificare la capacità del *folding* del ER, la quale risulta nell'accumulo e nell'aggregazione di proteine non ripiegate o mal ripiegate nel lume del reticolo stesso, una condizione che viene definita come *stress del reticolo endoplasmatico*.

Tale formazione di aggregati proteici è tossica per le cellule e rappresenta la base biochimica di numerose condizioni fisiopatologiche associate allo *stress del reticolo endoplasmatico (ER stress)* inclusa l'ischemia, le malattie neurodegenerative, il diabete e i tumori (Rutishauser J, Spiess M, 2002).

Allo scopo di combattere gli effetti deleteri associati allo stress del ER, le cellule hanno evoluto diverse strategie protettive, le quali sono state collettivamente incluse nel processo denominato ***Unfolded Protein Response (UPR)***. Questa complessa risposta cellulare è mediata dall'attivazione di tre recettori trans membrana del reticolo (*Sensori di*

*stress*) denominati rispettivamente: *Pancreatic ER Kinase* (PERK), *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) e *Inositol-Requirng Enzyme 1* (IRE1). In assenza di stress del ER i tre recettori del ER vengono mantenuti in uno stato inattivo attraverso la loro associazione con la molecola chaperone, *Glucose Regulated Protein 78* (GRP78).

Al contrario in seguito all'accumulo, a livello del reticolo, di proteine malripiegate, il GRP78 si dissocia dai tre recettori determinando la loro attivazione e inducendo l'UPR (Fig.2).

L'UPR, in questa prima fase, favorisce la sopravvivenza cellulare per consentire l'eliminazione delle proteine mal ripiegate accumulate all'interno del ER con conseguente ripristino del normale funzionamento del reticolo stesso (Schroder M, Kaufman RJ, 2005). Tuttavia se l'aggregazione delle proteine è persistente e lo stress non può essere risolto, l'UPR induce l'arresto del ciclo cellulare e successivamente, l'apoptosi. Sebbene l'esatto meccanismo(i) molecolare non sia noto, sembra che l'apoptosi indotta da stress del reticolo sia mediata principalmente dai mitocondri e/o dall'attivazione *downstream* di chinasi proapoptotiche dipendenti dall'attivazione della via apoptotica estrinseca mediata dai recettori di morte (Ferri KF, Kroemer G, 2001). L'esistenza di una comunicazione tra ER e mitocondrio è sostenuta da evidenze sperimentali che dimostrano l'esistenza di un legame fisico tra i due organelli (Lebiedzinska M et al., 2009). Infatti, studi strutturali e funzionali hanno rilevato l'esistenza di alcune aree di contatto tra la membrana del ER e quella del mitocondrio definite come *Mitochondrial Associated Membranes* (MAM), che svolgono un ruolo critico nella trasmissione dei segnali fisiologici e patologici dal ER al mitocondrio. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che l'induzione di uno stress del ER persistente potrebbe rappresentare un checkpoint nella regolazione della fase di iniziazione della via apoptotica mitocondrio-mediata (Szegezdi E et al., 2006).

Pertanto, il ER potrebbe essere considerato come il sito dove i segnali apoptotici vengono generati e integrati al fine di indurre la morte cellulare.

Nella presente trattazione prenderemo in esame, in particolare, i meccanismi attraverso i quali l'attivazione dell'UPR potrebbe indurre l'apoptosi mediata dallo *stress del reticolo*, attraverso l'analisi delle tre fasi del processo: *l'iniziazione, l'attivazione e l'esecuzione* (Fig.3).

### ***Fase di iniziazione***

I sensori PERK, ATF6, IRE1 hanno un ruolo preminente nella regolazione della risposta UPR. Tali sensori sembrerebbero agire in modo bivalente: in un primo momento mediando risposte protettive *pro-survival*, successivamente, qualora lo *stress del ER* sia persistente, andando ad attivare una serie di fattori trascrizionali che inducono la sintesi di proteine pro-apoptotiche (Boyce M, Yuan J, 2006).

Il ruolo di ciascuno dei mediatori dell'UPR e il loro possibile coinvolgimento nell'induzione del processo apoptotico verranno descritte singolarmente.

### **PERK**

PERK è una chinasi transmembrana di tipo I, che viene attivata dalla dissociazione di GRP78 dal suo dominio luminale.

In seguito a stress del ER, PERK determina la fosforilazione di eIF2 $\alpha$ , il quale, a sua volta, determina l'inibizione della traduzione proteica (Wek RC et al., 2006). Questo evento favorisce la sopravvivenza cellulare inibendo l'accumulo delle proteine nascenti che arrivano nel reticolo endoplasmatico. Poiché l'*eukariotic translation initiation factor 2 $\alpha$*  (eIF2 $\alpha$ ) è il substrato diretto della chinasi PERK, la sua fosforilazione avviene in maniera pressoché immediata portando al blocco della traduzione proteica in tempi molto rapidi (Koumenis C et al., 2002). Per questo motivo le cellule Perk<sup>-/-</sup> sono più sensibili allo stress del reticolo e sono, inoltre, parzialmente resistenti ad alcuni inibitori della sintesi proteica come la cicloesimide (Harding HP et al., 2000 B). E' interessante notare come l'inibizione della sintesi proteica da cicloesimide sia in grado di ridurre la morte cellulare mediata dallo stress del reticolo; tale effetto conferma che il blocco della sintesi delle proteine è cruciale per la sopravvivenza cellulare. La fosforilazione di eIF2 $\alpha$  è la sola via, attualmente nota, che regola la soppressione della sintesi proteica in risposta allo stress del ER (Ron D, 2002). Tuttavia, è stata dimostrata l'isistenza di alcune proteine, le quali sono in grado di eludere il blocco traduzionale dipendente da eIF2 $\alpha$ . Tra queste vi è la proteina ATF4 codificante per un *cAMP response element-binding transcription factor (C-EBP)* (Schroder M, Kaufman RJ, 2005) (Fig.4). La quale promuove la sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione di geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi, nelle reazioni redox, e nella secrezione proteica (Harding HP et al., 2003 A).

Tuttavia non tutti i geni indotti da ATF4 sono anti-apoptotici, infatti il fattore di trascrizione *C/EPB homologous protein (CHOP)*, la cui attivazione è strettamente correlata all'ATF4, promuove la morte cellulare per apoptosi. CHOP, che descriveremo dettagliatamente di seguito, rappresenta il principale promotore della morte cellulare mediata dallo stress del ER (Wang XZ et al., 1996). Pertanto, l'attivazione di PERK, in seguito ad ER stress moderato, media, inizialmente, una risposta protettiva cruciale per la sopravvivenza; tuttavia, se lo stress persiste, la trascrizione di CHOP, ad opera di ATF4, rappresenta il fattore critico responsabile del passaggio dalla via di sopravvivenza a quella dell'apoptosi.

Dall'analisi del profilo di espressione genica in seguito ad induzione dello stress del reticolo, è emerso che l'attivazione del PERK, la fosforilazione del eIF2 $\alpha$ , e l'upregulation dell'ATF4 sono alla base dell'azione pro-apoptotica dei geni growth arrest and DNA damage 34 (GADD34), CAAT/enhancer binding protein (C/EPB) homologous protein (CHOP/GADD153). Tra questi, il GADD34 sarebbe, inoltre, responsabile della defosforilazione del eIF2 $\alpha$  attraverso un meccanismo a feedback negativo che porta all'inibizione dell'espressione genica stress-indotta, e che potrebbe promuovere il ripristino della traduzione proteica in seguito a induzione dell'UPR (Novoa I et al., 2001).

## **ATF6**

Nei mammiferi il sensore ATF6 è presente in due isoforme, denominate ATF6 $\alpha$  (90 kD) e ATF6 $\beta$  (110 kD). ATF6 è una glicoproteina transmembrana di tipo II, il cui dominio luminale è responsabile del rilevamento delle proteine mal ripiegate. La porzione citoplasmatica di ATF6 è in grado di agire da fattore trascrizionale in quanto contiene un dominio di legame al DNA.

In seguito alla sua dissociazione dalla proteina chaperone GRP78, l'ATF6 trasloca nell'apparato di Golgi, dove subisce un taglio proteolitico a livello del suo dominio iuxtamembrana, ad opera delle serina proteasi S1P e S2P, generando un fattore di trascrizione attivo (Chen X et al., 2002) (Fig.5). L'ATF6 attivo trasloca nel nucleo e induce la trascrizione di geni che possiedono a livello del proprio promotore un *ER response element* (ERSE) (Schroeder M, Kaufman RJ, 2005).

I geni target dell'ATF6 finora identificati includono quelli codificanti per alcune proteine chaperons, come il GRP78, il GRP94, per *proteine disolfuro isomerasi* (PDI), per il fattore di trascrizione GADD153/CHOP e per *l'X box-binding protein 1* (XBP1). In

particolare ATF6 $\alpha$  collabora con il sensore IRE1 nell'induzione dell'espressione di mRNA di XBP1 che, come descriveremo di seguito in dettaglio, viene successivamente sottoposto a splicing endoribonucleasico ad opera di IRE1 (Yoshida H et al., 2001).

Poiché l'attivazione dell'ATF6 determina l'induzione dell'espressione di geni codificanti per le chaperons, la sua attivazione è responsabile dell'aumento della capacità del reticolo di ripiegare le proteine, contribuendo al ripristino dell'omeostasi iniziale.

Sebbene l'ATF6 possa indurre la trascrizione di CHOP non è stato ancora dimostrato un legame tra l'induzione dell'ATF6 e l'apoptosi indotta dallo *stress del reticolo*; infatti generalmente l'ATF6 media segnali *pro-survival* allo scopo di contrastare l'effetto del ER stress (Wu J et al., 2007).

## **IRE1**

L'IRE1 è un sensore con doppia attività enzimatica, in quanto è dotato sia di un dominio serin-treonin chinasi che di un dominio endoribonucleasico (Tirasophon W et al., 1998). In seguito a induzione dello stress del reticolo il distacco dal GRP78 determina l'attivazione dell'IRE1, mediante dimerizzazione e autofosforilazione.

L'IRE1 attivo determina lo splicing non conformazionale di 26 nucleotidi intronici dall'mRNA di XBP1 (Yoshida H et al., 2001), precedentemente trascritto ad opera di ATF6. La variante di splicing generata (sXBP1) codifica per un fattore di trascrizione stabile e attivo. sXBP1 trasloca nel nucleo dove determina la trascrizione di geni codificanti per le chaperons del ER, per alcuni componenti dell'ERAD e per P58<sup>IPK</sup>, un membro della famiglia delle *heat shock protein 40* (HSP40<sup>IPK</sup>) (Lee AH et al., 2003). p58<sup>IPK</sup> si lega al PERK e, mediante un meccanismo a feedback negativo, rimuove il blocco traduzionale PERK-mediato (Yan W et al., 2002). L'upregulation di P58<sup>IPK</sup> non è un evento immediato, in quanto la sua induzione si verifica diverse ore dopo la fosforilazione di PERK e di eIF2 $\alpha$ ; s'ipotizza pertanto che esso possa porre termine all'UPR quando lo stress del'ER è stato ormai risolto (Rutkowski DT, Kaufman RJ, 2004). Tuttavia, se la condizione di stress persiste, la P58<sup>IPK</sup> può indurre l'aumento della trascrizione e della sintesi di proteine pro-apoptotiche (Ladiges WC et al., 2005). Sebbene l'attivazione di IRE1 e lo splicing dell' mRNA di XBP1 sembrino essere eventi maggiormente implicati nella sopravvivenza cellulare, in quanto determinano l'induzione della trascrizione e della sintesi delle proteine chaperones GRP78 e GRP94 e della P58<sup>IPK</sup>, è stato dimostrato che l'iperespressione di IRE1 può anche indurre la morte per

apoptosi nelle cellule HEK293T (Wang XZ et al., 1998 A). Tale effetto pro-apoptotico dell'IRE1 sembrerebbe essere mediato dall'attivazione della chinasi JNK (Urano F et al., 2000). In particolare, il sensore IRE1 è stato visto essere in grado di reclutare, la molecola adattatrice TNF-receptor-associated factor 2 (TRAF2); il complesso TRAF2-IRE1 che si viene a formare a sua volta, attiva un segnale pro-apoptotico attraverso l'induzione dell'*Apoptosis Signal Regulated Kinase* (ASK1), una *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase* (MAPKKK), la quale, a sua volta trasmette il segnale di morte alle MAPKs JNK e p38 (Nishitoh H et al., 1998). Una volta attivato JNK è responsabile della fosforilazione di bcl2, sopprimendo così la sua l'attività antiapoptotica; inoltre, è in grado di determinare la fosforilazione della proteina pro-apoptotica BH3/BIM, potenziando in questo caso il suo effetto pro-apoptotico (Davis RJ, 2000) (Fig.6). In generale possiamo, pertanto, concludere che in presenza di ER stress l'attivazione del sensore IRE1 svolgerebbe un ruolo critico nell'avvio di segnali pro-apoptotici, mentre l'attivazione dei sensori PERK e ATF6 sembrerebbe precedere l'attivazione dell'IRE1 nel tentativo di risolvere lo stress in presenza di un'azione pro-survival. Qualora lo stress persista, le vie del PERK e dell'IRE1 possono convergere, mediando l'induzione del processo apoptotico attraverso un potenziamento reciproco.

### ***Fase di attivazione***

Come precedentemente descritto, i tre sensori dello stress possono indurre segnali proapoptotici in seguito ad una condizione di *stress del reticolo* sostenuta nel tempo; tuttavia è noto che l'induzione del processo apoptotico da parte di PERK, IRE1, ATF6 non è un evento diretto ma mediato dall'attivazione di molecole proapoptotiche, quali CHOP e JNK. In modo specifico va ricordato che tutti e tre i sensori sono coinvolti in maniera più o meno determinante nella regolazione dell'espressione del fattore di trascrizione pro-apoptotico CHOP.

## CHOP

Il CHOP è una proteina di 29 kDa costituita da 169 (uomo) o 168 (roditore) residui amminoacidici. La proteina CHOP è stata identificata per la prima volta come membro della famiglia delle *CCAAT/ enhancer binding proteins* (C/EBPs) che svolge il ruolo di inibitore negativo delle C/EBPs (Ron D, Habener JF, 1992). Il CHOP è, noto anche come *growth-arrest and DNA damage-inducible gene 153* (GADD153) in quanto è stato inizialmente identificato in risposta a danno al DNA. In assenza di ER stress è poco espresso (Ron D, Habener JF, 1992) ed è localizzato nel citosol, mentre in condizioni di stress si osserva un suo accumulo anche a livello nucleare (Ron D, Habener JF, 1992) (Fig.7). Alterazioni nei livelli di CHOP sono state osservate in diverse condizioni, quali la deprivazione da glucosio, da nutrienti e da aminoacidi. Studi successivi hanno messo in evidenza che vi è un aumento considerevole dell'espressione di CHOP in seguito a trattamento con diverse sostanze che inducono alterazioni della funzione del ER, quali la tunicamicina, che blocca la glicosilazione delle proteine, la taspigargina, che promuove la deplezione di calcio dal reticolo endoplasmatico, e il ditioteitrolo, che distrugge la formazione dei legami disolfuro. Tali evidenze sperimentali suggeriscono che il CHOP sia maggiormente espresso in seguito allo stress del ER, piuttosto che in seguito a danni al DNA. Tali dati sono stati ulteriormente confermati da recenti studi di microarray, i quali hanno evidenziato che il CHOP è il gene maggiormente indotto in seguito a stress del ER (Okada T et al., 2002).

L'espressione del CHOP è principalmente regolata a livello trascrizionale. In condizioni di stress persistente del ER, il CHOP può essere indotto in seguito all'attivazione dei tre sensori PERK, ATF-6 e IRE1. Tuttavia, *l'up-regulation* dell'espressione della proteina CHOP deve essere preceduta dall'attivazione della via PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 (Zinszner H et al., 1998). Inoltre, i livelli di CHOP, pur essendo controllati sia a livello trascrizionale che traduzionale, sono regolati anche a livello post-traduzionale in seguito alla fosforilazione, in corrispondenza dei residui di serina 78 e 81, ad opera della MAP-chinasi p38, che ne potenzia la sua attività. La p38 è un substrato di ASK1, il quale, a sua volta, viene reclutato dal complesso IRE1-TRAF2 in seguito a stress del ER. Pertanto, durante lo stress prolungato, le vie del PERK e dell'IRE1 possono convergere inducendo l'aumento trascrizionale di CHOP, probabilmente potenziando reciprocamente il loro effetto.

Numerosi studi sperimentali, condotti allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari che regolano l'apoptosi mediata dall'induzione del CHOP, hanno permesso di identificare numerosi suoi geni target, tra i più importanti troviamo GADD34 e BCL-2.

Il gene GADD34 codifica per una fosfatasi, in grado di defosforilare eIF2 determinando la soppressione del blocco traduzionale (Brush MH et al., 2003). L'aumento dell'espressione del GADD34 correla con l'apoptosi indotta da diversi segnali, inducendo ex novo o potenziando il processo apoptotico già avviato dall'attivazione d'altre vie del segnale.

Il meccanismo attraverso il quale GADD34 promuove l'apoptosi è sconosciuto, anche se esistono diverse teorie al riguardo. A tal proposito, alcuni autori sostengono che l'induzione di GADD34 permetterebbe la riattivazione della sintesi proteica bloccata in seguito a ER stress favorendo così la sintesi di proteine pro-apoptotiche (Hussain SG, Ramaiah KV, 2007).

Sebbene il CHOP sia principalmente responsabile dell'induzione dell'espressione genica, il gene anti-apoptotico BCL-2 è un esempio di gene target la cui espressione è *downregulated* dal CHOP.

A sostegno di ciò recenti studi hanno dimostrato che l'iper-espressione di BCL-2 e la down-regolazione di Bax e Bak, conferiscano la protezione contro lo stress letale del ER (Distelhorst CW, McCormick TS, 1996; Wei MC et al., 2001).

Attualmente sono stati descritti altri possibili meccanismi, i quali, anche se non completamente definiti sembrerebbero mediare la morte cellulare indotta da CHOP (Wang XZ et al., 1998 B) quali:

- La deplezione del glutatione cellulare. Questo determina un'alterazione dello stato redox intracellulare determinando la produzione eccessiva di ROS, e la morte cellulare in seguito a stress ossidativo.
- L'aumento dell'espressione dell'anidrasi carbonica VI, che catalizza l'idratazione reversibile della  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (Sok J et al., 1999). Questo evento determina l'acidificazione intracellulare (poichè si ha la dissociazione di  $\text{H}_2\text{CO}_3$  in  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ ) che conduce all'attivazione di molteplici processi cellulari e può portare anche a morte cellulare per apoptosi. Questo tipo di morte è mediata dall'aumento dell'attività pro-apoptotica di Bax, che è pH dipendente. Inoltre, in condizioni acide si può riscontrare anche un incremento dell'attivazione della pro-caspasi-9 mediata dall'apoptosoma.

- L'iper-regolazione del recettore di morte 5 *death receptor 5*-(DR5), che determina l'attivazione della cascata caspatica attraverso la via estrinseca mediata dalla caspasi-8 (Yamaguchi H, Wang HG, 2004).
- La stimolazione dell'espressione del ERO1 (ER oxidoreductin 1) un'ossidasi del reticolo endoplasmatico, che aumenta il potenziale ossidativo del ER determinando l'accumulo di ROS e la successiva morte cellulare (Frاند AR, Kaiser CA, 1999).

### ***Fase d'esecuzione***

L'attivazione di tutte le vie del segnale dell'UPR a monte della fase esecutrice del processo apoptotico mediato da *stress del reticolo*, quali l'attivazione di fattori di trascrizione, l'attivazione di vie del segnale chinasi-dipendenti e l'*upregulation* delle proteine della famiglia bcl-2, portano, in ultima analisi, all'attivazione delle caspasi, causando un'ordinata e sequenziale demolizione della cellula. L'attivazione delle caspasi è una fase essenziale per l'esecuzione del processo apoptotico.

Le caspasi coinvolte nell'apoptosi indotta dallo *stress del ER* non sono state ancora completamente caratterizzate, sebbene in diversi studi sia stato osservato che durante il processo apoptotico mediato da *stress del ER* vi è un'attivazione delle caspasi esecutrici 12, 3, 6, 7, e delle caspasi iniziatrici 8 e 9 (Rao RV et al., 2001). Tra queste, la caspasi 12 è stata recentemente proposta come mediatore chiave o iniziatrice dell'apoptosi ER stress mediata (Szegezdi E et al., 2003) sebbene i meccanismi d'attivazione non siano attualmente completamente noti.

La caspasi 12 murina (o caspasi 4 umana), è ubiquitariamente espressa e localizzata sulla membrana del ER sul versante citosolico. Come le altre caspasi, è comunemente sintetizzata sotto forma di proenzima inattivo costituito da un predominio regolatore e da due subunità catalitiche. In seguito a stress del reticolo persistente, la caspasi 12 viene attivata e trasloca nel citoplasma (Fischer H et al., 2002).

L'attivazione della procaspasi 12 può essere indotta dal complesso IRE1-TRAF2 (Yoneda T et al., 2001), da proteasi presenti sulla membrana del reticolo. Inoltre, in seguito a un'alterazione dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$ , come conseguenza dell'afflusso dello ione dal ER al citosol attraverso i pori costituiti dalle strutture oligomeriche di Bak e Bax (Zong WX et al., 2003, Scorrano L et al., 2003), si può avere l'attivazione e la mobilitazione degli enzimi calpaine che, rimuovendo il pro-dominio Caspase Activation

Recruitment Domain (CARD) della caspasi 12, la attivano (Nakagawa T, Yuan J, 2000). Questa, a sua volta, attiverà la caspasi 3 e altre caspasi, come la 7 e la 9, dando il via alla successiva cascata d'eventi apoptotici (Rao RV et al., 2004) (Fig.8).

### **Apoptosi mediata dallo stress del ER e Acido lipoico**

Come descritto in precedenza, la risposta della cellula allo stress del reticolo ha un duplice effetto sulla vitalità cellulare: inizialmente induce funzioni citoprotettive, attraverso l'attivazione di segnali UPR-mediati che ristabiliscono l'omeostasi della cellula e ne garantiscono la sopravvivenza ma successivamente, qualora lo stress del reticolo sia persistente e le condizioni iniziali non possano essere ripristinate, si ha l'induzione delle vie del segnale dell'UPR che mediano l'induzione del processo apoptotico.

Recentemente, numerose ricerche in campo oncologico hanno rivelato che lo stress del reticolo e l'attivazione dell'UPR svolgono un ruolo cruciale durante il processo di cancerogenesi, e pertanto sono stati riconosciuti come processi critici nella biologia delle cellule tumorali poiché responsabili del mantenimento del fenotipo maligno e dell'acquisizione della chemioresistenza (YanJun MA, Hendershot LM, 2004). Infatti, le cellule tumorali che sono in grado di crescere in condizioni sfavorevoli generate da stress oncogeni, quali l'ipossia, la deprivazione da nutrienti, il danno al DNA, lo stress metabolico e ossidativo, sono caratterizzate da un'UPR attiva che ne favorisce la sopravvivenza. Di contro, la maggior parte delle cellule normali non sono soggette a stress del reticolo e la via dell'UPR si trova prevalentemente in uno stato inattivo. L'identificazione di farmaci o sostanze capaci di indurre selettivamente nelle cellule tumorali la *downregulation* della sopravvivenza cellulare mediata dall'attivazione dell'UPR, attraverso l'inibizione dei suoi componenti, o di indurre artificialmente l'UPR in cellule tumorali, in cui si osserva una significativa attivazione basale di questo sistema, determinando una condizione di sovraccarico che favorirà l'induzione dell'apoptosi mediata dallo stress del ER, potrebbe migliorare significativamente l'efficacia di alcuni trattamenti terapeutici per la cura e la prevenzione dei tumori più aggressivi e resistenti alle terapie convenzionali, quali il tumore epatico.

A questo proposito numerose sostanze chimiche in grado di indurre stress del reticolo e morte cellulare per apoptosi in diverse linee cellulari tumorali, sono oggetto di intensi studi. Tra queste, è compresa una classe specifica di antiossidanti naturali, come la

ginesteina, il resveratrolo e la curcumina, i quali inducono morte cellulare per apoptosi mitocondrio e stress del ER mediata in diverse linee cellulari tumorali, ma non in cellule non-trasformate (Yeh TC et al., 2007; Park JW et al., 2007; Pae HO et al., 2007). Tali composti antiossidanti esercitano il loro effetto antiproliferativo attraverso l'induzione del blocco del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Da numerosi studi è emerso che composti antiossidanti possono indurre l'attivazione delle vie apoptotiche, intrinseca (mitocondrio-mediata) ed estrinseca (mediata dal recettore di morte), nonché l'apoptosi mediata dallo stress del reticolo, poiché esse determinano l'aumento dell'espressione del GRP78 e del CHOP, fosforilazione del PERK e del eIF2 $\alpha$  marcatori dello stress del ER in cellule leucemiche (Pae HO et al., 2007), di melanoma (Bakhshi J et al., 2008), in cellule di carcinoma polmonare umano (Lin SS et al., 2008), di epatocarcinoma (Yeh TC et al., 2007) e di cancro al colon (Woo KJ et al., 2007).

Nel presente studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione principalmente su un antiossidante naturale, l'acido lipoico (LA), il quale venne isolato per la prima volta nel 1951, da estratti di fegato bovino, dai biochimici americani L.J. Reed e I.C. Gunsalus (Reed LJ et al., 1951). L'LA è contenuto negli alimenti d'origine animale e vegetale in forma di lipolisina, sebbene la maggiore fonte di acido lipoico rimangono, comunque, i tessuti animali che presentano un'elevata attività metabolica, come per esempio il cuore, il fegato e i reni.

L'acido  $\alpha$ -lipoico (Fig.9) è una molecola di piccole dimensioni, presente in tutte le cellule procariotiche ed eucariotiche, chimicamente è caratterizzato dall'essere un derivato disulfide, sintetizzato dall'acido tiottico o lipoato, chimicamente denominato 1,2-ditiolano-3-pentanoico ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ), che ricopre un ruolo chiave nel metabolismo energetico cellulare e di cui sono note le proprietà antiossidanti (Dupre S et al., 1980). LA è formato da una catena di otto atomi di carbonio e due di zolfo, collocati nella parte terminale della molecola e legati al carbonio 6 e al carbonio 8. L'LA si trova in natura sia in forma ossidata che in forma ridotta, quest'ultima nota con il nome di acido diidrolipoico (DHHLA). Nella forma ridotta gli atomi di zolfo sono presenti come tioli liberi (-SH), mentre nella forma ossidata, grazie alla generazione di un legame disolfuro (-S-S-), danno origine a una struttura terminale ad anello tiolico. Le due forme sono però facilmente interconvertibili tramite reazioni redox (Fig.9). Sebbene la forma ridotta (acido diidrossilipoico) sia la più attiva, anche a quella ossidata sono ascrivibili proprietà antiossidanti (Scott BC et al., 1994).

La riduzione di LA a DHLA avviene mediante il coinvolgimento di due sistemi enzimatici: la lipoammide-deidrogenasi mitocondriale (Lip-DH), che è in grado di ridurre LA in DHLA in maniera NADH dipendente, e nelle cellule prive di mitocondri, la glutatione reduttasi citosolica e la tireodossina reduttasi, che opera mediante una reazione NADPH indipendente. La reattività chimica dell'acido lipoico risiede principalmente a livello della sua struttura ad anello, in quanto la posizione dei due atomi di zolfo crea un'elevata densità di elettroni, conferendo alla molecola specifiche proprietà, quali una forte tendenza alla riduzione, favorita dal suo basso potenziale redox (-0,32 V).

Data la sua particolare struttura molecolare, LA può andare incontro a reazioni di ossidoriduzione e fungere da trasportatore di elettroni o di gruppi acetilici (o altri acili).

In virtù delle sue proprietà antiossidanti l'LA è in grado di legare e chelare diversi ioni metallici. Studi in vitro hanno mostrato che LA lega preferenzialmente  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , e  $\text{Pb}^{2+}$ , ma non è in grado di chelare  $\text{Fe}^{3+}$ , mentre DHLA forma dei complessi con  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , e  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . Per tali caratteristiche l'LA viene utilizzato nella detossificazione di alcuni metalli pesanti quali il cadmio, piombo e mercurio (Ou P et al., 1994).

Come accennato in precedenza, LA mostra spiccate proprietà antiossidanti quali la capacità di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), e rigenerare gli antiossidanti intracellulari, quali il glutatione e l'acido ascorbico. L'acido lipoico è ampiamente utilizzato nella pratica clinica, in quanto è stato osservato che la sua somministrazione esercita un effetto benefico nel prevenire gli effetti riconducibili allo stress ossidativo. In particolare LA è utilizzato per la prevenzione e la cura dell'ischemia-riperfusion, di diversi disordini epatici, del diabete, della cataratta e di diverse patologie neurodegenerative (Coombes JS et al., 2000; Patrick L, 2000).

È però importante specificare che sebbene in diversi modelli in vivo, l'LA si è dimostrato essere in grado di esercitare un effetto protettivo sullo stress ossidativo e di ripristinare i livelli ridotti degli antiossidanti intracellulari, tuttavia diverse evidenze sperimentali indicano che tale composto può comportarsi anche da agente proossidante. Questa duplice azione, antiossidante e pro-ossidante del LA è, almeno in parte, dipendente dalle condizioni sperimentali, dalla dose, dal tempo d'esposizione al composto e dallo stato ossidativo della cellula stessa. Dati ottenuti in diversi modelli sperimentali in vitro, sostengono che l'LA e/o DHLA possano, direttamente o indirettamente, indurre alterazioni dell'equilibrio redox intracellulare, modulando diversi processi biologici, quali la proliferazione e la morte cellulare. Recentemente è stato ipotizzato che l'acido lipoico, alla stregua di altri antiossidanti naturali, sia in grado di limitare la crescita di una

massa tumorale o di inibire la proliferazione delle cellule cancerogene e, quindi, comportarsi da agente chemiopreventivo. A tale proposito, è stato osservato che il trattamento con LA esercita effetti benefici in pazienti affetti da tumore in stadio avanzato attraverso l'induzione dell'attività della glutatione perossidasi e la riduzione dello stress ossidativo (Mantovani G et al., 2003 A e B). Inoltre, l'LA è risultato essere in grado di indurre apoptosi in linee cellulari tumorali umane (colon, polmone, leucemiche, e nel nostro laboratorio su cellule d'epatocarcinoma), ma non in linee cellulari non trasformate come i neuroni e gli epatociti (Peinado J et al., 1989). Tali dati suggeriscono che l'LA eserciti effetti diversi sulle cellule tumorali rispetto alle cellule non trasformate. Quest'azione selettiva nei confronti delle cellule trasformate sostiene ulteriormente l'ipotesi secondo la quale LA è un potenziale agente chemioterapico. Per quanto riguarda il carcinoma epatocellulare (HCC), studi precedenti condotti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che l'acido lipoico induce *in vitro* apoptosi nelle linee cellulari di epatoma di ratto FaO. Da questo studio è emerso, in modo particolare, che l'LA induce apoptosi mitocondrio-mediata accompagnata dall'aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Simbula G et al., 2007). Poiché la produzione di ROS è stata spesso implicata nell'attivazione di fattori di trascrizione associati all'induzione dello stress del ER, come il GADD153/CHOP. Questi risultati hanno suggerito che l'apoptosi indotta dall'acido lipoico nella linea cellulare di epatoma di ratto FaO possa essere mediata dall'induzione dello stress del reticolo; ciò ha costituito l'oggetto in esame di questo studio.



**Scopo del lavoro**

L'antiossidante naturale acido lipoico è stato ampiamente introdotto nella pratica clinica per la prevenzione e la terapia di numerose condizioni patologiche, incluse quelle epatiche e, più di recente, in virtù delle sue proprietà farmacologiche, è stato proposto, alla stregua di altri antiossidanti, come potenziale agente antitumorale. Infatti, LA è in grado di indurre, in diverse linee cellulari tumorali incluse quelle di epatoma, ma non in cellule non-trasformate, l'alterazioni dello stato redox accompagnato da un aumento dei livelli intracellulari di ROS, il conseguente blocco del ciclo cellulare e la morte della cellula per apoptosi. E' noto che l'induzione del processo apoptotico in cellule tumorali, ma non nella controparte normale, rappresenta uno strumento efficace per l'elaborazione di strategie terapeutiche atte alla prevenzione e alla terapia dei tumori. L'apoptosi avviene secondo due modalità principali: la via estrinseca, mediata dai recettori di morte e/o la via intrinseca stress-mitocondrio mediata. Più di recente, numerose evidenze sperimentali hanno suggerito che il reticolo endoplasmatico (ER) rappresenta un altro importante check point del processo apoptotico (Szegezdi E et al., 2006) e, pertanto, viene considerato il terzo compartimento subcellulare implicato nell'esecuzione della morte cellulare per apoptosi (Rao RV et al., 2004). Al momento attuale, la relazione tra la via mitocondriale e la via mediata dal reticolo endoplasmatico non è stata ancora chiarita. Le due vie potrebbero essere attivate indipendentemente, o, alternativamente, lo stress del reticolo potrebbe essere un evento downstream o upstream coinvolto nella via mitocondrio-ROS mediata.

Considerato il recente ruolo attribuito al ER nell'induzione del processo apoptotico mediato da diversi stimoli, inclusa l'alterazione dello stato redox intracellulare, lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare l'eventuale ruolo dello stress del ER nell'apoptosi indotta da LA in cellule di epatoma di ratto FaO.

In particolare, l'obiettivo principale di questo studio è stato quello di:

- analizzare le modificazioni dell'espressione, sia a livello trascrizionale che a livello tradizionale, dei marcatori endogeni di stress del reticolo, GRP78 e GRP94 dopo trattamento con dosi crescenti di LA;
- valutare se la morte cellulare indotta da LA possa essere associata a modificazioni nell'espressione dei fattori proapoptotici GADD153/CHOP, XBP1 e JNK, i quali rappresentano i principali effettori dell'apoptosi mediata dallo stress del ER;
- stabilire se l'apoptosi indotta dal trattamento con LA possa essere associata all'attivazione o all'inibizione delle tre vie PERK, IRE1 e ATF6 che mediano

l'UPR, e quindi se lo stress del ER e l'attivazione del UPR possano contribuire all'apoptosi indotta dal trattamento con LA.

## **Materiali e Metodi**

## **Reagenti**

L'acido  $\alpha$ -lipoico (LA), la taspigargina (TG), il Neutral Red (NR), il fenilmetisulfonilfluoruro (PMSF), l'apoprotinina e il sodio ortovanadato sono stati acquistati dalla Sigma (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'acrilamide e la bis-acrilamide sono state acquistate dall'ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA).

## **Linee e colture cellulari**

La linea cellulare di epatoma di ratto FaO è stata fornita dalla Interlab Cell Line Collection (Servizio Biotecnologie, IST, Genova, Italia). Tale linea cellulare è stata mantenuta in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> contenenti 15 ml di Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM plus Glutamax I) (Invitrogen S.r.l., Milano, Italia) a cui sono stati aggiunti: 100 UI/ml di penicillina, 0.1 mg/ml di streptomina, e il 10% di siero bovino fetale (FCS) (Invitrogen S.r.l., Milano, Italia). Le cellule sono state incubate a 37° C in un'atmosfera del 5% di CO<sub>2</sub> e del 95% di O<sub>2</sub>. Tutti gli esperimenti sono stati condotti 24 ore dopo la semina. Prima del trattamento le cellule, che si trovavano in fase esponenziale di crescita, sono state lavate con PBS e il mezzo di coltura è stato sostituito con DMEM preparato fresco con l'aggiunta del 2% di FCS. L'acido lipoico e la taspigargina sono state solubilizzate rispettivamente in NaOH 1N e in dimetilsolfossido (DMSO), entrambi i composti sono stati aggiunti nel mezzo di coltura alle concentrazioni finali specificate nel testo. Le cellule di controllo sono state trattate solo con il solvente alla medesima concentrazione finale.

## **Vitalità cellulare**

La vitalità cellulare è stata determinata utilizzando il saggio del Neutral Red Uptake (NRU) in accordo con il metodo Borenfreund e Puerner (Borenfreund E, Puerner JA, 1985). In breve, le cellule sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/pozzetto in DMEM completo. Dopo 24 ore il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM fresco con l'aggiunta del 2% FCS e le cellule sono state trattate con LA e TG alle concentrazioni finali specificate nel testo. Al termine del trattamento il mezzo di coltura è stato aspirato e sostituito con 200  $\mu$ l di *NR solution* (stock solution allo 0.4% (p/v), diluita 1:80 in PBS). Le cellule sono state incubate per 60 minuti a 37°C in modo da permettere l'incorporazione del colorante nei lisosomi delle cellule vive e ancora adese alla piastra. La soluzione di NR è stata poi rimossa e le cellule sono state lavate rapidamente con una soluzione all'1% di formaldeide e all'1% di

cloruro di calcio (*Fixative solution*). Il NR incorporato dalle cellule vive è stato estratto mediante l'aggiunta una miscela all'1% di acido acetico in etanolo al 50% (*Destaining solution*). La lettura dei campioni è stata fatta con un lettore di micropiastre Perkin-Elmer (BS 1000 Spectracount, Packard) alla lunghezza d'onda di 550 nm. I valori ottenuti per le cellule trattate sono stati espressi come percentuali rispetto al valore ottenuto per le cellule di controllo. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte e sono stati effettuati in triplicato.

### **Analisi della frammentazione del DNA mediante colorazione con Hoechst 33258**

Per la colorazione con Hoechst 33258, le cellule sono state seminate in chamberslides (Lab-Tek Chamber slide/4wells, NUNC, New York, USA) in terreno completo alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule/ml/pozzetto. Il giorno successivo il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM fresco con l'aggiunta del 2% FCS e le cellule sono state trattate con LA e TG alle concentrazioni finali specificate nel testo. Al termine del trattamento, le chamberslides sono state messe su un letto di ghiaccio, le cellule sono state lavate con PBS freddo e fissate con paraformaldeide al 2% per 10 minuti, infine, disidratate mediante passaggio nella scala crescente degli alcoli (Etanolo al 70%, 90%, 100% pre-raffreddati a -20 °C).

Nel caso in cui il trattamento abbia determinato il distacco di una frazione cellulare, le cellule presenti nel terreno di coltura sono state raccolte mediante centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti, lavate in PBS e fissate in 30  $\mu$ l di Metanolo-Acido Acetico (3:1). Le cellule risospese in fissativo sono state poste su un vetrino coprioggetto e il fissativo è stato fatto evaporare all'aria. Dopo la fissazione, le cellule sono state colorate con il colorante fluorescente Hoechst 33258 alla concentrazione finale di 2  $\mu$ g/ml (soluzione stock di 10 mg/ml, Invitrogen, USA) per 10 minuti al buio.

Sucessivamente sono stati fatti 4 lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS 1X in agitazione. I vetrini, infine, vengono montati con Glicerolo al 50% in PBS.

L'indice apoptotico (AI) è stato calcolato mediante conta delle figure apoptotiche ed è stato espresso come percentuale rispetto al numero totale delle cellule contate.

I preparati così ottenuti sono stati esaminati con un microscopio a fluorescenza per l'identificazione dei nuclei che sono andati incontro a frammentazione. Le cellule sono state osservate usando il microscopio ottico Leica DM2000 a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite mediante una camera digitale (Leica DFC 420C); il software utilizzato per l'acquisizione delle immagini è un Leica application suite V3.30.

### **Estrazione RNA totale**

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule FaO dopo trattamento con LA utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). Le cellule sono state lisate in seguito all'aggiunta di 1 ml di Trizol direttamente sul monostrato (1 ml per 10 cm<sup>2</sup> di superficie). Dopo la lisi il materiale insolubile è stato rimosso attraverso centrifugazione a 12000 x g per 10 minuti a temperatura tra 2°C e 8°C, il supernatante ottenuto è stato trasferito in un tubo pulito per la successiva fase di separazione lasciando i campioni in incubazione alla temperatura di 15°-30°C per 5 minuti, successivamente sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio per ogni campione, lasciati in incubazione per 2-3 minuti a 15°-30°C, e infine, centrifugati a 12000xg per 15 minuti a temperatura tra 2° e 8° C. La fase acquosa superiore, contenente l'RNA, è stata trasferita in tubi nuovi ed è stato aggiunto 0,5 ml di alcool isopropilico, la soluzione è stata incubata a 15°C- 30°C per 10 minuti e centrifugata a 12000 xg per 10 minuti tra i 2°C- 8°C. Il pellet ottenuto contenente l'RNA è stato lavato con 2 ml di etanolo al 75% e centrifugato a 7500 xg per 5 minuti a temperatura tra 2°C-8°C e risospeso in H<sub>2</sub>O RNAsi free.

### **Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA**

L'analisi quantitativa dell'RNA estratto è stata eseguita al NanoDrop (Nanodrop, Wilmington, Delaware, USA). Un'aliquota dell'RNA sospeso è stata utilizzata per determinare la purezza e la concentrazione mediante lettura spettrofotometrica a 260 e 280 nm. A questo proposito l'assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda di assorbimento massima degli acidi nucleici) permette di valutare la concentrazione dell'RNA (1 unità= 40 ug RNA/ul), mentre il rapporto tra la lettura 260 e 280 (lunghezza d'assorbimento massima delle proteine) permette di valutare la purezza del campione; per essere considerato accettabile tale rapporto deve essere compreso tra 1,6 e 2,0.

L'integrità dell'RNA estratto è stata confermata mediante corsa elettroforetica in un gel al 1,5% di agarosio colorato con bromuro di etidio per 30 minuti. Al termine della corsa elettroforetica l'acido nucleico è stato visualizzato mediante transilluminatore a luce ultravioletta. La presenza delle 2 bande corrispondenti agli RNA ribosomiali 18S e 28S conferma la qualità dell'RNA estratto. I campioni di RNA ottenuti sono stati conservati a -20 °C fino alle successive applicazioni.

### ***RT-PCR (Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction) (per Real-Time PCR)***

L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA mediante l'utilizzo del Kit High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems).

A 2 µg di RNA sono stati aggiunti 3.2 µl di acqua sterile, 2 µl di 10X RT Random primers, 0.8 µl di dNTPs (100 mM), 2 µl di 10X RT Buffer, 1 µl della trascrittasi inversa MultiScribe Reverse Transcriptase e 1 µl di RNase Inhibitor. La soluzione è stata incubata per 10 minuti a 25°C e per due ore a 37°C. La reazione di sintesi del filamento di cDNA è stata interrotta mediante incubazione per 5 secondi a 85°C. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al successivo utilizzo.

### ***Analisi di espressione dei geni GRP78 e CHOP mediante Real-Time PCR***

La reazione di amplificazione (in un volume di 25 µl) è stata effettuata utilizzando 25 ng di cDNA ottenuto dai singoli campioni di cDNA, 12.5 µl di TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) e 1,25 µl di primers e sonde TaqMan specifici (Rn0145826\_m1 e Rn00565250\_m1) che amplificano una porzione dell'mRNA del GADD153/CHOP e del GRP78 rispettivamente su un termociclatore 7300 realTime PCR System (Applied Biosystems). I parametri utilizzati sono costituiti da uno step iniziale di attivazione di 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti, mentre i 40 cicli di amplificazione sono stati condotti a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. I campioni sono stati analizzati in triplicato ed è stato amplificato, oltre al gene target anche un gene housekeeping, la beta-actina (beta-actin Endogenous Control, Applied Biosystems) per valutare eventuali variazioni nella quantità di cDNA. Le differenze relative tra i campioni sono state valutate con il metodo  $\Delta\Delta C_t$  usando come calibratore il cDNA dell'RNA ottenuto da cellule di controllo.

### ***Analisi di GRP78 e CHOP mediante immunofluorescenza***

Per la colorazione le cellule sono state seminate in chamberslides (Lab-Tek Chamber slide/4wells, NUNC, New York, USA) in terreno completo alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule/ml/pozzetto. Il giorno successivo il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM fresco con l'aggiunta del 2% FCS e le cellule sono state trattate con LA e TG alle concentrazioni finali specificate nel testo. Al termine del trattamento, le chamberslides sono state messe su un letto di ghiaccio, le cellule sono state lavate con PBS freddo e fissate con metanolo per 5 minuti a 4°C, infine, i vetrini sono stati incubati

per 30 minuti a temperatura ambiente con PBS contenente lo 0,1% di Triton X-100 e il 5% di BSA per permeabilizzare la membrana cellulare.

Nel caso in cui il trattamento abbia determinato il distacco di una frazione cellulare le cellule presenti nel terreno di coltura vengono raccolte mediante una centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti, lavate in PBS e fissate in 30  $\mu$ l di Metanolo-Acido Acetico (3:1). Le cellule risospese in fissativo vengono poste su un vetrino coprioggetto e il fissativo viene fatto evaporare all'aria. Dopo la fissazione le cellule sono state lavate per 2 volte con PBS 1X e incubate per 1 ora a seconda dei casi con anticorpi anti-GRP78 (Abcam, Cambridge, UK) e anti-CHOP/GADD153 (Santacruz, Biotechnology Inc., CA, USA). Gli anticorpi anti-GRP78 e anti-CHOP/GADD153 sono stati diluiti in PBS contenente lo 0,1% di Triton X-100 e il 5% di BSA alle diluizioni 1:900 e 1:400 rispettivamente. Successivamente i vetrini sono stati incubati per 1 ora a 37 °C con l'anticorpo secondario (Anti-rabbit -Alexa Fluor 488, Molecular Probes per GRP78 e Anti mouse-Alexa Fluor 594, Molecular Probes per CHOP). È stato aggiunto su ogni campione il colorante fluorescente Hoechst 33258 alla concentrazione finale di 2  $\mu$ g/ml (soluzione stock di 10 mg/ml, Invitrogen, USA) per 10 minuti al buio per mettere in evidenza il nucleo. Sono stati eseguiti poi 4 lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS 1X in agitazione. I vetrini, infine, vengono montati con Glicerolo al 50% in PBS. I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio a fluorescenza. Le cellule sono state osservate usando il microscopio ottico Leica DM2000 a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite mediante una camera digitale (Leica DFC 420C); il software utilizzato per l'acquisizione delle immagini è Leica application suite V3.30.

### **Analisi dell'espressione delle proteine (Western Blot)**

La lisi cellulare è stata ottenuta mediante omogeneizzazione con il tampone di lisi RIPA buffer (1X PBS, 1% IGEPAL, 0,5% di sodio deossicolato, 0,1% SDS). Per minimizzare la degradazione proteica, sono stati aggiunti al buffer di lisi diversi inibitori di proteasi (100  $\mu$ g/ml fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF), 300  $\mu$ g/ml aprotinin e 100  $\mu$ g/ml di sodio ortovanadato). Dopo agitazione, gli estratti sono stati incubati per 30-60 minuti in ghiaccio, centrifugati a 12000xg a 4°C, successivamente è stato recuperato il surnatante. Le proteine sono state quantizzate mediante il kit Dc protein assay (BioRad laboratories, USA) secondo il metodo di Bradford utilizzando BSA come standard. Uguali quantità di proteine (50-100  $\mu$ g per lane) sono state sottoposte a separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide al 12% o all' 8%. Dopo l'elettrotrasferimento dei gels su membrane di

nitrocellulosa, le membrane e i gels sono stati colorati con Ponceau S Red in 1% acido acetico per 5 minuti e Coomassie Blu in 10% acido acetico in 30 minuti, rispettivamente per verificare che il caricamento delle proteine e il trasferimento fossero uguali per tutti i pozzetti. Prima della colorazione, i gels sono stati fissati in una soluzione di 25% isopropanolo e 10% acido acetico (v/v). Dopo un passaggio in TBS-T contenente 0.5% Tween 20 e 5% di latte magro in polvere, per un'ora a temperatura ambiente e per 12 ore a 4°C, le membrane sono state lavate in TBS-T e incubate con l'anticorpo primario specifico, diluito in blocking buffer. Le bande immunoreattive sono state identificate mediante *Chemiluminescence Detection System* (Supersignal substrate, Pierce).

### **Anticorpi**

Per l'analisi di Western Blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

- Anticorpo policlonale anti-GRP78 (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticorpo monoclonale anti-GADD153/CHOP (Santacruz, Biotechnology Inc., CA, USA)
- Anticorpo anti-GRP94 (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticorpo monoclonale anti-actina (clone AC-40) (Sigma Chemicals, St. Louis, CA, USA)
- Anticorpo monoclonale anti-phospho eIF2 $\alpha$  (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticorpo anti-ATF6 (riconosce sia la forma full length che cleaved) (Imgenex, San Diego, CA, USA)
- Anticorpo monoclonale anti-calnexina (Sigma Chemicals, St. Louis, CA, USA)

### **Analisi dello splicing dell'XBP1**

#### **Trascrizione inversa (Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction-RT-PCR)**

Mediante questa tecnica un campione di mRNA viene retrotrascritto a cDNA, che sarà poi utilizzato come stampo per una classica reazione di amplificazione (PCR); per questo, le due procedure unificate sono denominate RT-PCR (PCR retrotrascrizionale). Come stampo per la sintesi del cDNA è stato utilizzato 1,5 ug di RNA totale. A questo è stato aggiunto il *buffer* per la trascrittasi inversa definito Master mix, i cui componenti sono stati schematizzati nella tabella sottostante.

Componenti	Volume di reazione (ul)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2.0
Inibitori dell'RNasi	1.0
Trascrittasi inversa	1.0
H <sub>2</sub> O priva di nucleasi	3.2

La retrotrascrizione è avvenuta seguendo le seguenti condizioni:

	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
<b>Temperatura (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Tempo</b>	10 min	120 min.	5 sec.	∞

Il cDNA ottenuto dalle varie reazioni di retrotrascrizione dell'RNA totale estratto dalle cellule, è stato amplificato mediante PCR.

Per l'amplificazione sono stati usati primers senso e antisenso disegnati in base alla sequenza dell' mRNA da utilizzare, per fare questo è stato utilizzato il programma Primer 3, disponibile nel web.

Le sequenze dei *primer* utilizzate erano le seguenti:

Reverse: 5'-CCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'

Forward: 5-'AAACAGAGTAGCAGCACAGACTGC-3'

1,5 ul di cDNA sono stati amplificati utilizzando una DNA polimerasi, *Thermus aquaticus* polimerase (Taq) in 10X PCR Buffer in un volume finale di reazione di 25 ul che conteneva inoltre i seguenti componenti: MgSO<sub>4</sub> (mM), dNTP (uM), Primers.

Le reazioni di RT-PCR sono state condotte in un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) secondo le seguenti condizioni: la Taq DNA polimerasi veniva attivata a 95°C per 2 min, seguivano 40 cicli di reazione, con ogni ciclo che prevedeva una fase di 30 sec di denaturazione, seguita da 30 secondi a 95°C seguita da 30 sec. A 58 °C per l'appaiamento dei primers utilizzati e per finire la fase di estensione a 72 °C per altri 35 sec. Per ciascuna PCR è stato allestito un controllo negativo, costituito da, 10 ml di Master Mix e 10 ul di H<sub>2</sub>O.

Per analizzare la presenza dei frammenti che rappresentano la forma spliced e unspliced di XBP1 (398 bp e 424 bp, rispettivamente) al termine della reazione 25  $\mu$ l di prodotto di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3% in 150 ml di tampone TAE, addizionato con 2  $\mu$ l di una soluzione di bromuro di etidio. Successivamente gli amplificati sono stati visualizzati mediante un trasluminatore a luce.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata eseguita utilizzando il software Instant Prism (GraphPad5, San Diego, California) in particolare è stata fatta l'analisi della varianza mediante *One-way analysis of variance* (ANOVA) e la *post hoc analysis* utilizzando la comparazione multipla di Tukey. I risultati presentati sono la media  $\pm$  SE di almeno tre esperimenti separati. Il valore  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

### **Analisi densitometrica:**

L'analisi densitometrica delle immagini di fluorescenza e delle lastre ottenute dal Western blot è stata effettuata utilizzando il programma *ImageJ* (JAVA, Wayne Rasband, National Institute of Health).

## **Risultati e discussione**

### **Effetto dell'acido lipoico (LA) e di un noto induttore dello stress del reticolo, la taspigargina (TG) sulla vitalità delle cellule di epatoma di FaO**

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio, hanno mostrato che il trattamento giornaliero con dosi crescenti di LA induce, nella linea cellulare di epatoma di ratto FaO, l'apoptosi mitocondrio-mediata accompagnata dall'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Simbula G et al., 2007). Poichè la produzione di ROS è stata spesso implicata nell'attivazione di fattori di trascrizione associati allo stress del ER, quale il fattore pro-apoptotico GADD153/CHOP, questi risultati preliminari hanno suggerito che l'induzione dello stress del reticolo potesse giocare un ruolo critico nel processo apoptotico indotto da acido lipoico. Pertanto, i primi esperimenti sono stati condotti al fine di valutare se le cellule di epatoma fossero suscettibili all'induzione dello stress del reticolo e alla morte cellulare ER stress mediata. A tale scopo, le cellule di epatoma di ratto FaO, sono state trattate con un noto induttore di stress del reticolo, la taspigargina (TG), che rappresenta in questo studio il nostro controllo positivo o giornalmente con dosi crescenti di LA. L'effetto dei due composti sulla vitalità cellulare è stato valutato mediante il saggio del NRU. I dati ottenuti hanno mostrato che il trattamento con la TG (Fig.10D) ha indotto, in maniera dose-dipendente, una significativa perdita di vitalità delle cellule FaO dopo 24 ore di trattamento. Tali risultati suggeriscono che le cellule FaO sono suscettibili allo stress del reticolo. In accordo con quanto ottenuto in precedenza nel nostro laboratorio, il trattamento giornaliero con concentrazioni crescenti di LA è risultato determinare una diminuzione della vitalità in maniera dose- e tempo-dipendente, con un effetto massimo osservato a partire dalla dose 100 µM e dopo 72 ore di trattamento. Gli esperimenti successivi sono stati condotti trattando in parallelo le cellule FaO con LA e con l'induttore dello stress del reticolo TG.

### **Analisi della morfologia nucleare nelle cellule FaO dopo trattamento con LA e TG**

Per valutare nel tempo l'induzione del processo apoptotico in seguito a trattamento con la TG e LA, è stata eseguita la colorazione con il colorante nucleare fluorescente Hoechst 33258. Tale colorazione consente di visualizzare le eventuali modificazioni nucleari associate all'apoptosi, le quali sono state analizzate al microscopio in fluorescenza. A tale scopo, le cellule FaO sono state trattate con dosi crescenti di LA (100, 250 e 500 µM) per 24, 48 e 72 ore, o con la TG alle concentrazioni di 0.5, 1.25 e 2.5 µM per 24 ore. La colorazione Hoechst è stata effettuata sia sulle cellule adese al vetrino che sulla frazione cellulare staccata in seguito al trattamento con le due sostanze. Dopo 24 ore di

trattamento con LA, l'esame al microscopio (Fig.11), ha evidenziato che i nuclei delle cellule adese mostravano una morfologia regolare e una densità omogenea, comparabile a quella osservata nelle cellule di controllo, a tutte le dosi esaminate. Al contrario dopo 48 e 72 ore di trattamento con LA a tutte le dosi testate. Nelle cellule adese al vetrino, si è osservata una significativa diminuzione della densità cellulare associata a cambiamenti morfologici caratteristici delle cellule apoptotiche, quali la frammentazione nucleare, la diminuzione delle dimensioni cellulari e la presenza di numerosi corpi apoptotici. Per quanto riguarda le cellule della frazione cellulare staccata, queste dopo trattamento con LA hanno mostrato tutte una morfologia di tipo apoptotico a tutti i tempi analizzati e con tutte le dosi di LA utilizzate. Come atteso, dopo trattamento con la TG (Fig.12A), si è osservata una significativa diminuzione della densità cellulare e la presenza di un elevato numero di cellule apoptotiche, sia nella frazione cellulare adesa al vetrino sia in quella staccata alle concentrazioni 2.5 e 1.25 uM, mentre tale effetto è apparso essere meno drammatico nelle cellule trattate con la concentrazione 0.5 uM. Al fine di quantificare la percentuale di apoptosi in seguito al trattamento con LA o TG, abbiamo calcolato l'indice apoptotico (AI). In accordo con quanto osservato all'esame microscopico (Fig.11B e Fig.12B), il trattamento delle cellule FaO con LA o TG determina un aumento significativo dell'indice apoptotico in maniera dose-dipendente.

Sulla base dei dati ottenuti, gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando la concentrazione 0.5 uM di TG e 100, 250 e 500 uM di LA, concentrazioni in cui la percentuale di cellule in apoptosi è risultato essere compresa tra il 20-50%, in maniera che gli eventi precoci correlati all'eventuale induzione dello stress del reticolo non venissero mascherati dagli elevati livelli di morte cellulare.

### **Variazioni dell'espressione genica del marker di stress del reticolo GRP78 in seguito al trattamento con LA**

Per valutare il possibile coinvolgimento dello *stress del reticolo* nell'apoptosi indotta da LA abbiamo analizzato nel tempo, mediante Real Time PCR, l'eventuale modificazione dei livelli di espressione genica di un marcatore bioendogeno dello stress del ER GRP78/BiP, appartenente alla famiglia delle *Glucose Regulated Proteins*. Il trattamento con LA ha determinato, come mostrato in Fig.13, un aumento tempo dipendente dell'espressione del mRNA messaggero per il GRP78/Bip. In particolare, il trattamento con le dosi di LA 500 e 250 uM ha determinato un significativo aumento dei livelli di espressione del messaggero per GRP78/Bip dopo 24 e 48 ore di trattamento

rispettivamente, mentre dopo 72 ore di trattamento si osserva una downregulation della trascrizione del GRP78 in presenza di entrambe le concentrazioni testate. Il trattamento con la dose 100 uM non ha determinato alcuna modificazione nella trascrizione di GRP78 a nessuno dei tempi esaminati, in quanto i livelli di espressione genica osservati in presenza di questa concentrazione sono comparabili con quelli osservati nelle cellule di controllo (valori basali). La diminuzione della trascrizione del GRP78 dopo 72 ore di trattamento con LA, osservata in presenza delle concentrazioni 250 e 500 uM, è in accordo con i dati ottenuti sulla vitalità cellulare. Infatti, dopo 72 ore di trattamento si è osservata una forte diminuzione della vitalità cellulare, la quale, come dimostrato nel nostro precedente studio, è associata all'attivazione della fase esecutrice del processo apoptotico mitocondrio-mediato. Tali dati preliminari suggeriscono che l'aumento della trascrizione del GRP78 indotta dopo trattamento con dosi elevate di LA possa essere associata all'induzione dello stress del reticolo e precedere gli eventi che caratterizzano la fase esecutrice del processo apoptotico indotto in seguito a trattamento con LA. Di contro, i risultati ottenuti in seguito al trattamento con la dose di LA 100 uM indicano che il processo apoptotico osservato nelle cellule FaO in presenza di questa dose, non sia preceduto dall'induzione dello stress del reticolo.

### **Analisi dell'espressione della proteina GRP78 nelle cellule FaO in seguito al trattamento con LA**

Al fine di confermare il coinvolgimento dello stress del reticolo e dell'attivazione dell'UPR nell'apoptosi indotta dal trattamento con LA, nelle cellule trattate con dosi crescenti di LA (100-500 uM) a diversi tempi sperimentali, precedentemente descritti, è stata valutata la cinetica di espressione della proteina GRP78/BiP mediante analisi di Western Blot, e la sua distribuzione subcellulare, mediante immunofluorescenza utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro GRP78/BiP. Per identificare l'esatta localizzazione subcellulare del GRP78, i nuclei delle cellule sono stati evidenziati mediante colorazione con il colorante nucleare fluorescente Hoechst 33258.

Come controllo positivo anche in questo caso abbiamo utilizzato cellule trattate con la TG alle concentrazioni di 0.5, 1.25 e 2.5 uM per 24 ore. In accordo con i dati della letteratura, l'esame al microscopio ha mostrato, che la proteina GRP78 nelle cellule di controllo aveva una distribuzione reticolare, con localizzazione nella regione perinucleare.

In seguito a 24 ore di trattamento con la TG, come atteso, abbiamo osservato un significativo aumento dose-dipendente del segnale di fluorescenza, già a partire dalla dose 0,5 uM.

Dopo trattamento con LA, si è osservato un aumento dose-dipendente dell'intensità della fluorescenza per GRP78, la quale è apparsa in forma di inclusioni granulari ed è risultata essere maggiormente concentrata a livello del ER. Questi dati sono stati confermati dall'analisi densitometrica. In particolare, come mostrato nel grafico in Fig.17B, in accordo quanto osservato dall'analisi dell'espressione genica, l'intensità della fluorescenza rilevata nelle cellule trattate con LA 100 uM tendeva ad essere molto simile a quella delle cellule di controllo, di contro mentre il trattamento con LA 250 e 500 uM determina un aumento dell'intensità della fluorescenza a partire dalle 24 ore, a livelli che si sono mantenuti stabili fino alle 72 ore nelle cellule trattate con LA 250 uM, mentre sono diminuiti in presenza di LA 500 uM.

Successivamente le modificazioni dell'espressione di GRP78 a livello traduzionale sono state valutate mediante analisi di Western Blot dopo trattamento con la dose più elevata di LA (500 uM). In parallelo, sono stati determinati i livelli di espressione di un'altra proteina chaperon, la *glucose regulated protein 94* (GRP94), la quale forma complessi con il GRP78 e altri chaperons molecolari del reticolo, andando a costituire un complesso network che svolge un ruolo critico nella processazione dei substrati delle proteine malripiegate. Come mostrato in Fig.18 il trattamento delle cellule FaO con LA 500 uM ha indotto un aumento significativo dei livelli di espressione di GRP78 e di GRP94, a partire dalle 24 e 30 ore di trattamento, rispettivamente; tali livelli di espressione si sono mantenuti pressoché stabili fino alle 48 ore. Tali risultati confermano che l'apoptosi indotta in seguito al trattamento con dosi elevate di acido lipoico è preceduta dallo stress del reticolo e dall'attivazione dell'UPR.

### **Variazioni nell'espressione genica di CHOP in seguito al trattamento con LA**

In seguito all'induzione dello stress del reticolo, qualora l'attivazione dell'UPR non sia in grado di ristabilire l'omeostasi e favorire la sopravvivenza cellulare, si ha l'attivazione della via apoptotica. Numerose evidenze sperimentali sostengono il ruolo critico svolto dal CHOP/GADD153 durante il processo apoptotico mediato dallo stress del reticolo. Normalmente il CHOP risulta essere non espresso o poco espresso nelle cellule proliferanti, ma in seguito a stimoli stressogeni di diversa natura, esso viene attivato trascrizionalmente e traduzionalmente; tale processo precede la morte cellulare per

apoptosi. Pertanto, inizialmente abbiamo analizzato le modificazioni dell'espressione del gene che codifica per il fattore di trascrizione CHOP/ GADD153 mediante Real Time PCR. Come mostrato nel grafico in Fig.19, i livelli di espressione dell'mRNA di CHOP sono risultati aumentati in maniera dose dipendente dopo trattamento con LA. In particolare, la trascrizione del gene CHOP non è apparsa essere modificata dopo trattamento con LA 100 uM, ma è aumentata dopo 48 ore di trattamento con LA 250 uM, livelli che si sono mantenuti stabili fino alle 72 ore, e 24 ore dopo il trattamento con LA 500 uM; a questa ultima dose si è raggiunto un picco massimo di espressione alle 48 ore, con ritorno ai livelli basali dopo 72 ore.

### **Variatione dell'espressione della proteina CHOP e della proteina target GADD34 in seguito al trattamento con LA**

Al fine di caratterizzare ulteriormente il ruolo del CHOP nell'apoptosi indotta da LA, abbiamo inizialmente analizzato la localizzazione proteica a livello subcellulare, mediante immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro il CHOP, e successivamente, abbiamo misurato i livelli di espressione della proteina CHOP e del suo gene target GADD34, mediante Western Blot. Per determinare la localizzazione cellulare del CHOP, le cellule FaO sono state trattate con LA, alle concentrazioni di 100, 250 e 500 uM, per 18, 24, e 48 ore, o con la TG alle concentrazioni di 0.5, 1.25 e 2.5 uM, per 24 ore. Come atteso, il trattamento con TG (Fig.12) ha determinato l'aumento dell'espressione di CHOP a livello citoplasmatico e la sua traslocazione nucleare in maniera dose dipendente.

Al contrario CHOP è risultato essere debolmente espresso nelle cellule di controllo e in quelle trattate con LA 100 uM, mentre, in presenza delle dosi di LA 250 e 500 uM, si è osservato un significativo aumento della fluorescenza a livello nucleare. L'analisi densitometrica ha mostrato che il trattamento con LA alla dose 500 uM è risultato essere il più efficace nell'indurre l'aumento dell'espressione della proteina proapoptotica CHOP. Sulla base di questo dato abbiamo analizzato la cinetica di espressione della proteina CHOP e del suo target GADD34, mediante analisi di Western Blot, dopo trattamento con LA 500 uM. A tal fine le cellule FaO sono state trattate per 6, 18, 24, 30, 42 e 48 ore, con LA 500 uM o per 24 ore con TG, alla concentrazione 0.5 uM. Come si può osservare in Fig.24 il CHOP non è risultato essere espresso nelle cellule di controllo, mentre le cellule trattate con TG hanno mostrato elevati livelli di espressione anche in assenza di una significativa perdita di vitalità. Dopo trattamento con LA 500 uM, il

CHOP è risultato essere progressivamente espresso a partire dalle 24 ore, con livelli di espressione che si sono mantenuti elevati fino alle 48 ore. Tale aumento dei livelli di espressione di CHOP, precede la perdita di vitalità e l'induzione dell'apoptosi come indicato dai dati ottenuti con il saggio NRU e la colorazione Hoechst.

Al fine di appurare se l'aumento del CHOP fosse associato a un aumento della sua attività, sono state valutate l'eventuali modificazioni dell'espressione della sua proteina target GADD34, la quale induce la defosforilazione di eIF2 $\alpha$  inibendola e determinando così la soppressione del blocco traduzionale indotto da eIF2 $\alpha$  che favorisce l'induzione del processo apoptotico mediato dallo stress del reticolo.

I dati ottenuti, come mostrato in Fig.24, hanno evidenziato che nelle nostre condizioni, sperimentali, si è avuto un aumento progressivo dei livelli di espressione del GADD34, a partire dalle 6 fino alle 48 ore dopo trattamento con LA 500  $\mu$ M; l'espressione di GADD34 è risultata, quindi, precedere e accompagnare l'aumento dell'espressione della proteina proapoptotica CHOP. E' noto dalla letteratura che il GADD34 può essere indotto anche in seguito a danno al DNA. A questo proposito, in un nostro studio precedente abbiamo dimostrato che il trattamento con LA induce nelle cellule FaO un'alterazione del bilancio redox accompagnato dall'aumento intracellulare dei livelli delle ROS, le quali potrebbero essere responsabili dell'induzione del danno al DNA e dell'attivazione precoce del GADD34.

I risultati finora ottenuti suggeriscono che lo stress del reticolo e l'induzione del fattore proapoptotico CHOP svolgano un ruolo critico nel processo apoptotico indotto nelle cellule di epatoma FaO dopo trattamento con LA e che questi eventi precedano l'attivazione della via apoptotica mediata dal mitocondrio.

Al fine di caratterizzare il coinvolgimento dello stress del reticolo nel processo apoptotico mediato dall'LA, successivamente abbiamo voluto analizzare l'eventuale contributo delle vie di attivazione dell'UPR mediate dai tre sensori dello stress PERK, IRE1, e ATF6.

### **Attivazione della pathway PERK–eIF2 $\alpha$ dopo trattamento con LA**

In seguito a stress del reticolo, PERK si dissocia dal GRP78 e si attiva mediante autofosforilazione. Il PERK attivo fosforila l'eIF-2 $\alpha$  a livello del residuo di serina 51, l'eIF2 $\alpha$  fosforilato a sua volta, induce un'inibizione transitoria della sintesi proteica, in modo da ridurre il danno cellulare e l'apporto di proteine mal ripiegate nel RE, favorendo, così, il ripristino della sua omeostasi. Quando però lo stress del reticolo è eccessivo, il PERK può indurre la morte cellulare per apoptosi.

Per valutare l'eventuale l'attivazione di questa via in seguito al trattamento delle cellule di epatoma FaO con LA 500 uM abbiamo analizzato l'espressione della proteina fosforilata eIF2 $\alpha$ , che rappresenta il diretto substrato intracellulare di PERK, a partire dalle 6 ore fino alle 48 ore di trattamento.

Cellule trattate con il noto induttore di stress del reticolo TG 0.5 uM per 24 ore, sono state utilizzate come controllo positivo. Come mostrato in Fig.23 il trattamento con LA 500 uM ha indotto un aumento precoce e transitorio dei livelli di espressione della proteina eIF2 $\alpha$  dopo 6 ore di trattamento; successivamente, i livelli di questa proteina sono diminuiti progressivamente fino alle 30 ore, per poi aumentare significativamente alle 42 ore, e raggiungere un picco massimo di espressione alla 48 ore. L'iniziale aumento di espressione dell'eIF2 $\alpha$  potrebbe essere attribuito al tentativo, da parte delle cellule, di contrastare l'effetto dello stress del reticolo, mentre la successiva diminuzione dei livelli di questa proteina potrebbe essere associato al conseguente ripristino della sintesi proteica che favorirebbe, invece, la trascrizione di proteine proapoptotiche, quali CHOP, coinvolte nel processo apoptotico mediato dal ER.

Sebbene generalmente la via del PERK medi segnali antiapoptotici, i dati ottenuti suggeriscono che nelle nostre condizioni sperimentali la via del PERK contribuisca almeno parzialmente all'attivazione del processo apoptotico mediato dallo stress del ER.

### **Attivazione della pathway IRE1–XBP1 e JNK dopo trattamento con LA**

Alla stregua degli altri sensori dello stress, IRE1 inizialmente media segnali di sopravvivenza atti a ripristinare le normali funzioni del RE, ma in presenza di stress del reticolo prolungato è in grado anche di indurre apoptosi, mediante l'attivazione della chinasi JNK. Al fine di valutare l'eventuale attivazione e modificazioni dell'espressione proteica di IRE1, è stata effettuata l'analisi di Western blot nelle cellule FaO dopo il trattamento con LA alla concentrazione 500 uM per 6, 18, 24, 30, 42 e 48 ore. I dati ottenuti hanno mostrato che il trattamento con LA ha indotto un'aumento progressivo

dell'espressione della forma fosforilata attiva, della proteina IRE1 a partire dalle 24; ore, come atteso IRE1 fosforilato è risultato essere espresso anche nelle cellule trattate con la TG 0,5 uM per 24 ore. È noto che l'attivazione dell'IRE1 catalizza la rimozione di 26 nucleotidi intronici dall'mRNA di XBP1. Sebbene la proteina sXBP1 è nota agire come fattore di trascrizione in grado di indurre l'espressione di geni, che potenziano l'UPR, il folding e la degradazione proteica, più di recente, è stato suggerito che essa possa contribuire anche all'induzione del processo apoptotico (Yokouchi M et al., 2007)

Per valutare il possibile coinvolgimento della pathway IRE1-XBP1 nell'apoptosi indotta dal LA dalle cellule FaO trattate con LA 500 uM o con TG 0.5 uM è stato estratto l'RNA totale ed analizzato lo splicing del trascritto di XBP1 mediante la tecnica semiquantitativa RT-PCR (reverse-PCR).

Come mostrato in Fig.27A, nelle cellule FaO di controllo è stata evidenziata solo la forma "unspliced" di XBP1, visualizzabile sotto forma di un'unica banda di 442 bp. Il trattamento con LA ha indotto un progressivo aumento dello splicing di XBP1, a partire dalle 30 ore di trattamento fino alle 48 ore, tempo in cui, oltre alla banda di 442 bp, è stato possibile osservare una seconda banda di 416 bp che corrisponde alla forma "spliced" del trascritto. Nelle cellule FaO trattate con TG, come previsto risulta essere presente la forma spliced dell'mRNA di XBP1. In presenza di ER stress IRE1 è inizialmente coinvolto nel ripristino della sopravvivenza cellulare, ma, in condizioni di stress persistente, può indurre apoptosi attraverso l'induzione del fattore di trascrizione XBP1, e l'attivazione della chinasi JNK, che influenza il macchinario di morte apoptotico attraverso la regolazione delle proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2. Alla luce di ciò, per valutare il coinvolgimento della pathway proapoptotica IRE1-JNK nell'apoptosi indotta dal trattamento con LA, abbiamo analizzato l'espressione della chinasi JNK a livello traduzionale. Come mostrato in Fig.27B. la forma attiva fosforilata di JNK è osservata a partire dalle 24 ore dopo trattamento con LA, raggiungendo un picco massimo di espressione alle 42 ore.

Riassumendo, questi dati sembrano suggerire che LA sia in grado di indurre lo stress del RE attraverso l'attivazione della via IRE1-XBP1-JNK.

### **Attivazione della pathway ATF6 mediata da LA**

Una volta dimostrato il coinvolgimento delle vie mediate dai sensori PERK e IRE1 nell'apoptosi indotta da LA, abbiamo valutato se il trattamento con LA 500 uM fosse in grado di indurre anche l'attivazione del terzo sensore della UPR, il fattore di trascrizione ATF6.

Il sensore ATF6 è una glicoproteina di 90 kDa, definita p90ATF6, che risulta ancorata alla membrana del RE mediante un singolo dominio transmembrana. In seguito a stress del RE, ATF6 si dissocia dalla proteina chaperon GRP78 e viene traslocato mediante trasporto vescicolare a livello dell'apparato del Golgi dove viene attivato mediante un processo proteolitico definito RIP (**R**egulated **I**ntramembrane **P**roteolysis).

Questo taglio proteolitico determina il rilascio di un frammento N-terminale di 50 kDa, trascrizionalmente attivo definito p50ATF6, che trasloca nel nucleo dove induce la trascrizione di geni che favoriscono la sopravvivenza cellulare quali quelli codificanti per le chaperons GRP78 e GRP94, calnexina, calreticulina e XBP1.

Abbiamo, quindi, valutato se il trattamento con LA fosse in grado di indurre la conversione di ATF6 nella sua forma attiva p50ATF6 mediante analisi di western blot della proteina p50ATF6 nelle cellule FaO trattate con LA 500 uM per 6, 18, 24, 30, 42, 48 ore, o TG 0.5 uM per 24 ore. Come si può osservare nella Fig.28, p50ATF6 risulta espressa nelle cellule di controllo FaO dove presumibilmente favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali. Al contrario nelle cellule trattate con LA 500 uM si è osservata una diminuzione significativa della forma attiva del sensore, che è risultata essere completamente downregolata alle 48 ore dal trattamento. Questi dati, dimostrano che dopo trattamento con LA si ha un'inibizione della sopravvivenza cellulare mediata da ATF6.

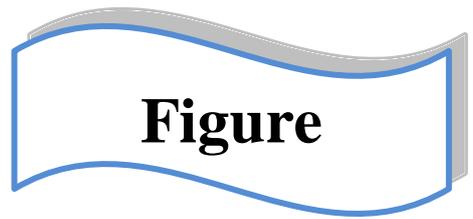
## **Conclusioni**

In conclusione, nel presente lavoro è stato dimostrato per la prima volta che l'apoptosi indotta da LA in cellule di epatoma di ratto FaO è mediata, almeno in parte, dallo stress del reticolo. La nostra ipotesi è stata illustrata schematicamente nella Fig.29. Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno indicato che LA induce l'apoptosi attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'induzione della via intrinseca mitocondriale e l'attivazione della cascata caspatica (Simbula et al, 2007). Pertanto nelle cellule di epatoma di ratto FaO, i mitocondri sono stati identificati come il bersaglio critico dell'LA. I risultati ottenuti in questo studio hanno permesso di caratterizzare meglio l'apoptosi indotta da LA nelle cellule di epatoma, identificando il coinvolgimento dello stress del ER nel processo.

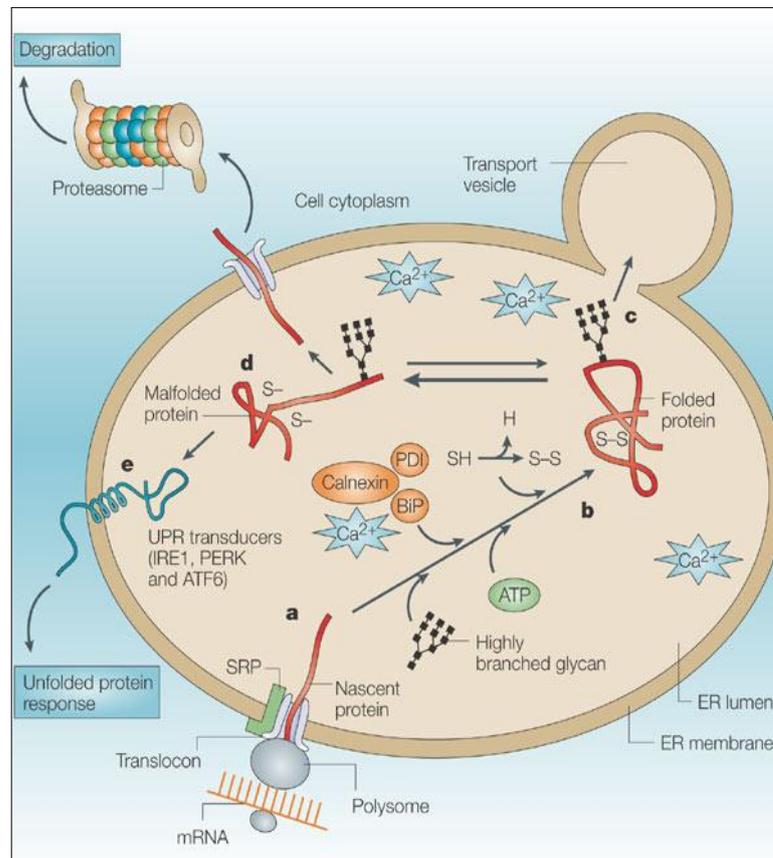
In particolare, in questo studio abbiamo osservato che dopo trattamento con LA, la perdita di vitalità delle cellule FaO è accompagnata dai seguenti eventi:

- Attivazione dello stress del reticolo, come indicato dall'aumento dell'espressione a livello trascrizionale e traduzionale del marcatore bioendogeno GRP78
- Aumento precoce dell'espressione del fattore proapoptotico GADD153/CHOP e sua traslocazione a livello nucleare
- Attivazione della via proapoptotica IRE1, in seguito all'induzione dello splicing del mRNA di XBP1, e del JNK
- Downregulation della via di sopravvivenza mediata dal fattore di trascrizione ATF6
- Parziale inibizione del blocco traduzionale mediato dall'eIF2 $\alpha$

Sebbene ulteriori studi sono necessari al fine chiarire le relazioni tra stress ossidativo, mitocondri e stress del ER durante l'apoptosi indotta da LA, è interessante notare che lo stress del reticolo venga indotto da diversi composti antiossidanti naturali e di sintesi, nelle cellule di epatoma, e pertanto ne suggerisce un loro potenziale utilizzo per l'elaborazione di nuove strategie terapeutiche per la cura e la prevenzione del tumore epatico.

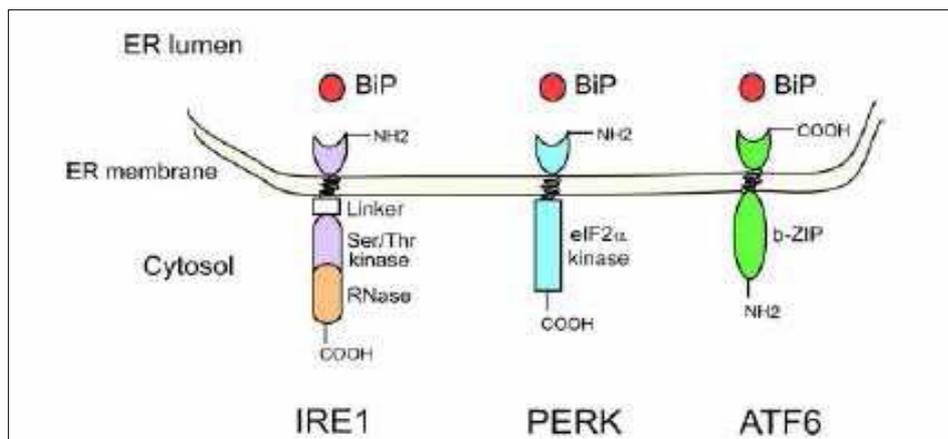


**Figure**



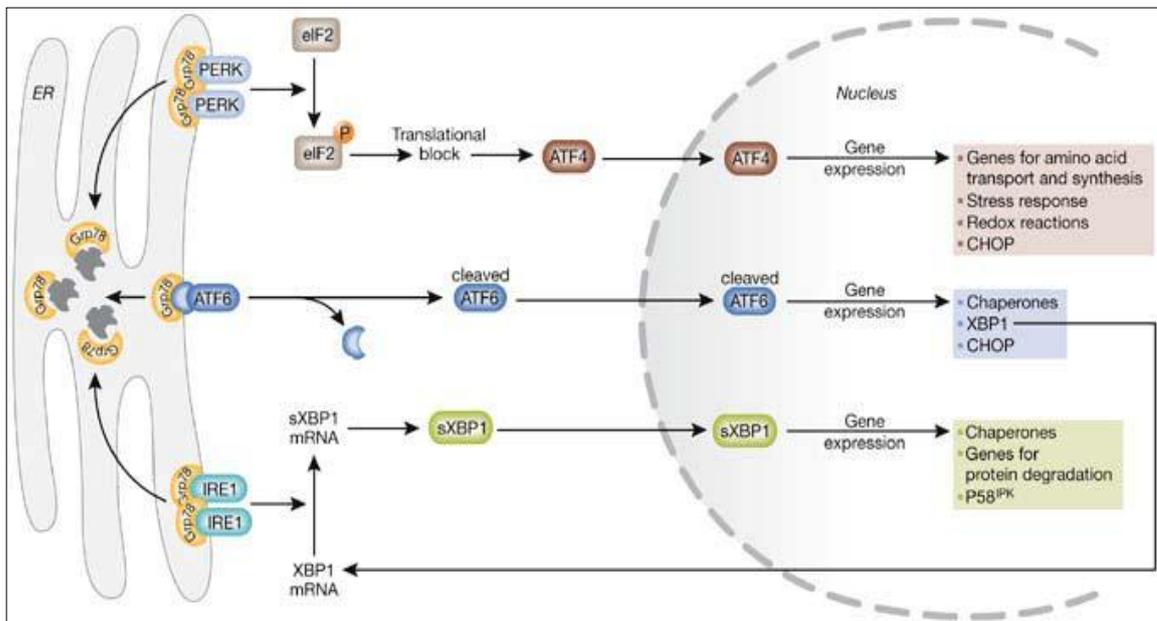
**Struttura del reticolo endoplasmatico.** (a) Le proteine della via secretoria raggiungono il lume del reticolo endoplasmatico attraverso canali localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico. (b,c) “Chaperones” come GRP78, la calnexina e l’isomerasi PDI (protein disulphide isomerase) assistono il corretto ripiegamento delle proteine nascenti, che successivamente lasceranno il reticolo endoplasmatico raggiungendo le destinazioni finali. (d) Le proteine non correttamente ripiegate o modificate sono degradate dal proteosoma. (e) Cambiamenti delle normali condizioni all’interno del reticolo endoplasmatico originano la risposta allo stress del reticolo endoplasmatico attraverso l’attivazione dei tre principali sensori di “stress”: IRE1, PERK ed ATF6 (Ma Y, Hendershot LM, 2004).

**Fig.1**



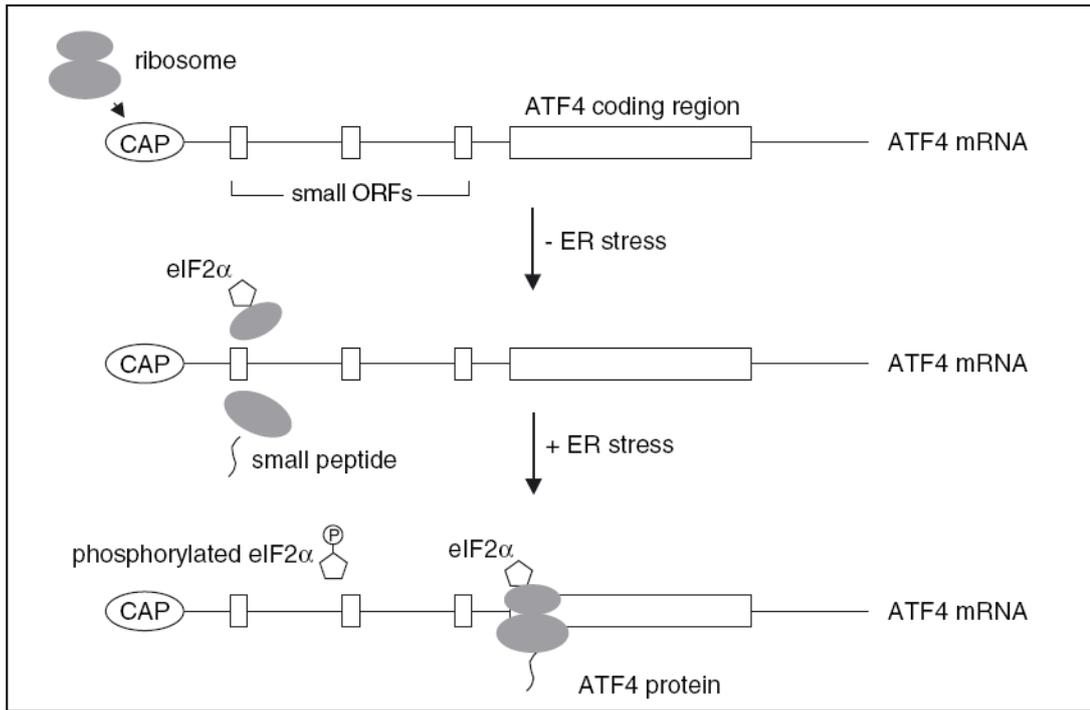
**Legame di Bip (GRP78) ai tre sensori transmembrana IRE1, PERK e ATF6.** Legando le regioni delle tre proteine all'interno del lume del reticolo la proteina GRP78 mantiene i sensori si stress legati alla membrana in forma inattiva (Zhang K, Kaufman RJ, 2004).

**Fig.2**



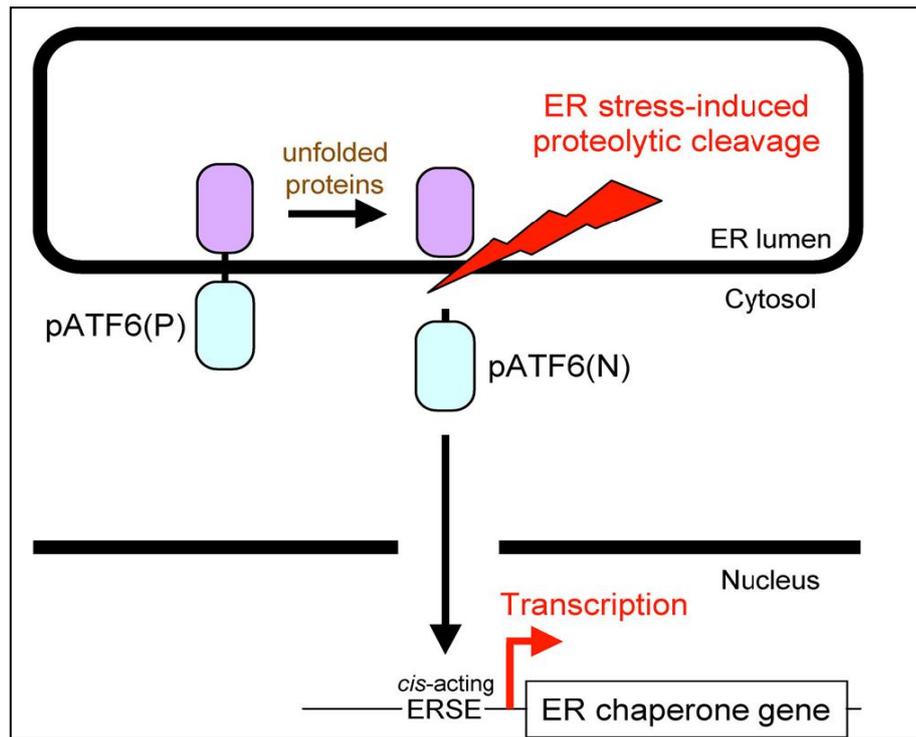
**La risposta allo stress mediata dal reticolo endoplasmatico (ER).** La proteina GRP78 si dissocia dai tre recettori di stress (ATF6, PERK ed IRE1) attivandoli. PERK è il primo a essere attivato seguito da ATF6, mentre IRE1 è attivato solo successivamente. ATF4 e ATF6 mediano inoltre la trascrizione di CHOP, mentre IRE1 taglia XBP1 (sXBP1) che trasloca nel nucleo attivando la trascrizione di “chaperones” e di P58IPK con la finalità di recuperare la funzionalità del reticolo endoplasmatico (Szegezdi E et al., 2006).

**Fig.3**



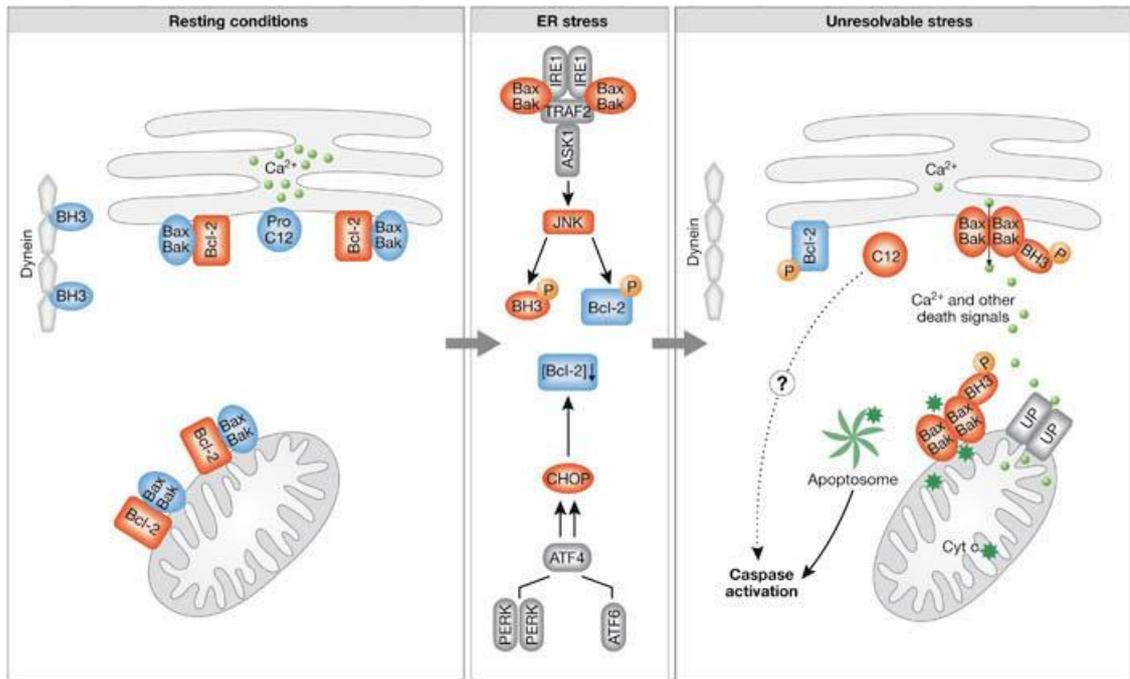
**Regolazione dell'espressione di ATF4 (Yoshida H, 2006).**

**Fig.4**



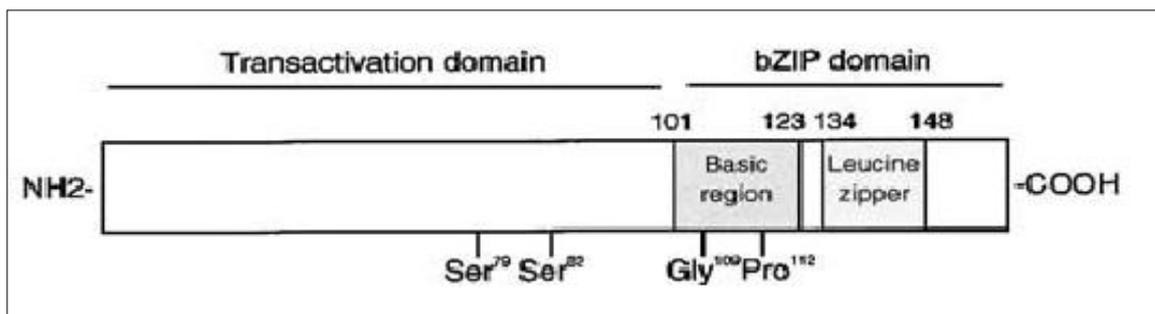
**Modello dell'attivazione di ATF6 in seguito a Stress del ER (Mori K, 2010).**

**Fig.5**



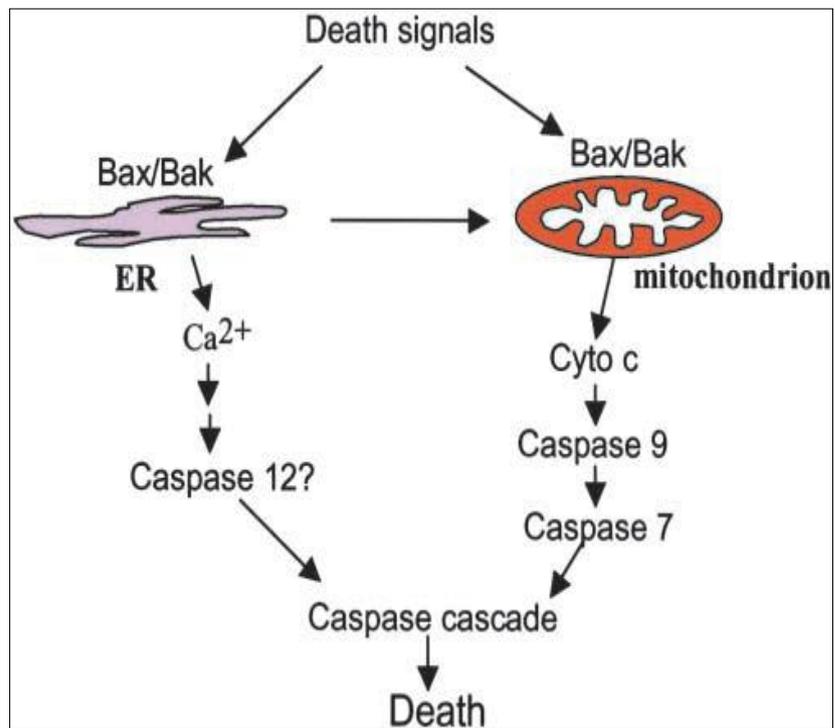
**La famiglia proteica Bcl-2 in condizioni normali e di stress cellulare.** In condizioni normali le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak sono mantenute inattive attraverso l'interazione con Bcl-2 sia nel reticolo endoplasmatico sia nel mitocondrio. Bim (BH3) è inibita dal legame alla dineina citosolica. Condizioni di stress attivano invece la chinasi N-terminale di c-Jun (JNK) e GADD153 (CHOP). JNK fosforila Bcl-2 che così modificata non è più in grado di sequestrare ed inattivare le proteine proapoptotiche (Szegezdi E et al., 2006).

**Fig.6**



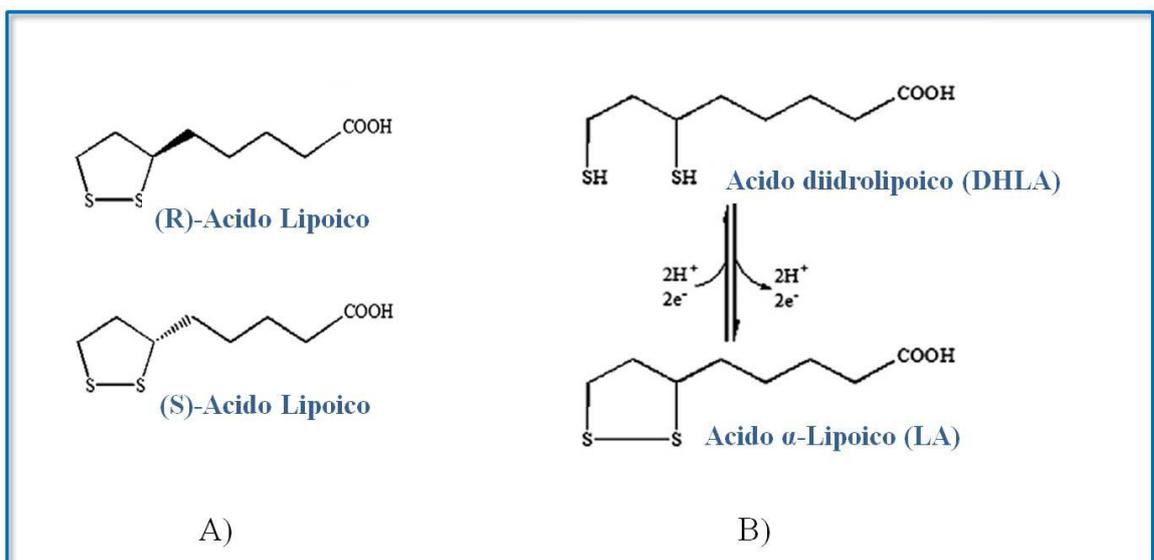
**Struttura dei domini di CHOP.** CHOP è costituito da due domini funzionali, un dominio di attivazione trascrizionale N-terminale e un dominio basico C-terminale di legame al DNA (Basic-Leucine Zipper, Bzip). Nella regione basica sono localizzati due residui conservati di glicina (109) e prolina (112) essenziali per il legame con le sequenze CRE (Cyclic AMP Responsive Elements), invece i residui di serina (79 e 82) presenti nel dominio di transattivazione vengono fosforilati dalla MAP chinasi p38; questa fosforilazione è necessaria per l'aumento della attività trascrizionale (Ron D, Habener JF, 1992).

**Fig.7**



**Morte cellulare mediata dalla Caspasi-12.** (Zong WX et al., 2003).

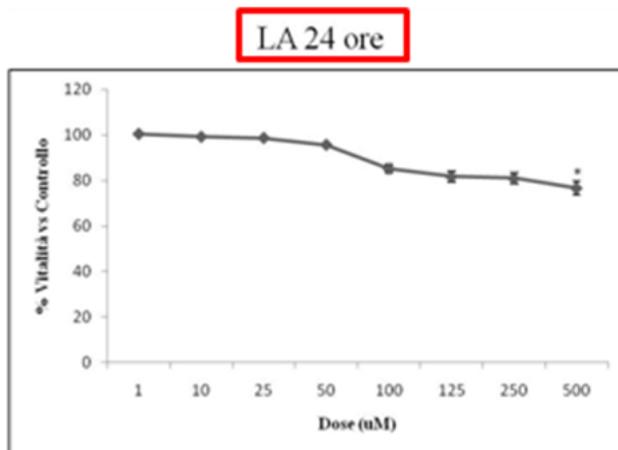
**Fig.8**



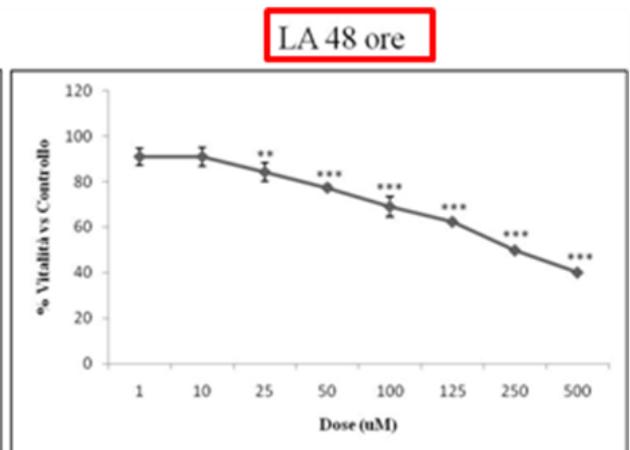
A) Enantiomeri R e S dell'acido lipoico B) L'acido lipoico e la sua forma ridotta, l'acido diidrolipoico DHLA. (Shay KP et al., 2009).

**Fig.9**

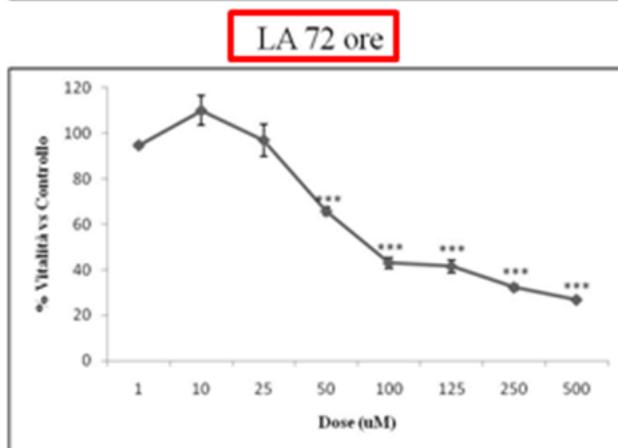
A



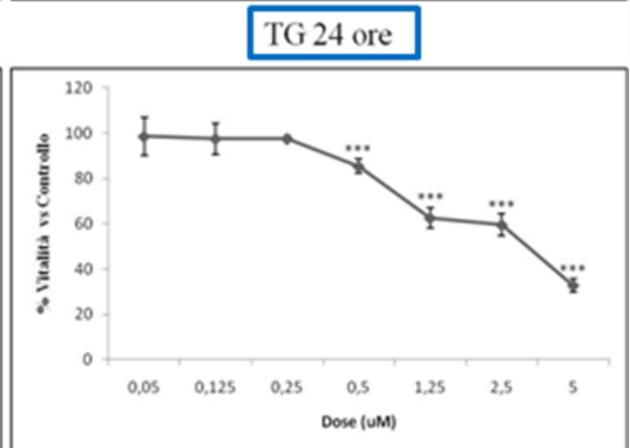
B



C

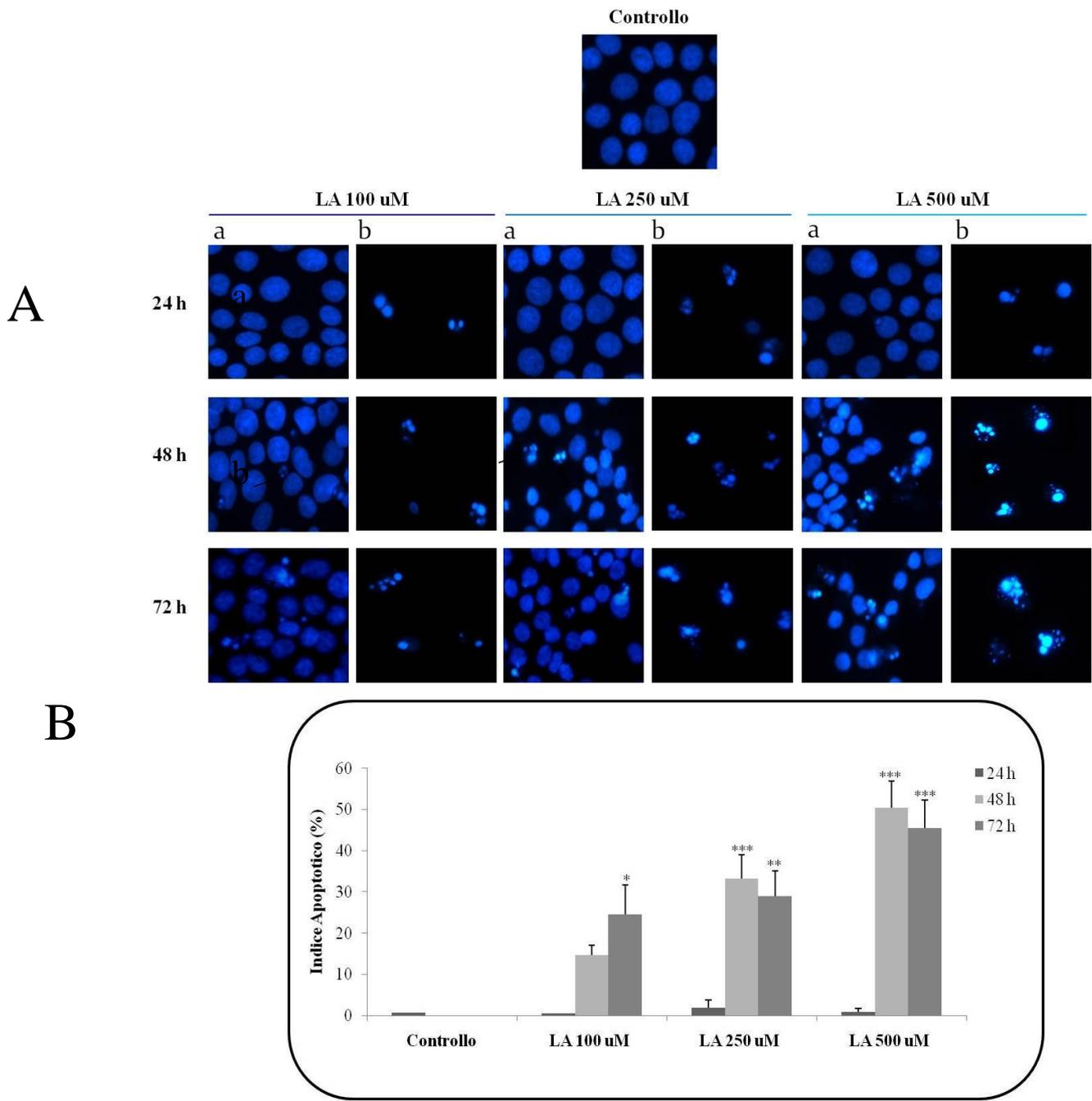


D



**Efetto sulla vitalità delle cellule FaO in seguito a trattamento  
con dosi crescenti di LA e di TG  
(\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001)**

**Fig.10**



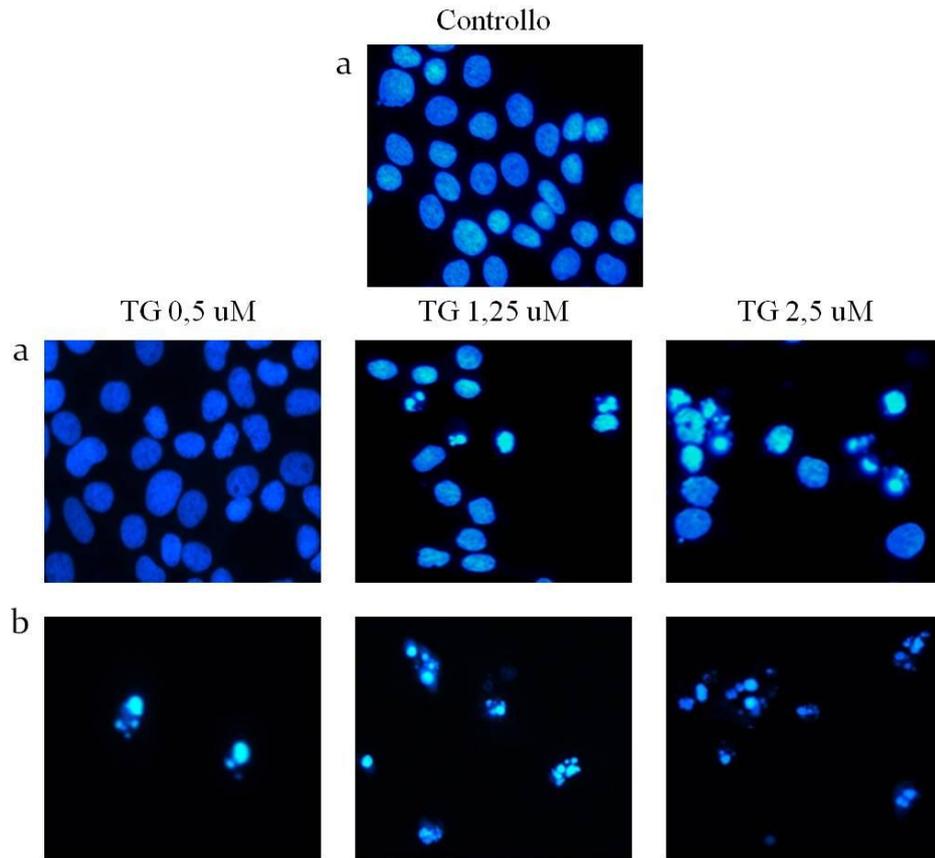
**A) Analisi morfologica mediante microscopia a fluorescenza della frazione cellulare**

**(a) adesa e (b)staccata di cellule FaO trattate con LA**

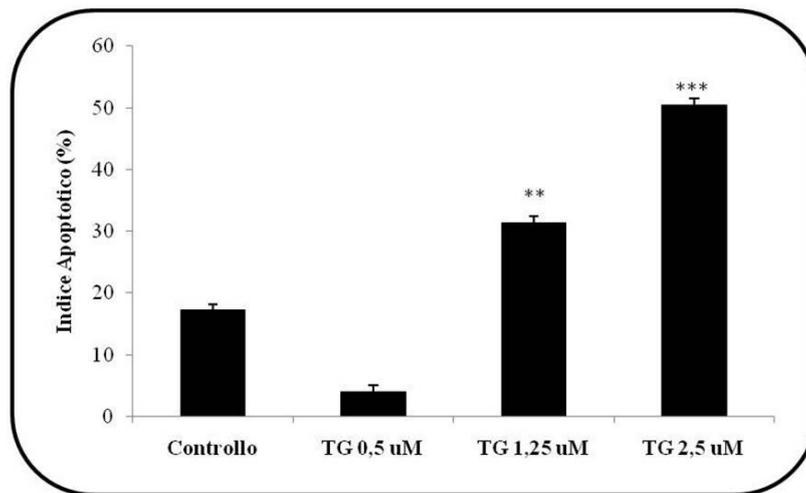
**B) Indice apoptotico (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001)**

**Fig.11**

A



B

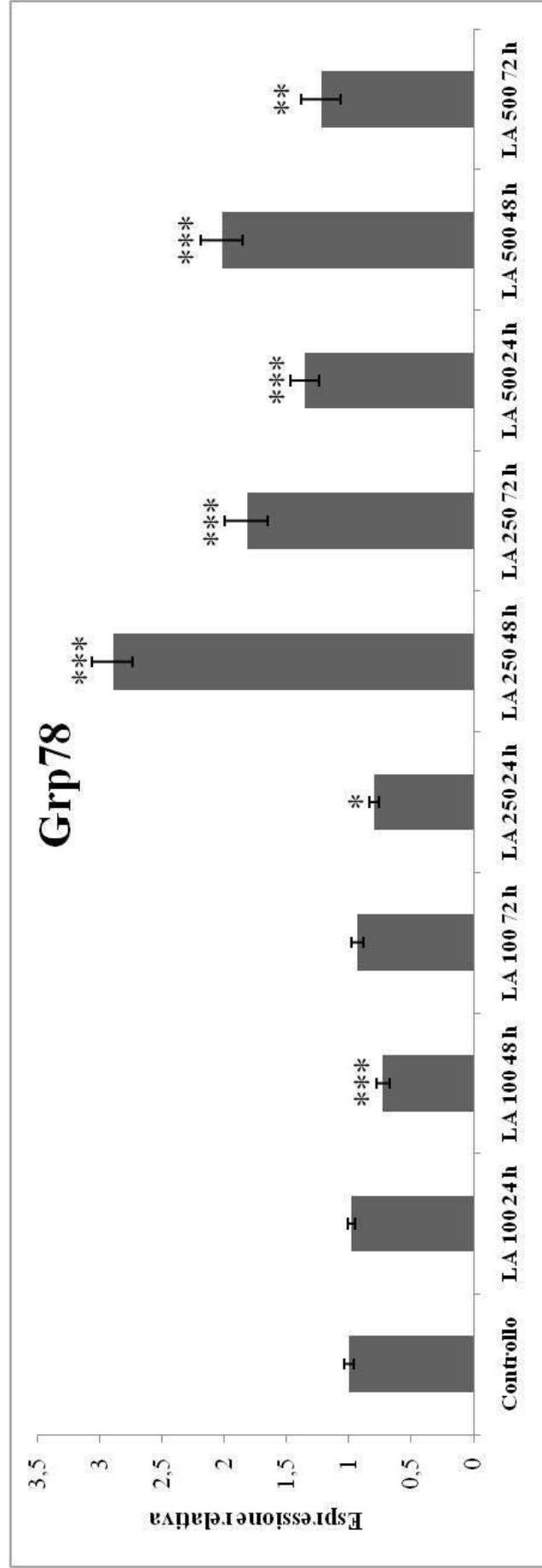


A) Analisi morfologica mediante microscopia a fluorescenza della frazione cellulare

(a) adesa e (b) staccata di cellule FaO trattate con TG

B) Indice apoptotico (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

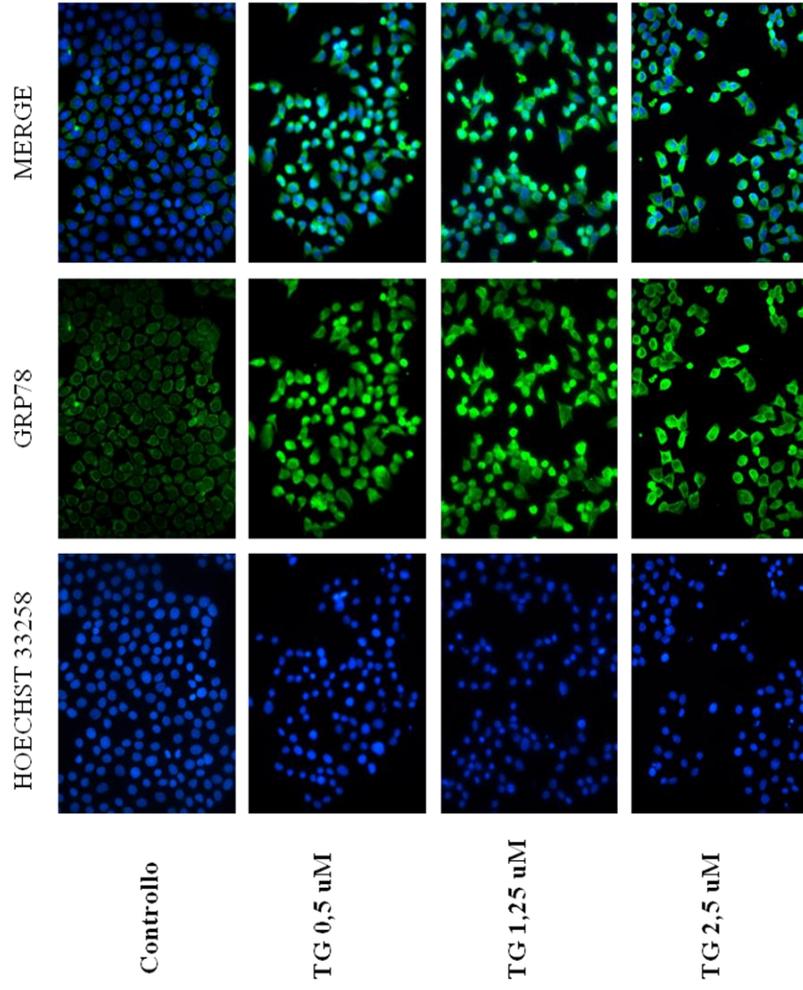
Fig. 12



Analisi dei livelli di espressione dell'mRNA di Grp78 dopo trattamento con LA mediante Real-Time PCR

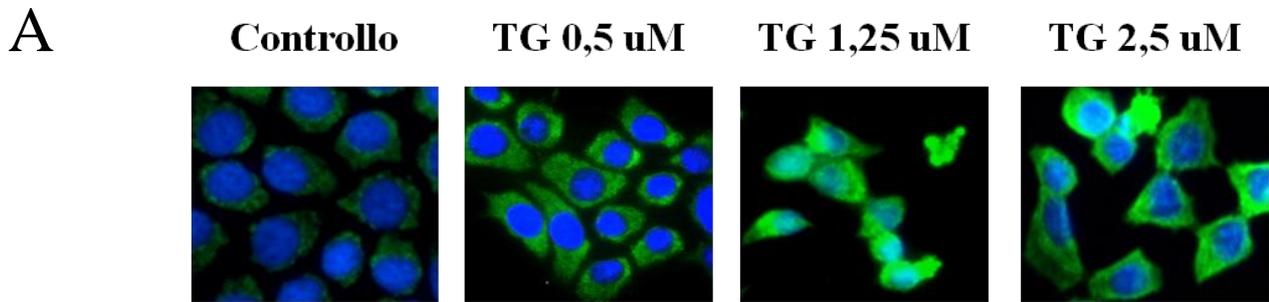
(\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001)

**Fig.13**

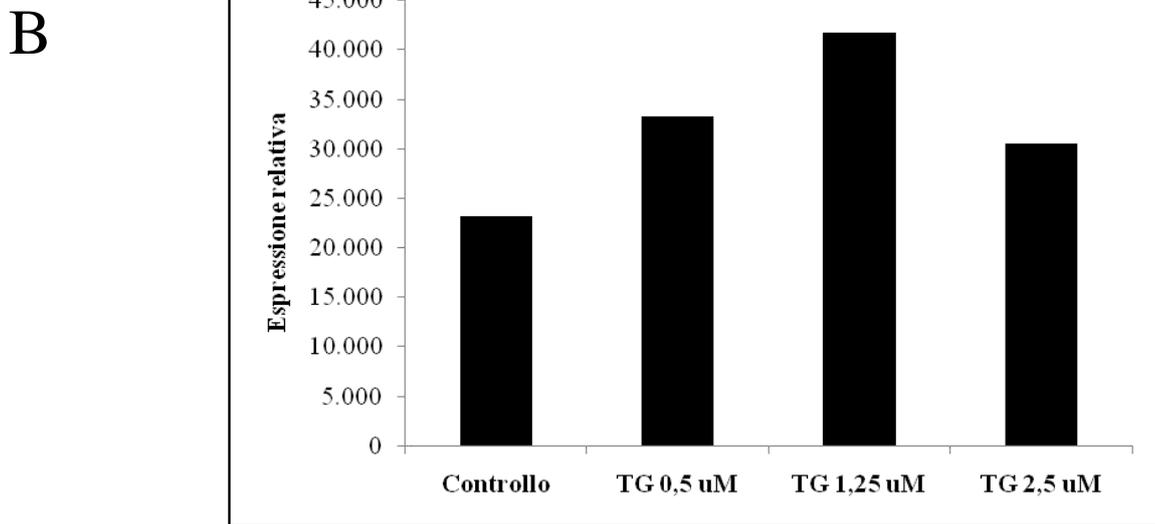


Analisi dell'espressione della proteina GRP78 in seguito a trattamento con TG per 24 ore, mediante immunofluorescenza

**Fig.14**



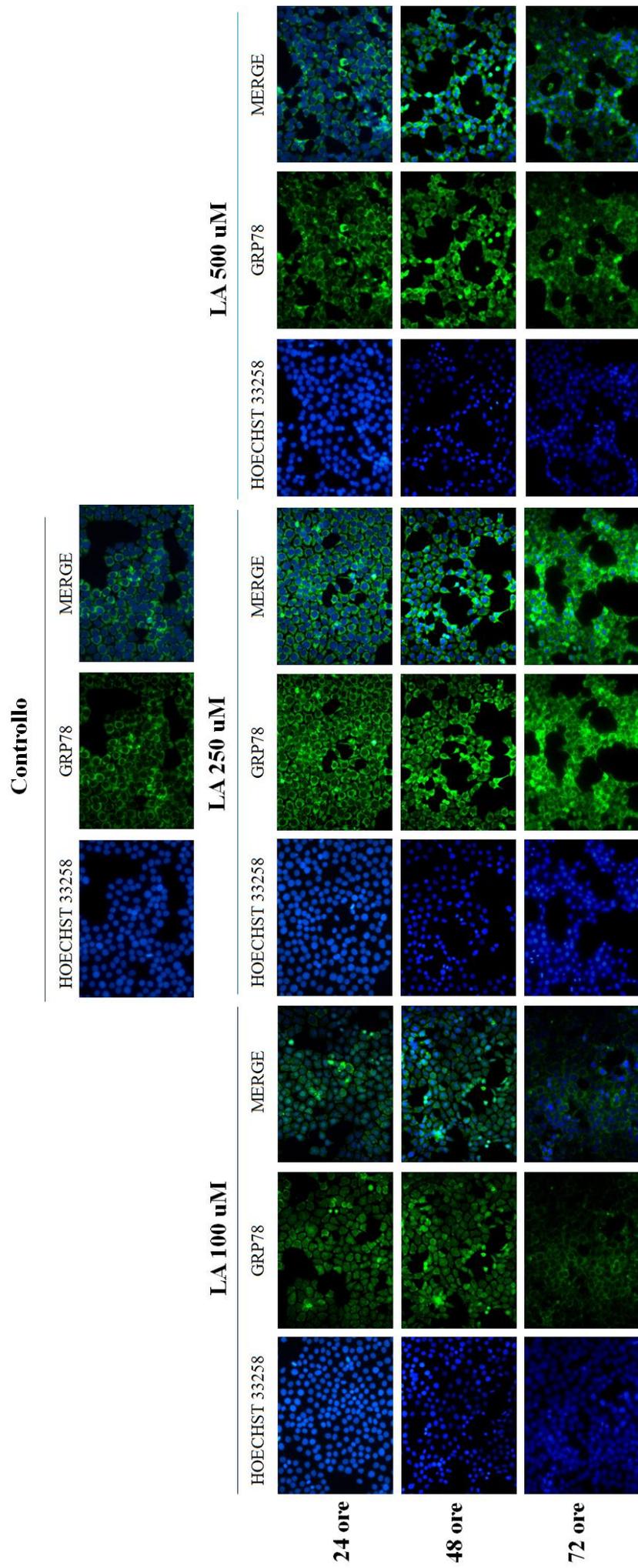
**GRP78**



**A) Analisi mediante immunofluorescenza della localizzazione intracellulare di GRP78 in seguito al trattamento con dosi crescenti di TG per 24 ore**

**B) Analisi densitometrica**

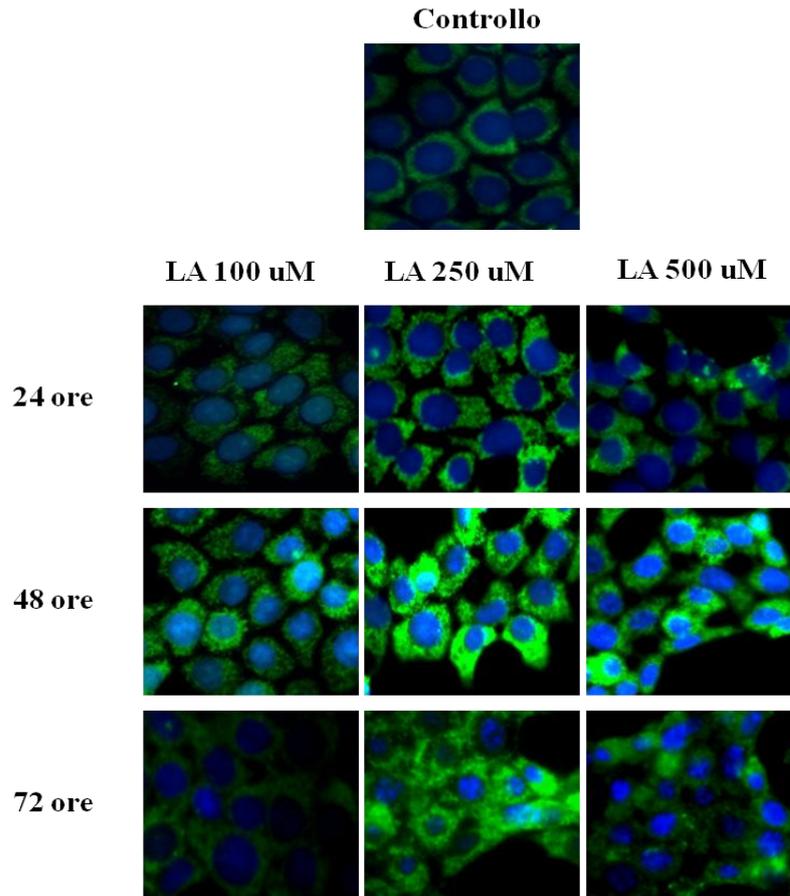
**Fig. 15**



Analisi dell'espressione della proteina GRP78 in seguito a trattamento con LA mediante immunofluorescenza

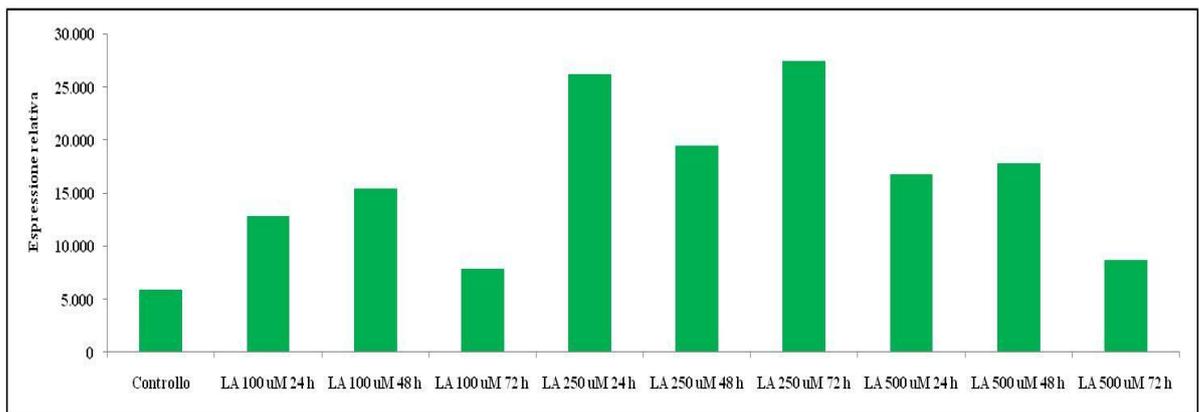
Fig.16

A



GRP78

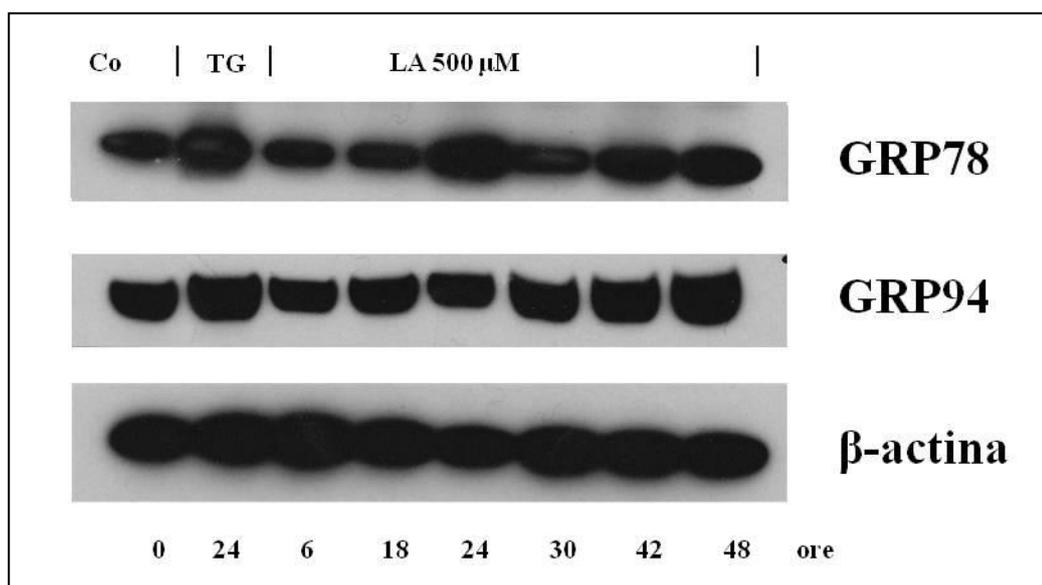
B



A) Analisi mediante immunofluorescenza della localizzazione intracellulare di GRP78 in seguito al trattamento con dosi crescenti di LA

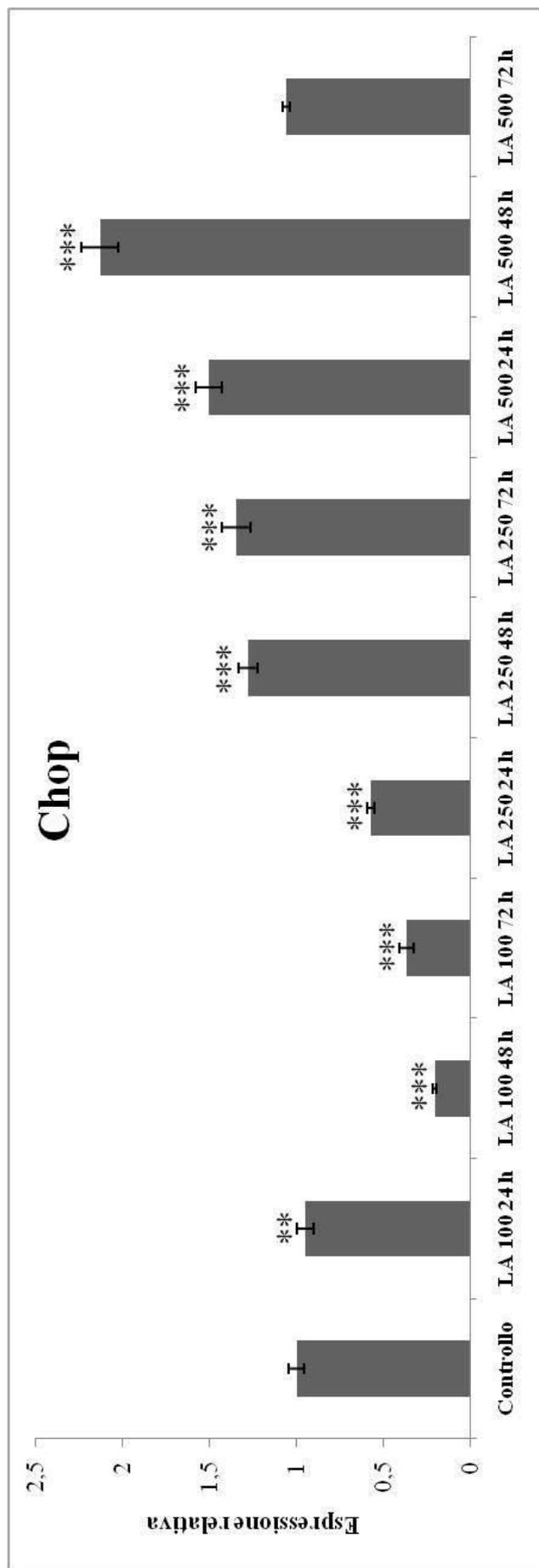
B) Analisi densitometrica

Fig.17



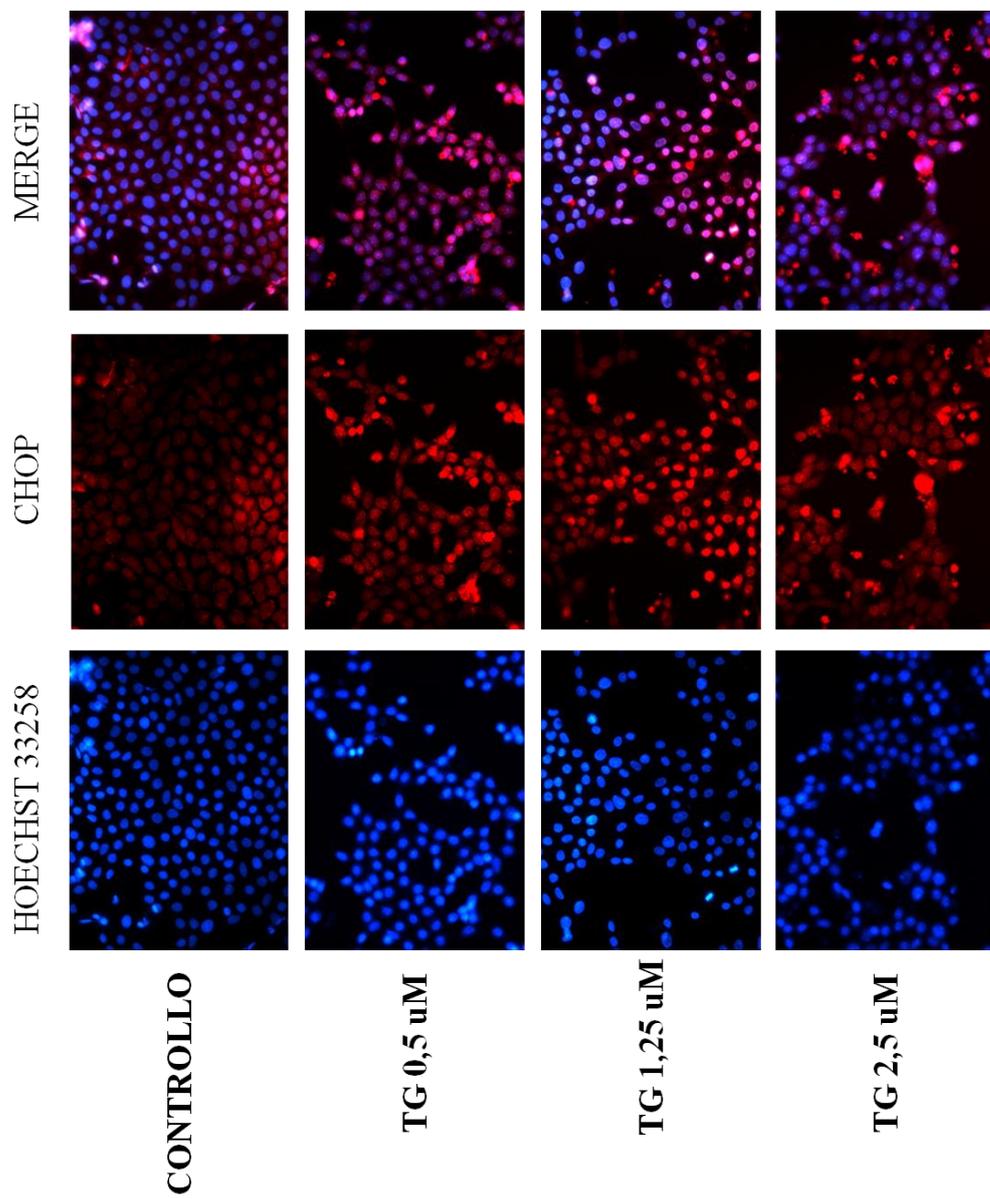
**Analisi dell'espressione delle proteine GRP78 e GRP94 in seguito al trattamento con LA 500  $\mu$ M**

**Fig.18**



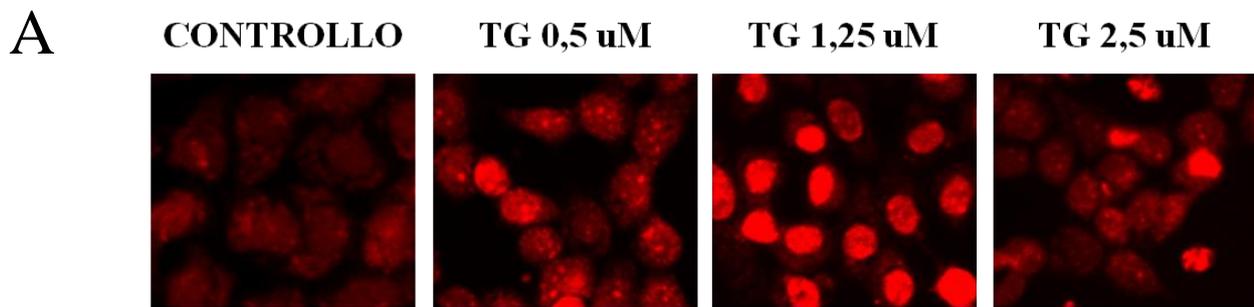
**Analisi dei livelli di espressione dell'mRNA di Chop dopo trattamento con LA, ottenuti mediante Real-Time PCR**

(\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

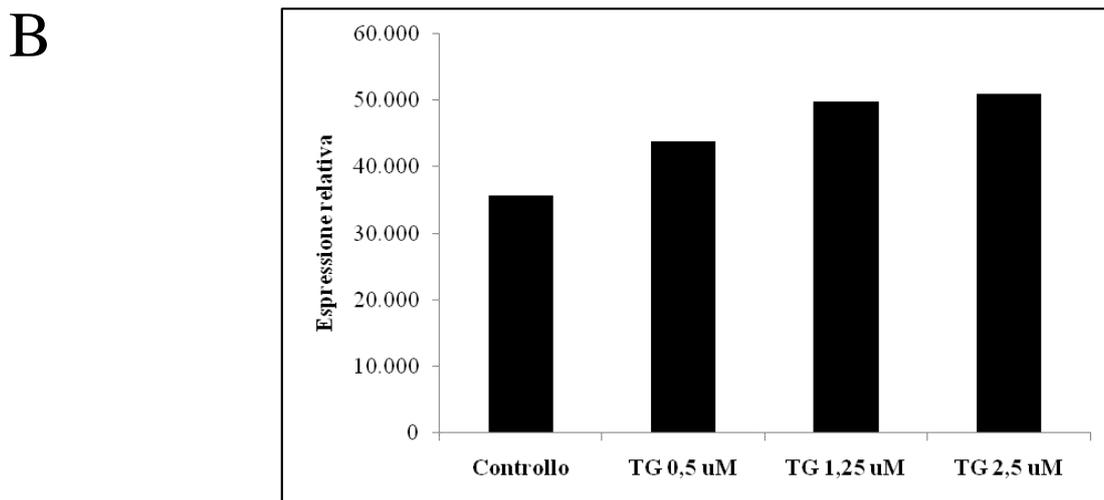


Analisi dell'espressione della proteina CHOP/GADD153 in seguito a trattamento con TG per 24 ore, mediante immunofluorescenza

**Fig.20**



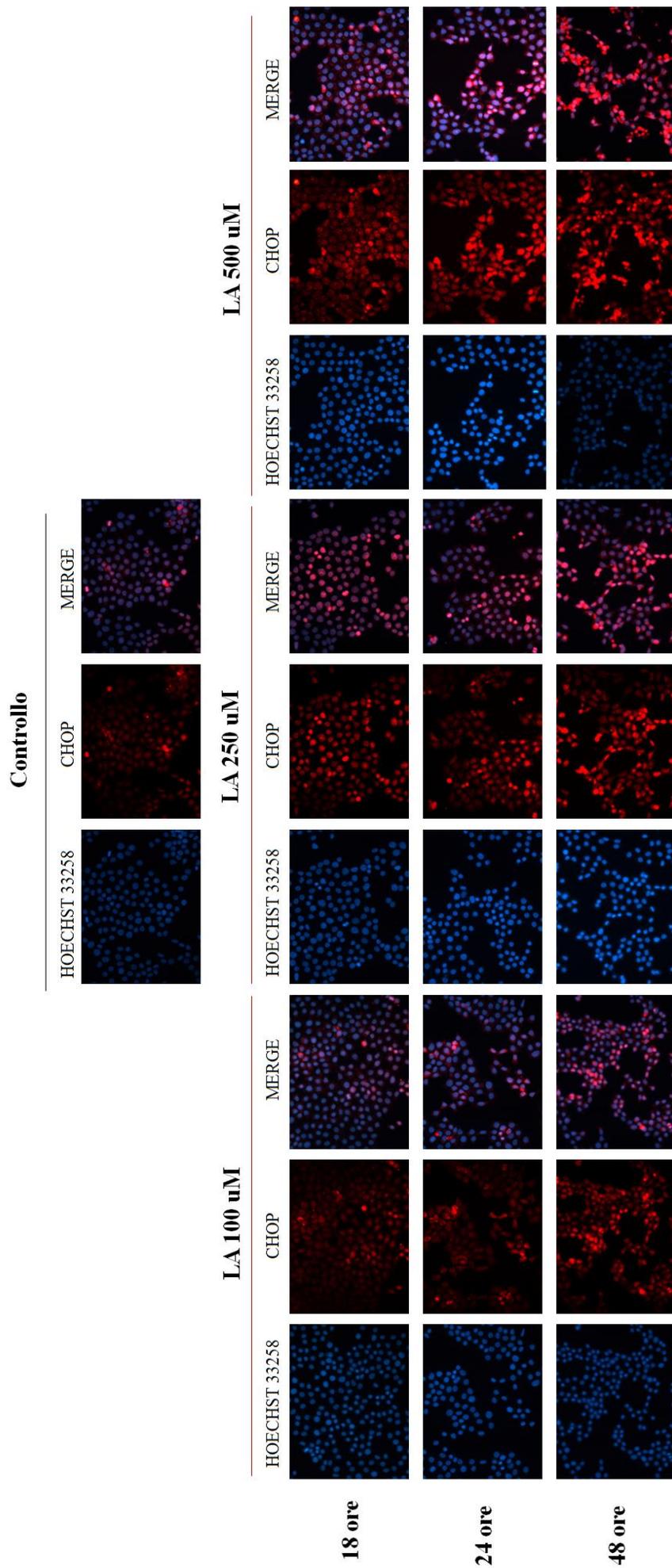
**CHOP/GADD153**



**A) Analisi mediante immunofluorescenza della localizzazione intracellulare di CHOP in seguito al trattamento con dosi crescenti di TG per 24 ore**

**B) Analisi densitometrica**

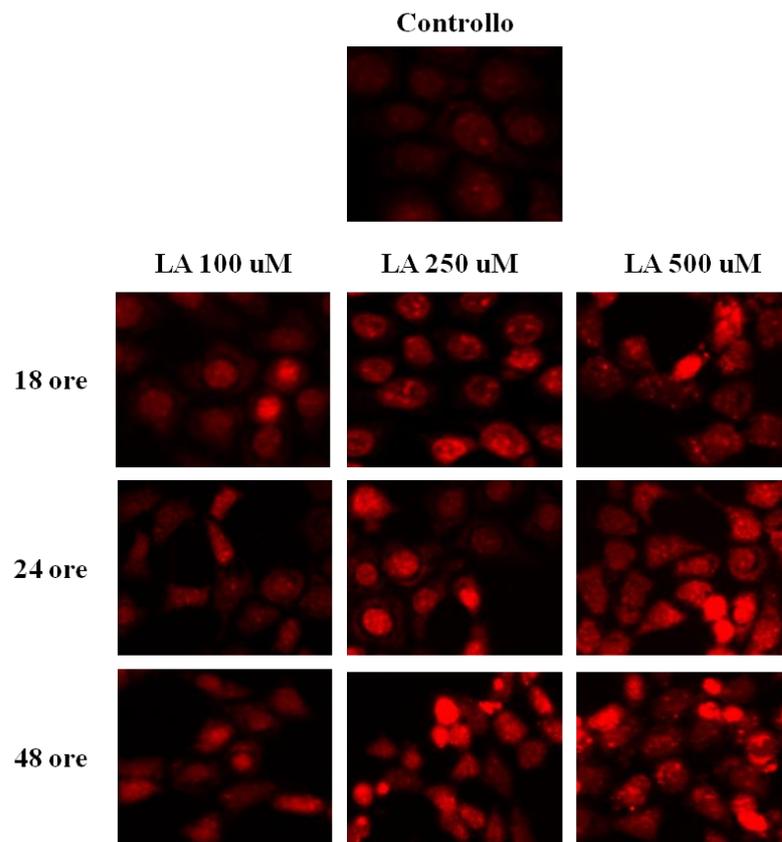
**Fig.21**



**Analisi dell'espressione della proteina CHOP/GADD153 in seguito a trattamento con LA mediante immunofluorescenza**

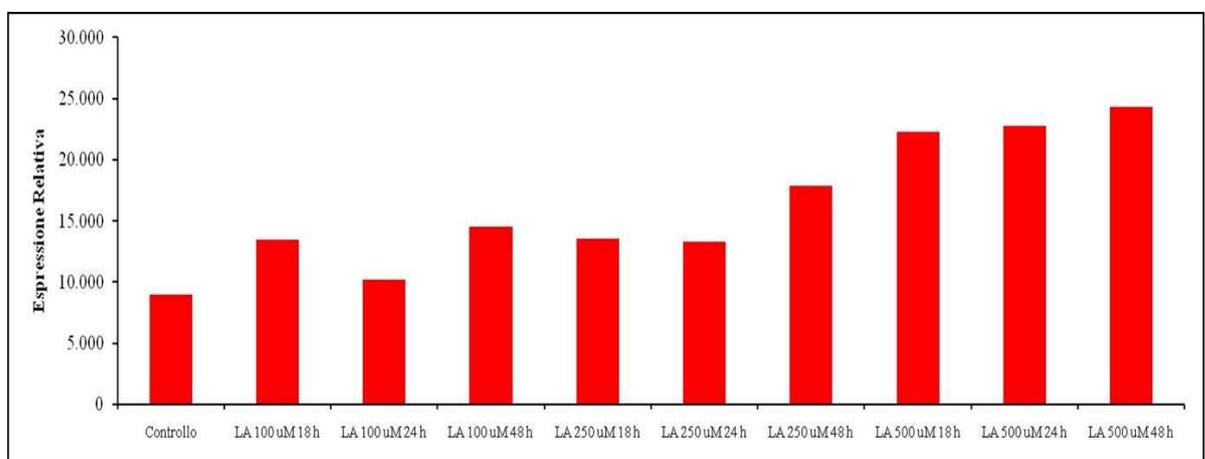
**Fig.22**

A



CHOP

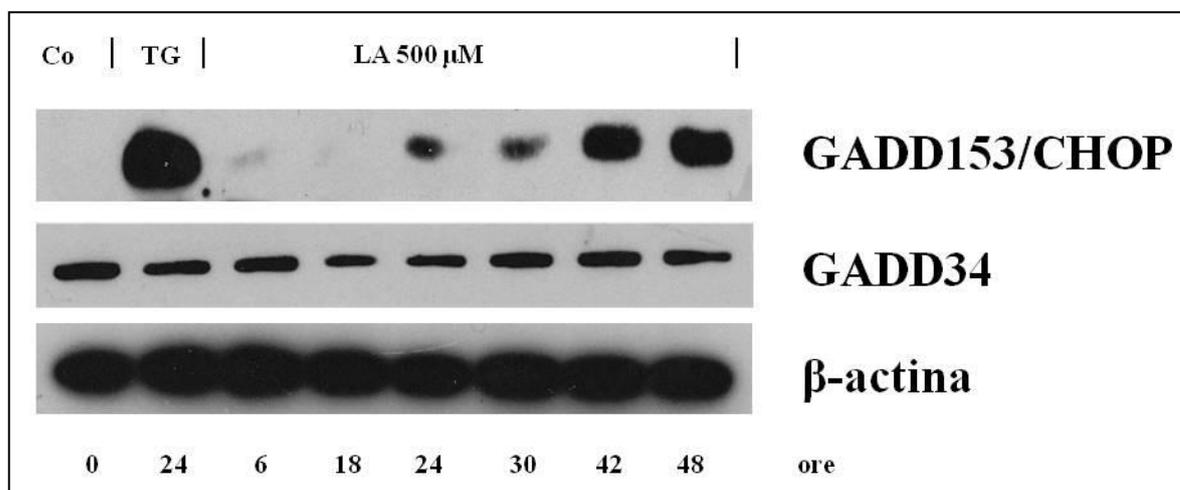
B



**A) Analisi mediante immunofluorescenza della localizzazione intracellulare di CHOP in seguito al trattamento con dosi crescenti di LA**

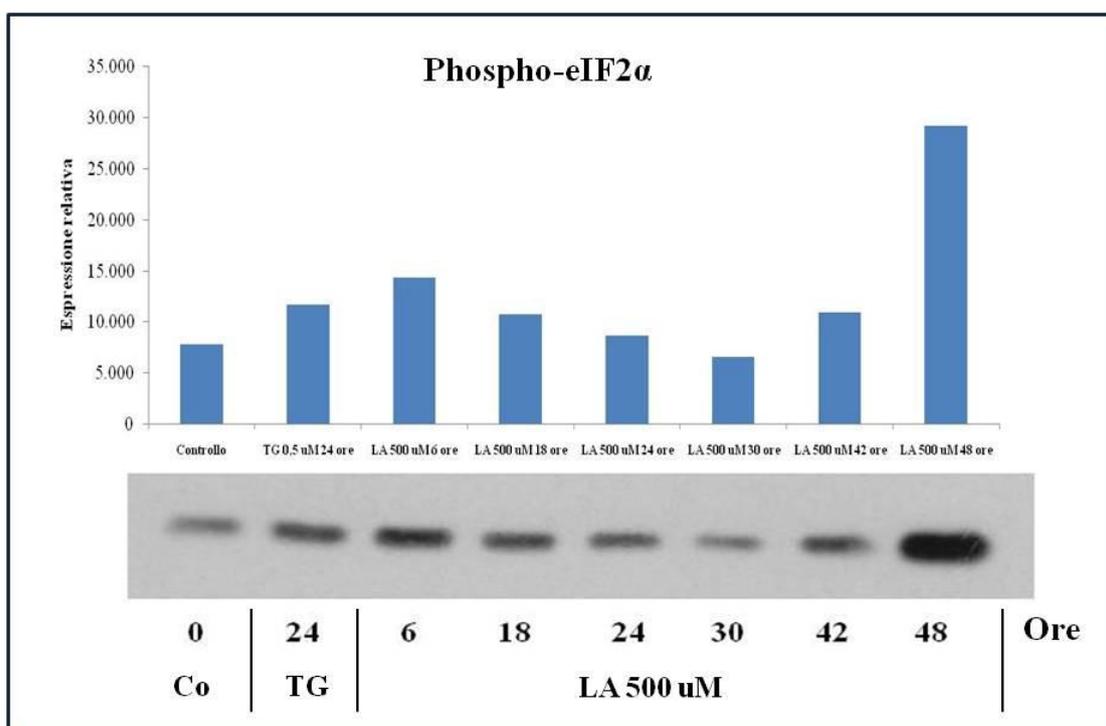
**B) Analisi densitometrica sulle immagini di microscopia in fluorescenza**

**Fig.23**



**Analisi delle proteine CHOP e GADD34 in seguito al trattamento con LA 500 uM**

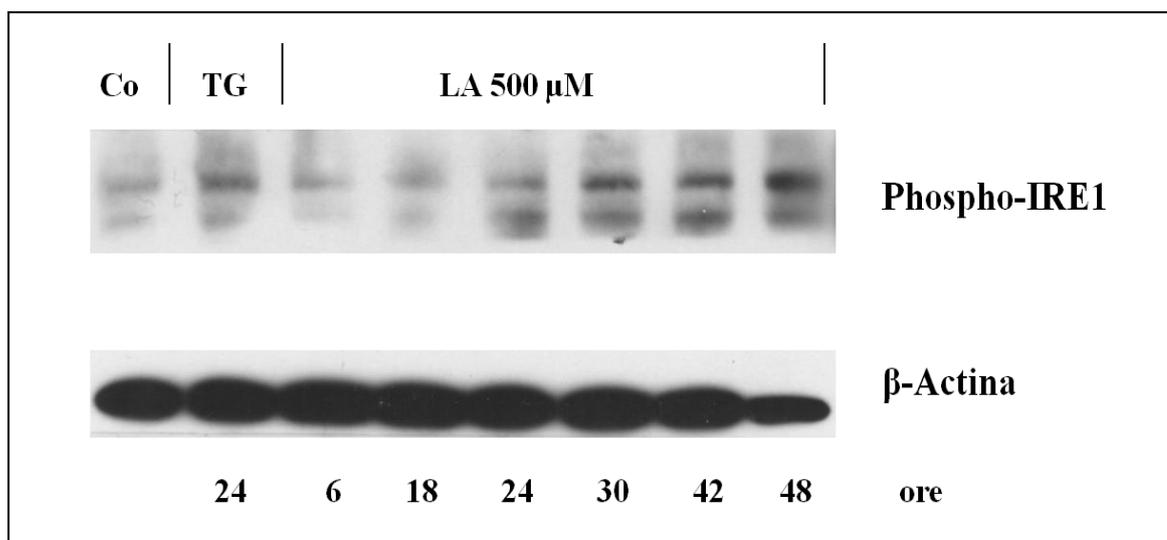
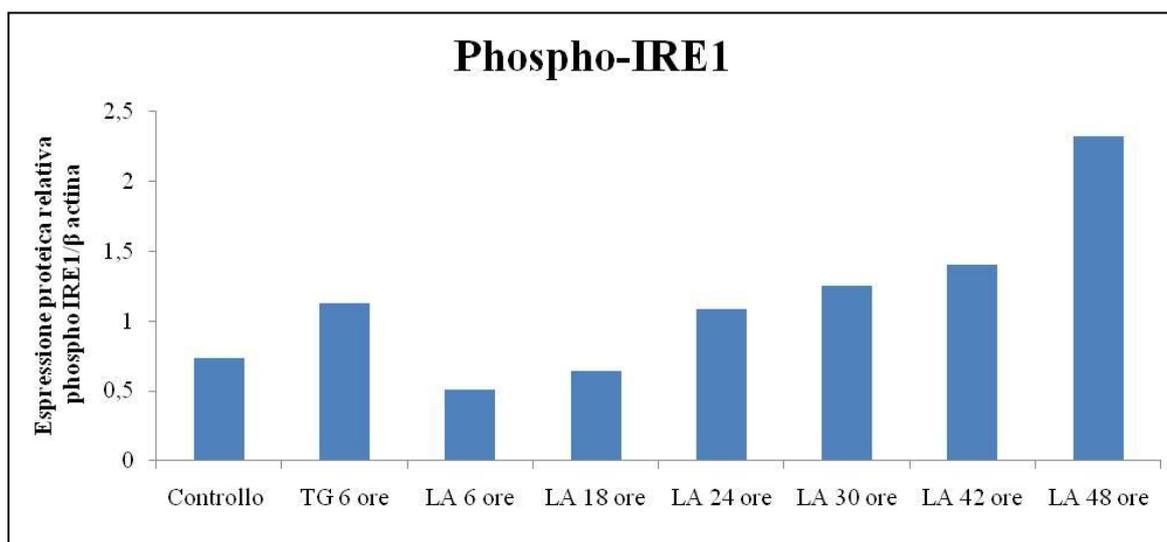
**Fig.24**



**A) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di phospho-eIF2 $\alpha$**

**B) Analisi dell'espressione phospho-eIF2 $\alpha$  in seguito al trattamento con LA 500 uM**

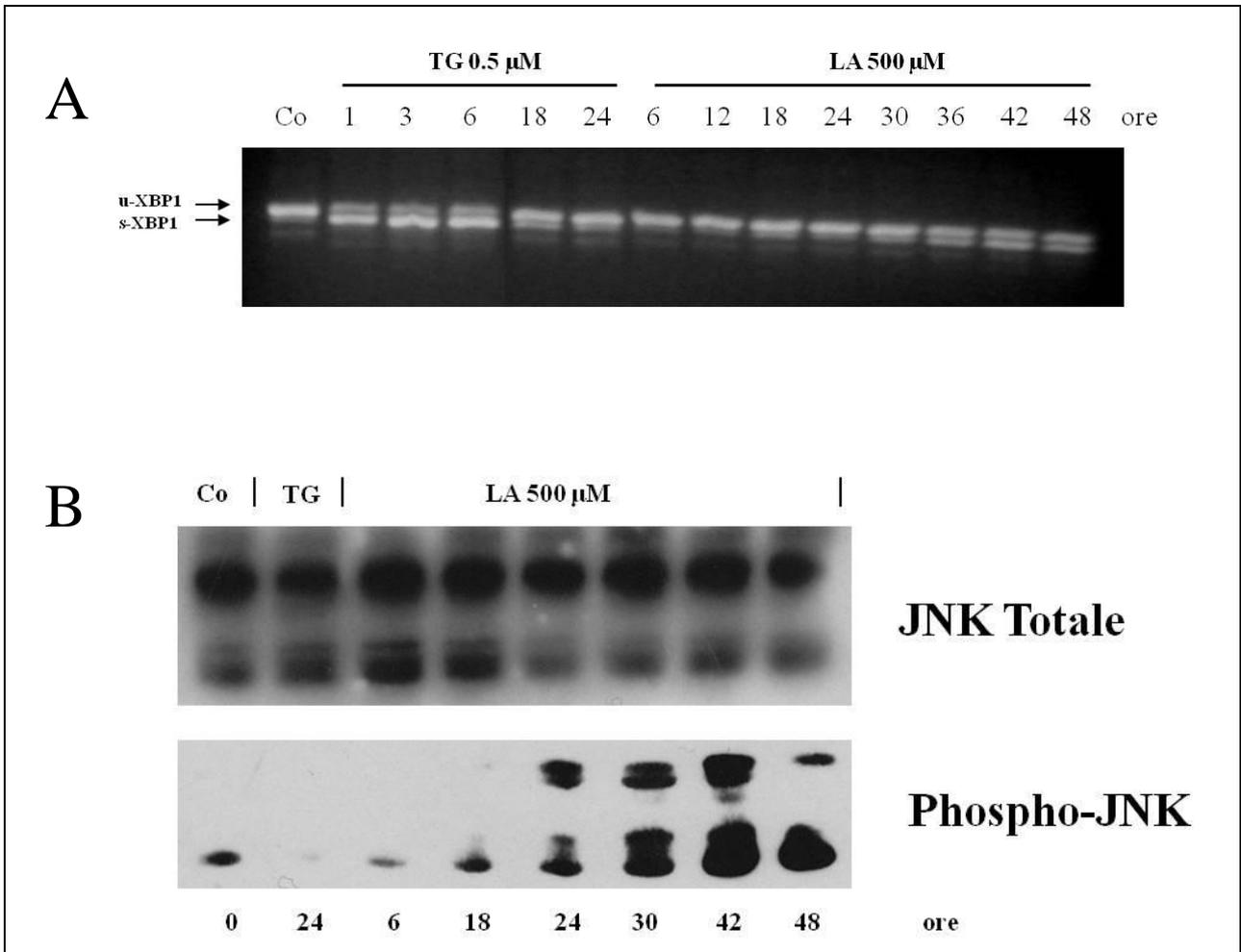
**Fig.25**

**A****B**

**A) Analisi dell'espressione della proteina phospho-IRE1 in seguito al trattamento con LA 500  $\mu$ M**

**B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di phospho-IRE1**

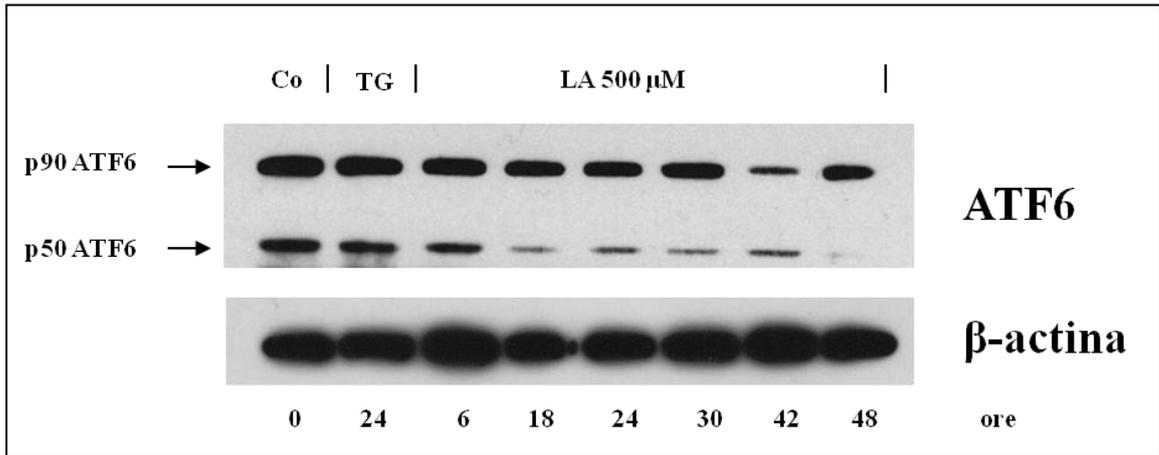
**Fig.26**



A) Analisi dello splicing dell'mRNA di XBP1 mediante reverse-PCR

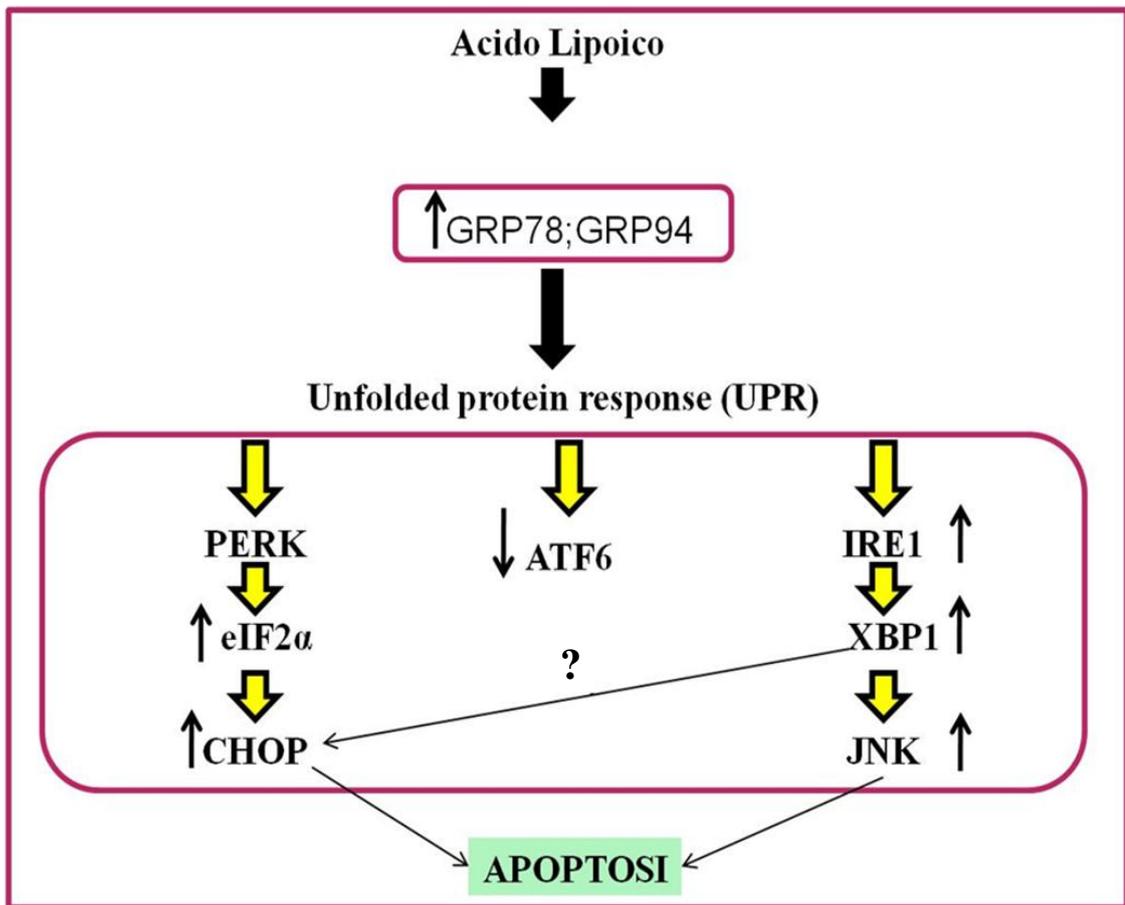
B) Analisi dell'espressione del sensore della chinasi JNK nelle cellule Fao trattate con LA 500  $\mu$ M

**Fig.27**



**Analisi dell'espressione sensore di Stress ATF6 in seguito al trattamento con LA 500 uM**

**Fig.28**



**Fig.29**



## **Bibliografia**

- Bakhshi J, Weinstein L, Poksay KS, Nishinaga B, Bredesen DE, Rao RV. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis* 2008; 13(7):904-14
- Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; 13(3):363-373
- Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1  $\alpha$  to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2003; 23(4):1292-1303
- Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002; 277(15):13045-13052
- Coombes JS, Power SK, Demirel HA, Jessup J, Vincent HK, Hamilton KL, Naito H, Shanely RA, Sen CK, Packer L. Effect of combined supplementation with vitamin E and alfa lipoic acid on miocardic performance during in vivo ischemia-reperfusion. *Acta Phisiol Scand* 2000; 169(4):261-269
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103(2):239-252
- Distelhorst CW, McCormick TS. Bcl-2 acts subsequent to and independent of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin-and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. *Cell Calcium* 1996; 19(6):473-483
- Dupre S, Spoto G, Matarese RM, Orlando M, Cavallini D. Biosynthesis of lipoic acid in the rat: Incorporation of  $^{35}\text{S}$  and  $^{14}\text{C}$ -labeled precursors. *Arch Biochem Biophys* 1980; 2002(2):361-365
- Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E255-E263

- Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(2):722-6
  
- Frand AR, Kaiser CA. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1999; 4(4):469-477
  
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sandri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdi DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003 **A**; 11(3):619-633
  
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell* 2000 **B**; 5(5):897-904
  
- Hussain SG, Ramaiah KV. Reduced eIF2 $\alpha$  phosphorylation and increases proapoptotic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(2):365-37
  
- Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999; 13(10):1211-1233
  
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Coromilas Awouters BG. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 2002; 22(21):7405-7416
  
- Ladiges WC, Knoblauch SE, Morton JF, Korth MJ, Sopher BL, Baskin CR, MacAuley A, Goodman AG, LeBoeuf RC, Katze MG. Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* 2005; 54(4):1074-81

- Lebedzinska M, Szabadkaib G, Jonesb AWE, Duszynskia J, Wieckowski MR. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(10):1805-1816
  
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003; 23(21):7448-7459
  
- Lin SS, Huang HP, Yang JS, Wu JY, Hsai TC, Lin CC, Lin CW, Kuo CL, Wood WG, Chung JG. DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer letters* 2008; 272(1):77-99
  
- Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem neuroanat* 2004; 28(1-2):51-65
  
- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, Murgia V, Camboni P, Ferreli L, Mocchi M, Massa E. The impact of different antioxidant agents alone or in combination on reactive oxygen species, antioxidant enzymes and cytokines in a series of advanced cancer patients at different sites: correlation with disease progression. *Free Radic Res* 2003 **A**; 37(2):213-223
  
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Gramignano G, Lusso MR, Murgia V, Camboni P, Ferreli L. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms, and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003 **B**; 228(1):17-28
  
- Mori K. Divest yourself of a preconceived idea: transcription factor ATF6 is not a soluble protein. *Mol Biol Cell* 2010; 21(9):1435-8

- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150(4):887-894
  
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 1998; 2(3):389-395
  
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001, 153(3):1011-1022
  
- Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein. *Biochem J* 2002; 366 (Pt2):585-594
  
- Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thiocctic (Lipoic) acid: A therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1994; 50(1):123-6
  
- Pae HO, Jeong SO, Jeong GS, Kim KM, Kim HS, Kim SA, Kim YC, Kang SD, Kim BN, Chung HT. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353(4):1040-5
  
- Park JW, Woo KJ, Lee JT, Lim JH, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Kwon TK. Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2007; 18(5):1269-73
  
- Patrick L. Nutrients and HIV: part three - N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, L-glutamine, and L-carnitine. *Altern Med Rev* 2000; 5(4):290-305

- Peinado J, Sies H, Akerboom TP. Hepatic lipoate uptake. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273(2):389-95.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum to cell death program. *Cell Death Differ* 2004;11(4):372-380
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276(36):33869-33874
- Reed LJ, DeBusk BG, Gansalus IC, Hornberger JrCS. Crystalline  $\alpha$ -lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1951; 114(2952):93-4
- Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002; 110(10):1383-8
- Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 1992; 6(3):439-453
- Rutishauser J, Spiess M. Endoplasmic reticulum storage diseases. *Smitt Med Wkly* 2002; 132(17-18):211-222
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell* 2004; 14(1):20-8
- Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74(11):739-789
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Krasmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ : a control point for apoptosis. *Science* 2003; 300(5616):135-39

- Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad Res* 1994; 20(2):119-133
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1790(10):1149-1160
- Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, Pibiri M. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis* 2007; 12(1):113-123
- Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):495-504
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010:186-94
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO* 2006; 7(9):880-5
- Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 1998; 12(12):1812-1824
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287(5453):664-666
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 1998 A; 17(19): 5708-5717

- Wang XZ, Kuroda M, Sok J, Batchvarova N, Kimmel R, Chung P, Zinszner H, Ron D. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J* 1998 B; 17(13) 3619-3630
- Wang XZ, Lawson B, Brewer J, Zinszner H, Sanjay A, Mi L, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot L, Ron D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP homologous protein (CHOP/ GADD153). *Mol Cell Biol* 1996 ; 16(8):4273-4280
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292(5517):727-730
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(1):7-11
- Woo KJ, Lee TJ, Lee SH, Lee JM, Seo JH, Jeong YJ, Park JW, Kwon TK. Elevated gadd153/chop expression during resveratrol-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(1):68-76
- Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Grace D, Yau Y, Kaufman RJ. ATF6 $\alpha$  optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Developmental Cell* 2007; 13(3):351-364
- Yamaguchi H, Wang HG. CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *J Biol Chem* 2004; 279(44):45495-45502
- Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. Control of PERK eIF2 $\alpha$  kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(25):15920-5

- Yanjun MA, Hendershot LM. The role of unfolded protein response in tumor development: friend or foe?. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(12):966-77
- Yeh TC, Chiang PC, Li TK, Hsu JL, Lin CJ, Wang SW, Peng CY, Guh JH. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult. *Biochemical Pharmacology* 2007; 73(6):782-792
- Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Takano Y, Yao J, M Kitamura. Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death Differ* 2007; 14(8):1467-1474
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001;276(17):13935-40
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; 107(7):881-891
- Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; 279(25):25935-8
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lighfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998; 12(7):982-95
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003; 162(1):59-69



## *Ringraziamenti*

*Quanto manca alla vetta?  
Tu sali e non pensarci!  
( F. W. Nietzsche )*

Le sensazioni che si provano quando si sta per tagliare il tanto agognato traguardo per raggiungere il quale sono stati necessari diversi anni di lavoro non sono facilmente descrivibili. Viene sicuramente spontaneo voltarsi indietro e ripercorrere i diversi momenti trascorsi da quando, con grande entusiasmo, è iniziata in prima persona la mia avventura con la ricerca oncologica. Ed allora la soddisfazione di vedere sulla propria scrivania la pila di carte che sintetizza una parte di quanto si è prodotto in questi anni, ripaga sicuramente i “sacrifici” che si sono dovuti affrontare e lo sforzo finale di questi ultimi mesi. Sacrifici sempre relativi perché le difficoltà che necessariamente convivono con qualunque progetto sono sicuramente compensate dal fascino stesso di fare ricerca, dal lavorare intorno una cosa che piace, dall’aver la fortuna di fare parte di un gruppo che ti sostiene e che è all’avanguardia nella materia.

Nel dire questo non posso non ringraziare innanzitutto il Professor Amedeo Columbano e la Prof.ssa Giovanna Maria Ledda per avermi dato l’opportunità di svolgere il mio dottorato nel laboratorio da loro diretto; a loro va un ringraziamento speciale per aver contribuito alla mia formazione e crescita nel campo professionale.

Desidero ringraziare in modo particolare la Dott.ssa Gabriella Simbula, tutore della sottoscritta, non solo per avermi insegnato il metodo scientifico e rigoroso della ricerca, ma anche per avermi stimolato continuamente ad andare avanti nel lavoro.

Gli insegnamenti e gli incoraggiamenti offertimi hanno contribuito a farmi credere nelle mie possibilità e perseguire le mie ambizioni. La sua disponibilità nei miei riguardi è andata ben oltre ogni più ottimistica e ragionevole aspettativa e la sua dedizione al lavoro è stata sicuramente di esempio per la sottoscritta. Al mio grazie associo un sincero riconoscimento di stima ed affetto.

Ringrazio tutti i professori, i ricercatori e gli studenti con i quali sono entrata in contatto con cui ho scambiato qualche pensiero, qualche idea, qualche risata all'interno del dipartimento. In modo particolare ricordo la Dott.ssa Vera Piera Leoni e il Dottor Roberto Loi per il loro supporto scientifico e morale e la Dott.ssa Monica Pibiri che con i suoi consigli e suggerimenti, ha permesso di migliorare il contenuto della tesi.

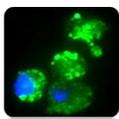
My gratitude goes to Aranzazu Sanchez, my stage at the University of Madrid was one of the most exciting part of the whole PhD course and surely a great experience beyond the scientific work also. If my stay there was fruitful, the most part of this was due to her great scientific and moral support and because the incredible enthusiasm she puts in everything she does. I would like to say thank you also to everybody at the University of Madrid for the friendly atmosphere.

Ricordo affettuosamente tutti i compagni di dottorato che hanno percorso con me questa strada e voglio citarli (in ordine rigorosamente casuale): Dottoressa Silvia Picciau, Dottoressa Silvia Pinna e il Dottor Christian Saliba.

Il mio carattere e il mio stato d'animo sicuramente sono stati sostenuti in questi anni da Anna Marta Kowalik, conosciuta tre anni fa sul lavoro e diventata parte fondamentale della mia vita, con lei ho vissuto a stretto e continuo contatto all'interno del laboratorio, inoltre con lei ho trascorso, una parte assai divertente del tempo libero.

Grazie anche a coloro che sono sempre stati i piu' buoni e comprensivi: i miei genitori, i nonni, i cugini, gli zii e le zie, Maria e Ademaro, sia quelli che posso ancora vedere che quelli che posso solo ricordare con piacere.

E infine il grazie piu' dolce va a te, Franco per avermi sostenuto in tutti gli aspetti e particolarmente dal punto di vista alimentare, sopportando i disagi della mia vita sregolata dell'ultimo periodo. Sono contenta di poter condividere questa bella e tanto attesa giornata assieme a te.



*Ed infine un grazie ed un augurio a me stessa...*