



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE

INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA DI GENERE

(XXIV Ciclo)

**“AUTOFAGIA:
UN PROCESSO GENERE SPECIFICO?”**

Direttore: *Prof.* EUSEBIO TOLU

Tutore: *Prof.ssa* FLAVIA FRANCONI

Tesi di dottorato del: *Dott.* ROBERTO CHESSA

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

SOMMARIO

INTRODUZIONE	pag. 5
SCOPO	pag. 6
MATERIALI E METODI	» 12
<i>Animali</i>	» 12
<i>Western Blotting</i>	» 13
<i>Determinazione proteica</i>	» 13
<i>Determinazione di Beclina</i>	» 13
<i>Determinazione di LcIII</i>	» 13
<i>Determinazione di mTOR</i>	» 13
<i>Determinazione di LAMP</i>	» 13
<i>Determinazione della Tubulina</i>	» 13
<i>Determinazione di Actina</i>	» 13
<i>Determinazione di GAPDH</i>	» 13
<i>Analisi densitometrica e statistica</i>	» 13
<i>Immunofluorescenza</i>	» 14

RISULTATI E DISCUSSIONE.....	»	16
CONCLUSIONI.....	»	35
BIBLIOGRAFIA.....	»	37

Abstract

The purpose of this study was to clarify if autophagic processes that play an important role in many diseases such as ischemia, cancer, neurodegenerative diseases, are influenced by the determinant gender. In particular, research has focused on the liver, heart and kidney as well as analyzing some aspects of isolated cells. It's clear that in some organs the liver see the process is greatly influenced by gender and in the kidney does not seem to be influenced by this factor at least in physiological conditions. Also see the cells in culture VSMC exhibit significant differences in autophagic processes and substances with antioxidant activity such as minor polar compounds extracted olive oil extravergine change the autophagic process in a specific gender. Suggesting that such drugs can be achieved in this area involving specific diseases that are the main causes of death. Autophagy is a lysosomal degradative pathway involved in the intracellular turnover of proteins and cell organelles and has an important role in regulating cell fate in response to stress. We demonstrated a gender disparity in this regard (Malorni et al., 2008; Straface et al., 2009). Under basal conditions autophagic activity is low but can be activated by physiological and pathological conditions in multiple organs. Conversely, autophagy suppression is often associated with certain diseases, including a subset of cancer, neurodegenerative disorders, infectious diseases and inflammatory bowel disorders (Mizushima

et al., 2010). In order to investigate if, in basal conditions, sexual autophagic differences could occur in different organs from male and female rats, specific studies have been undertaken. Paraffin-embedded sections from liver, heart and kidney have been analyzed by immunofluorescence microscopy. In particular, a double labeling of LC3 (a marker of autophagosome) and Lamp-1 (a marker of lysosomes) has been carried out to evaluate the formation of autophagolysosomes (a hybrid organelle generated by the fusion of an autophagosome and a lysosome). Analyses conducted by immunofluorescence microscopy clearly indicated an increased expression and colocalization of LC3 and Lamp-1 only in organs from male rats. These results were corroborated by biochemical western blot analyses.

Although the biological significance of this phenomenon remains to be elucidated, we can not rule out the possibility that this constitutive autophagic activity, mainly detectable in organs from male rats, could become a relevant biomarker and a pharmacological target in the long run.

INTRODUZIONE

Il termine genere, che deriva dal latino *genus, generis*, affine a *gignere* – generare, risponde alla necessità di dare valore a quanto vi è nella cultura in cui viviamo che ci porta ad essere uomini e donne al di là dell'essere maschio o femmina. Originariamente fu introdotto nelle scienze sociali per descrivere come le diverse società e culture interpretassero l'essere maschio e l'essere femmina, pertanto, il genere include gli elementi che caratterizzano essere donna o uomo in una determinata società (Greaves L., O. Hankivsky et al. 1999; Grant K. and P. Ballem 2000; Franconi F. and L. I. Ferro 2010). La “Questione femminile” fu nominata, per la prima volta, in medicina nel 1991, quando Bernardine Healy, direttrice dell'NIH statunitense, parlò di “Yentl Syndrome” sulla prestigiosa rivista *New England Journal of Medicine* a causa dell'atteggiamento discriminatorio dei cardiologi nei confronti della donna. “Yentel”era una giovane donna che nel racconto del premio Nobel Isaac Singer si era vestita da ragazzo per studiare il Talmud (Singer, B.I. 1983. *Yentel the Yeshiva Boy* Farrar, Straus, Giroux.) D'altra parte fatti analoghi si ritrovano nella storia della medicina a partire dall'antica Atene, dove l'arte medica era interdetta alle donne, e Agnodice fu costretta a travestirsi da uomo per raggiungere il suo obiettivo sino ad arrivare a James Stuart Barry famoso chirurgo militare che in realtà era “Miranda”.

Questo stato di cose ha portato nella ricerca e nella cura a differenze non giustificabili, che contraddicono le basi della medicina e che non sono d'accordo con uno degli obiettivi del III millennio, la cura personalizzata, che necessariamente deve anche essere tenuta in conto prima di arrivare all'obiettivo delle categorie dei pazienti. Molte differenze di genere sono state individuate in questi ultimi anni, ed ormai è sempre più evidente che il cuore, i vasi sanguigni, l'encefalo, il fegato, il polmone, il rene, necessitano di essere declinati sia al femminile sia al maschile. Quindi, le diversità devono essere integrate nei processi e nelle politiche di cura e di tutela della salute, poiché la scarsa conoscenza e la scarsa considerazione delle differenze biologiche e sociali hanno prodotto il cosiddetto "*paradosso donna*": le donne vivono più a lungo degli uomini, ma si ammalano di più ed hanno un maggior numero di anni di vita in cattiva salute.

Lo scopo di questo studio è stato quello di chiarire se i processi autofagici che giocano un ruolo importante in numerose patologie come l'ischemia, il cancro, le malattie neurodegenerative, sono influenzati dal determinante genere. In particolare, la ricerca si è concentrata sul fegato, sul cuore e sul rene analizzando anche alcuni aspetti su cellule isolate. È evidente che in alcuni organi vedi fegato il processo è influenzato grandemente dal genere mentre nel rene questo sembra non essere influenzato da questo determinante, almeno in condizioni fisiologiche. Anche le cellule in cultura vedi VSMC presentano differenze significative nei processi autofagici e sostanze con attività antiossidante come i composti polari minori

estratti dall'olio extravergine d'oliva modificano il processo autofagico in maniera genere specifica. Indicando con ciò che è possibile realizzare farmaci genere specifici in questo ambito che coinvolge patologie che rappresentano le principali cause di morte.

L'autofagia è un processo cellulare complesso, altamente conservato e regolato, ATP-dipendente che avviene in tutte le cellule eucariote. Esso coinvolge il riarrangiamento di membrane subcellulari al fine di sequestrare porzioni del citoplasma e organuli da esporre all'azione degradativa degli enzimi lisosomiali, nei quali il materiale sequestrato è catabolizzato e riciclato.

Le vie autofagiche meglio caratterizzate sono la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia chaperone-mediata. Esse si differenziano per il modo con cui il materiale da degradare viene trasportato all'interno delle vescicole lisosomiali, per il tipo di materiale trasportato e per i meccanismi di regolazione. Molti tipi di cellule possono degradare proteine citosoliche attraverso la forma di autofagia chaperone-mediata (CMA), un processo con elevata selettività per un particolare gruppo di proteine citoplasmatiche che vengono traslocate attraverso la membrana lisosomiale senza richiedere la formazione di vacuoli o la deformazione di membrana. Tutti i substrati di CMA contengono una particolare sequenza aminoacidica KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) che viene riconosciuta dalle chaperonine, tra cui la proteina heat shock di 70 kDa (hsc70). Il complesso chaperonina-proteina si lega alla membrana lisosomiale mediante l'interazione con il recettore

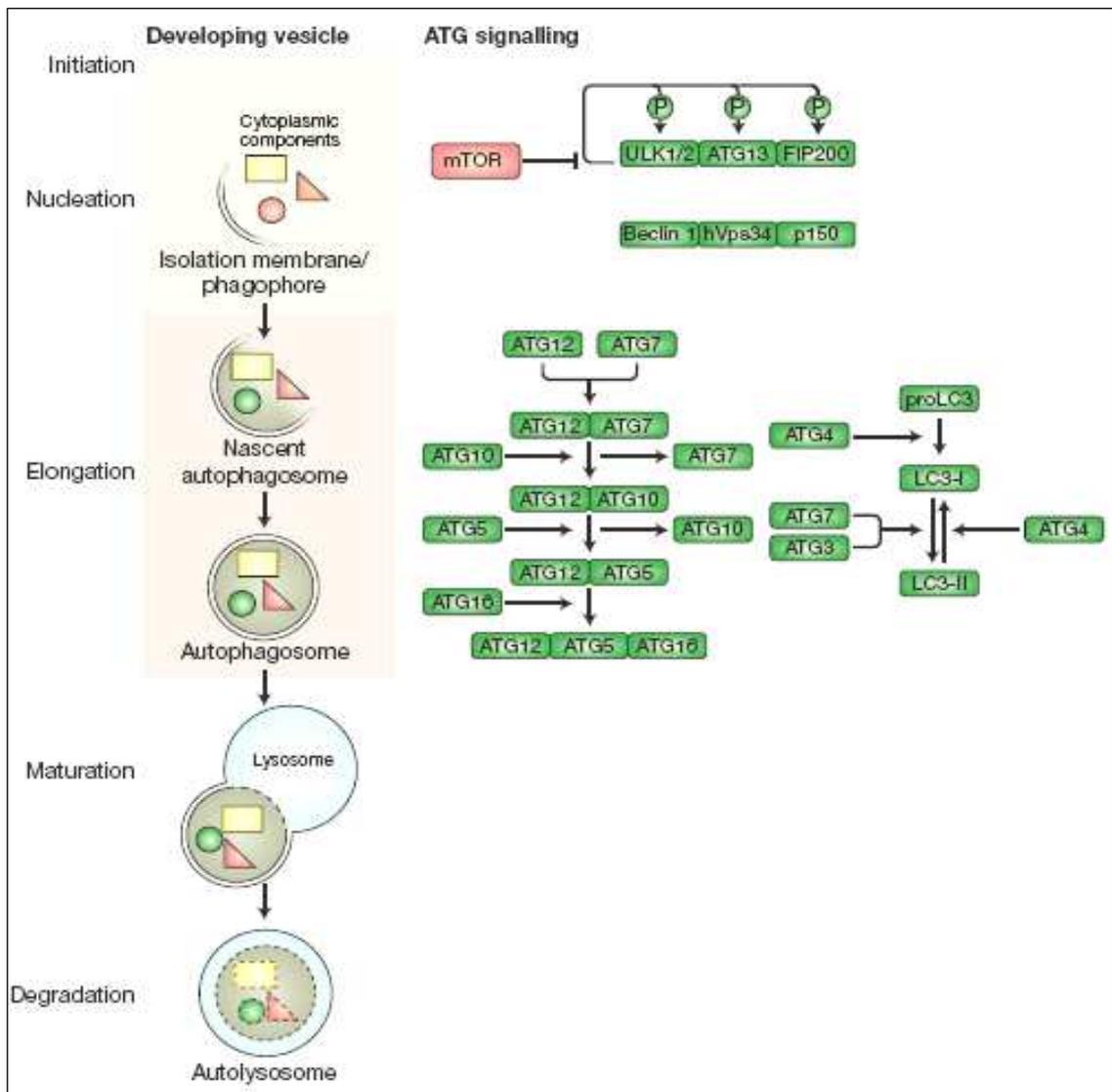
LAMP-2° e ciò favorisce il trasporto del materiale da degradare all'interno dell'organulo.

Il carattere selettivo di CMA fa sì che questa forma d'autofagia sia attivata quando la discriminazione tra le proteine da degradare è importante. Durante condizioni di stress, come per esempio la mancanza di nutrienti, l'attività di CMA aumenta dopo che la macroautofagia, anch'essa attivata, comincia a calare. Questa attivazione sequenziale di una via autofagica non-selettiva, seguita da una selettiva, può essere finalizzata ad evitare la degradazione di componenti cellulari essenziali in caso di un digiuno prolungato. La microautofagia è coinvolta nell'inglobamento e nella degradazione di regioni complete del citosol, inclusi proteine e organuli citoplasmatici, direttamente da parte dei lisosomi, senza richiedere la formazione di vacuoli autofagici intermedi. Il lisosoma, infatti, per invaginazione o estroflessione, avvolge il citoplasma e in seguito si chiude a formare una vescicola interna che contiene il materiale da degradare. La microautofagia è stata tradizionalmente considerata come una forma di autofagia attiva per garantire il turnover delle proteine a lunga vita in condizioni basali, ma studi recenti la ritengono anche responsabile, in parte, della degradazione dei perossisomi. La macroautofagia o autofagia è un processo dinamico responsabile della degradazione sia di proteine solubili a lunga vita che di organuli in condizioni di stress. Essa comporta la formazione di vacuoli a doppia membrana (autofagosomi) che sequestrano porzioni di citoplasma e sono destinati a fondersi con i lisosomi per generare autolisosomi che degradino il materiale

mediante l'azione delle idrolasi lisosomiali per poi riciclarne i prodotti di degradazione. Il processo autofagico è governato da un gruppo di geni, denominati ATG (autophagy-related genes) e può essere diviso nelle seguenti fasi:

- *Iniziazione*: il segnale deriva dal sensore per il nutrimento mTOR che termina di inibire un complesso serina/treonina chinasi contenente ULK 1/2, ATG13 e FIP200. Tale complesso, una volta attivato, è responsabile della formazione di una membrana di isolamento o fagoforo che circonda parzialmente il materiale da degradare.
- *Formazione dell'autofagosoma*: la nucleazione di un autofagosoma prematuro dipende dall'attività della chinasi hVps34 (PIK3 class III) e dalla sua associazione con la proteina Beclin 1 e p150/Vps35. A questa operazione segue la chiusura dell'autofagosoma operata da due sistemi di coniugazione simili all'ubiquitina (ATG5–ATG12 e LC3-II). Il primo è attivato da ATG7 e porta alla formazione di un complesso multimerico composto da ATG5–ATG12-ATG16, la cui azione è fondamentale per dirigere l'inserimento di LC3 nella membrana dell'autofagosoma. LC3 è un marker autofagico molto utilizzato e viene inizialmente sintetizzato dalla cellula come precursore (proLC3) per essere poi successivamente processato a LC3-I da ATG4. La sua completa maturazione

- (LC3-II) si ottiene mediante la coniugazione a fosfatidiletanolamina (PE) sulla superficie dell'autofagosoma.
- *Maturazione e degradazione*: il meccanismo molecolare alla base della maturazione richiede l'azione di proteine lisosomiali come LAMP1 e LAMP2, la GTPasi Rab7, la proteina UVRAG (ultraviolet-radiation-resistance-associated gene) e altre molecole. UVRAG indirizza le proteine chiamate “tethering proteins” alla membrana dell'autofagosoma e in questo modo attiva Rab7 per facilitare la fusione con il lisosoma. L'autolisosoma formato è una vescicola a pH acido contenente molti enzimi, tra cui la catepsina, che tramite un processo catabolico degradano peptidi e altri costituenti cellulari per rifornire la cellula di materiali ed energia sufficienti alla sopravvivenza.



Rappresentazione schematica della via autofagica

MATERIALI E METODI

Animali

Ratti Sprague-Dawley, maschi e femmine (7 settimane) sono stati acquistati dalla Harlan Italia. I ratti sono stati alloggiati in 2-3 esemplari per gabbia, mantenendo un ciclo di 12-ore di luce /buio. Inoltre sono stati alimentati con acqua e cibo a volontà. I protocolli sperimentali sono state effettuati in conformità alla legge italiana (DL 116 del 1992) e dei principi della NIH statunitense riguardante la relativa cura degli animali da laboratorio (NIH 80-33, riveduta nel 1996).

Gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, la cavità addominale è stata aperta per laparotomia al fine di esporre il fegato, i reni ed il cuore. Gli organi rapidamente rimossi, pesati, omogeneizzati in PBS freddo, conservati a -80 C e utilizzati entro un mese. Parte del fegato, del cuore e dei reni è stato utilizzato per la colorazione immunoistochimica, fissato e inclusi in paraffina. Il totale contenuto proteico dei parenchimi estratti è stato misurato con il metodo Lowry (Lowry et al. 1951)

Western Blotting

Tramite analisi Western Blotting è stata determinata l'espressione proteica di actina totale, β -tubulina, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), beclin1, LC3, Mtor e LAMP-1. L'esame è stato eseguito su omogeneizzati di fegato, cuore e rene prelevando 80 micro grammi di proteine per ogni campione. La reazione è stata effettuata utilizzando anticorpi monoclonali (Cell Signalling Technology, DBA Italia, Italy) relativi le proteine esaminate, sviluppati su siero di coniglio (Sigma Aldrich, Italia). Le proteine specifiche sono state rilevate da reazione di chemiluminescenza (LumiGLO, Cell Signalling Technology, DBA Italia, Italy), seguita da analisi densitometrica di immunoblot tramite software dedicato (Labworks).

Analisi densitometrica e statistica

L'analisi densitometrica delle lastre fotografiche è stata effettuata mediante il software LabWorks e l'analisi statistica mediante il software SigmaStat 3,1. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata confrontando i dati relativi il parenchima epatico, il cuore ed i reni dei ratti maschi e femmine. Per valutare la distribuzione di campioni sono stati utilizzati i test di Kolmogorov-Smirnov e di Shapiro i. Le variabili parametriche sono state analizzate utilizzando il test t di Student. Variabili non parametriche sono state confrontate tra i gruppi con il Mann-Whitney rank test. Per

tutte le prove un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Immunofluorescenza

Prima di procedere con l'immunomarcatura le sezioni devono essere sparaffinate come segue:

- 1) Due bagni successivi in xylene per 10 minuti ognuno.
- 2) Due bagni in etanolo assoluto per 10 minuti ognuno.
- 3) Due bagni in etanolo al 95% per 10 minuti ognuno.
- 4) Due lavaggi in acqua distillata per 5-10 minuti.
- 5) 1h di incubazione con siero AB.

Per il blocco dei siti aspecifici le sezioni vanno incubate per 1 ora in tampone fosfato (PBS, pH7,4) con siero AB al 10%

- 1) Coprire la sezione con una goccia di Triton 0.5% per 5 minuti
- 2) Lavare 2 volte con PBS
- 3) Aggiungere l'Ab primario per LC3 e LAMP-1 rispettivamente (30 minuti a temperatura ambiente)
- 4) Lavare tre volte in PBS
- 5) Aggiungere l'Ab secondario fluorescente (30 minuti a temperatura ambiente)
- 6) Lavare tre volte in PBS

Aggiungere sul vetrino una goccia di PBS /Glicerolo (1:2) e coprire con un vetrino coprioggetto.

L'analisi della localizzazione dei 2 marker di autofagia è stata effettuata attraverso un microscopio a fluorescenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli esperimenti sono stati condotti prelevando fegati, rene, e cuore da ratti maschi e femmine della stessa età (sette settimane) privilegiando l'età rispetto al peso corporeo poichè i processi autofagici variano in funzione dell'età. Ovviamente il peso corporeo era più elevato nei maschi rispetto alle femmine. Infatti, i maschi e le femmine pesavano 220 ± 16 g e 190 ± 11 g, rispettivamente ($P<0.001$).

1. Fegato

A livello epatico è stata osservata una maggiore espressione di mTOR e beclina nei maschi, benché tale differenza non sia statisticamente significativa (Fig. 1).

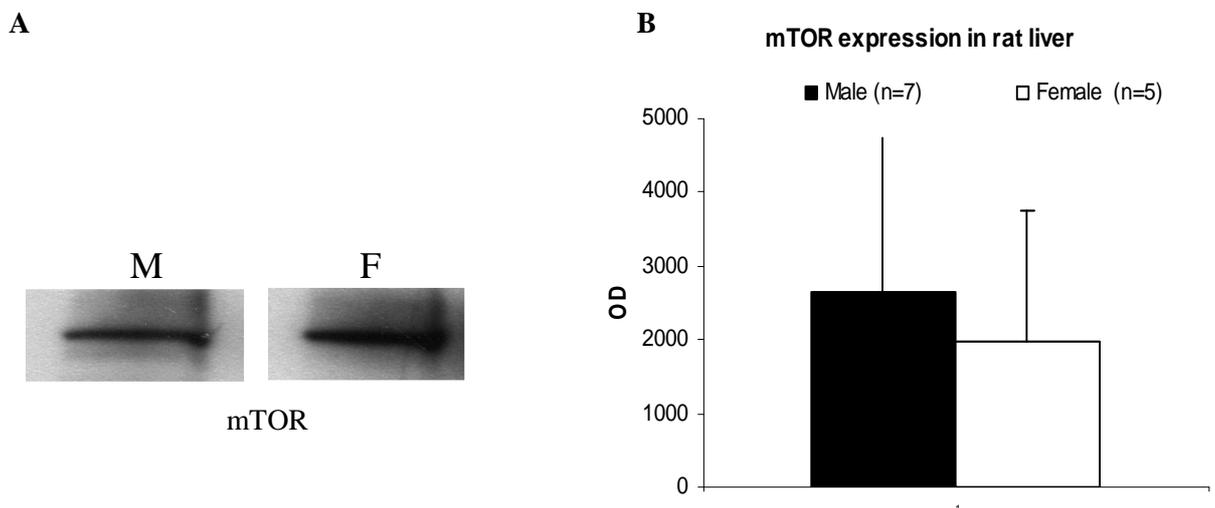


Fig. 1: immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di mTOR (panel B) nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come media \pm deviazione standard.

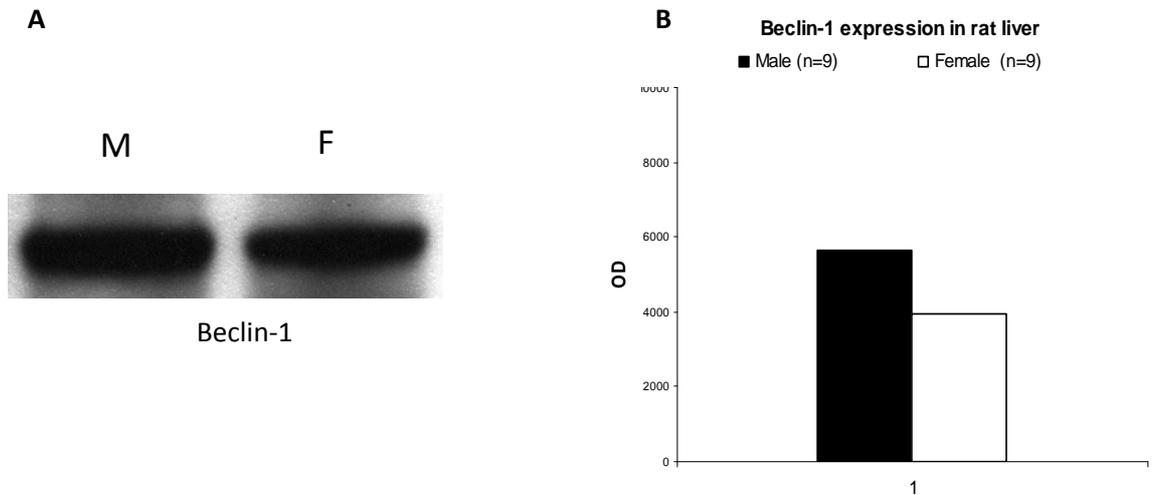


Fig. 2 Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di beclin-1 (panel B) nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come mediana.

LC3-I e LC3-II sono espresse in maniera simile nei due generi (Fig. 3). Dall'analisi densitometrica del rapporto fra le due frazioni di LC3, che indica un'attiva formazione dei vacuoli autofagici, non si riscontrano differenze significative (Fig. 3), benché l'immunofluorescenza indichi una maggiore presenza di LC3 nei fegati degli animali di sesso maschile (Fig. 4).

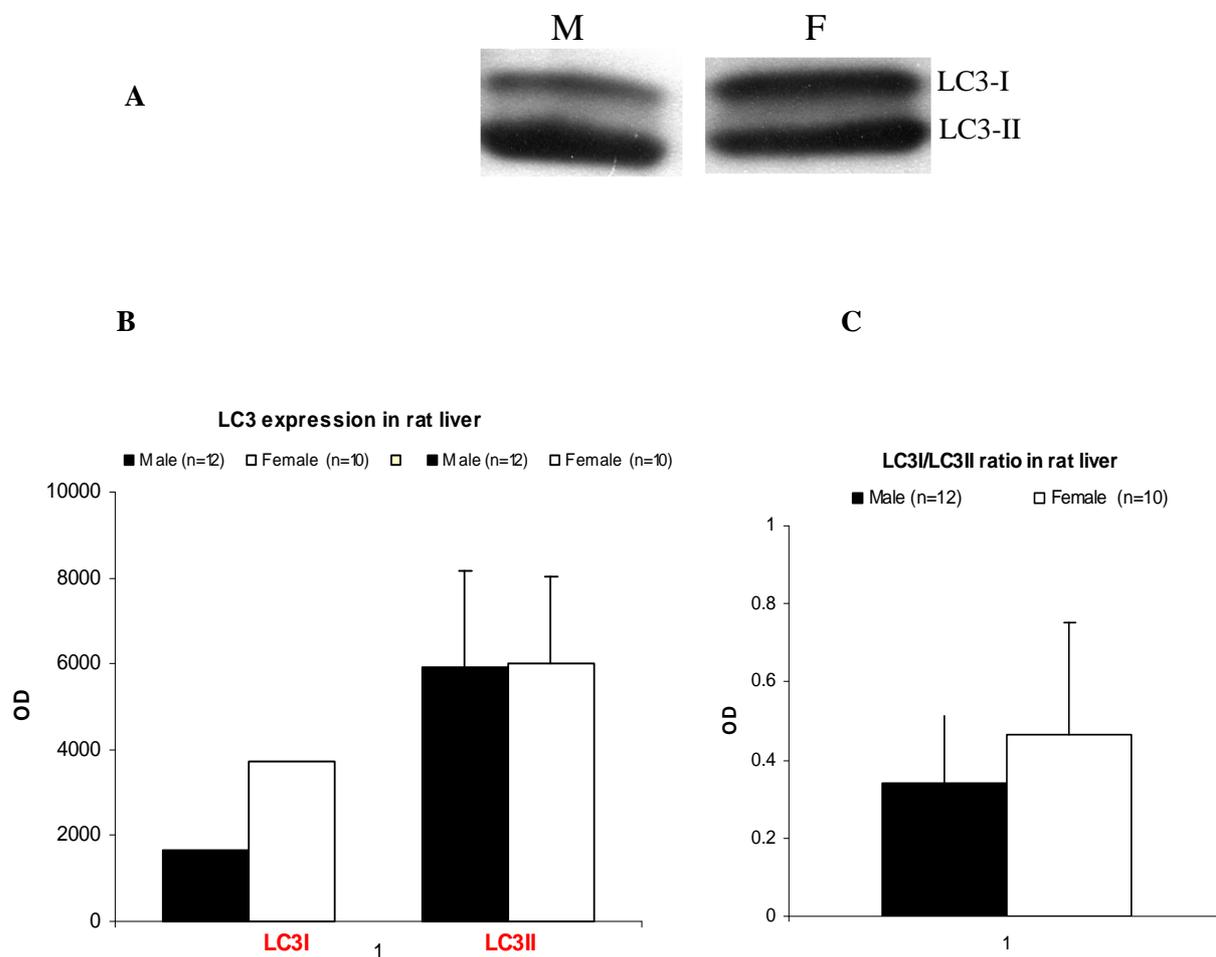


Fig. 3: Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A), analisi densitometrica dell'espressione di LC3-I e LC3-II (panel B) e rapporto LC3-I/LC3-II (panel C) nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come mediana per LC3-I e come media±deviazione standard per LC3-II.

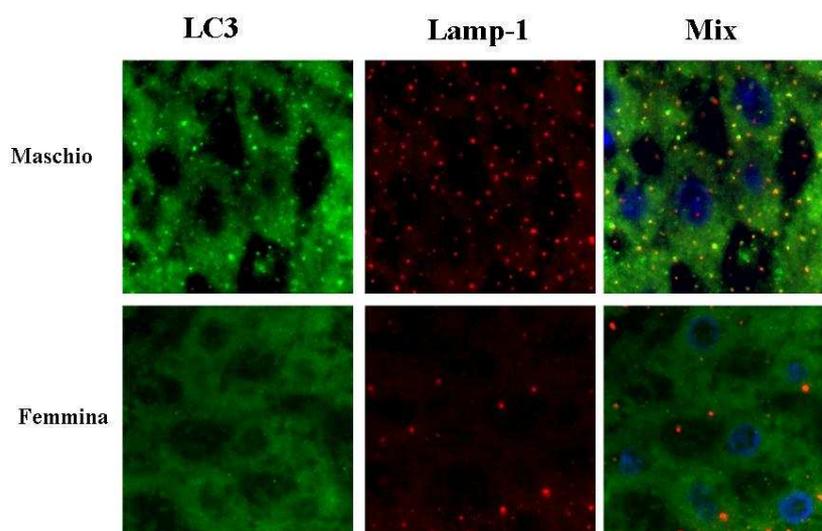


Fig. 4: Immagini rappresentative dell'analisi per immunofluorescenza di LC3 totale e LAMP-1 nei fegati di ratti maschi e femmina. Gli spot arancio indicano la co-localizzazione dei 2 marker.

I maschi, inoltre, presentano una espressione significativamente superiore di Lamp-1, e questo dato è stato confermato sia dall'analisi densitometrica che dall'immunofluorescenza (figure 4, 5), indicando pertanto un maggior numero di lisosomi nel fegato maschile.

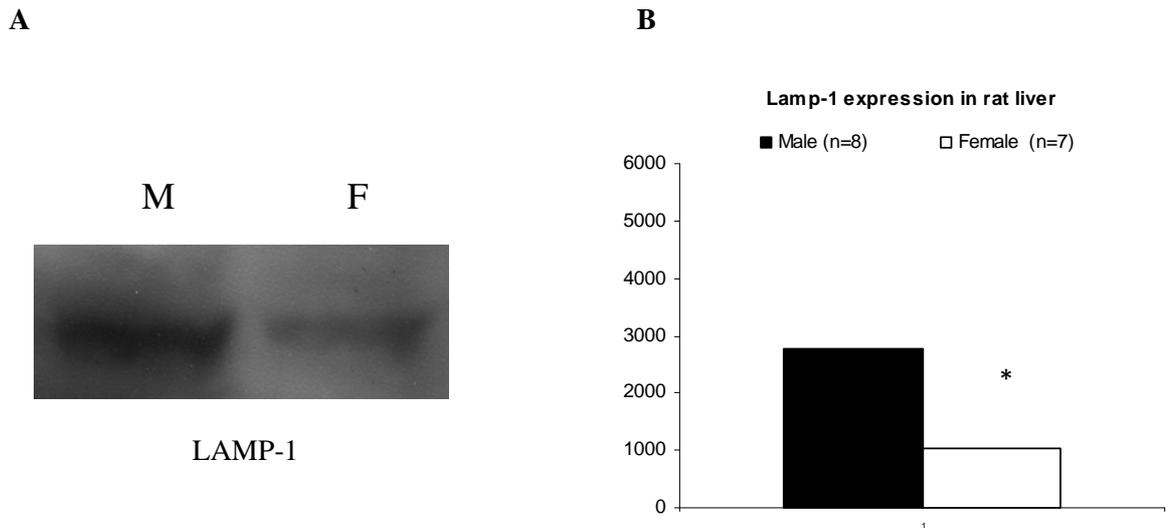


Fig. 5: Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di LAMP-1 (panel B) nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come mediana.

A livello epatico esiste una correlazione positiva tra LAMP e LCII nei fegati ottenuti da animali di sesso maschile ($y = 3,459X + 15,33$; $r = 0,79512$ $P = 0,017$) ma non in quelli ottenuti da animali di sesso femminile.

I dati riguardanti l'espressione delle proteine, ottenuti attraverso l'analisi Western Blot, sono qui riportati senza una normalizzazione con una proteina costitutiva. Gli stessi sono invece stati normalizzati per le proteine totali poiché esse risultano essere uguali nei fegati che originano da animali maschi ed animali femmine (Fig. 3, 5). Abbiamo infatti osservato che i livelli di 3 importanti proteine costitutive (actina, β -tubulin e gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi), normalmente utilizzate per la

normalizzazione dei dati presentano differenze significative tra i due generi.

Come riportato in figura 6 l'espressione di actina e GAPDH è significativamente superiore nelle femmine rispetto ai maschi, mentre l'espressione della β -tubulin è significativamente inferiore nei fegati dei ratti maschio.

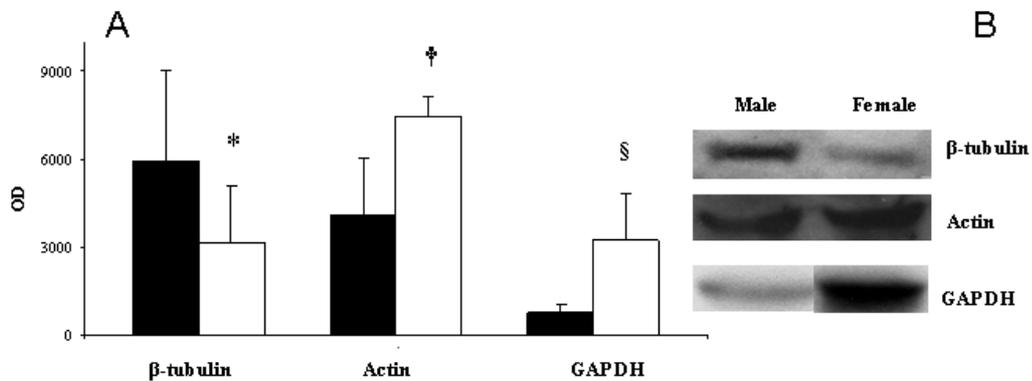


Fig. 6: analisi densitometrica (panel A) e immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel B) dell'espressione di β -tubulina, actina and GAPDH nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono riportati come media \pm deviazione standard di 5 campioni indipendenti per gruppo.* P=0.006; † P=0.048; § P=0.017.

Questi risultati sono in linea con dati precedenti (Ferguson et al. 2005; Perrot-Sinal et al. 2001; Verma and Shapiro 2006). Poiché le proteine costitutive sono utilizzate per normalizzare i dati, le differenze di genere osservate nella loro espressione sollevano un problema relativo alla corretta selezione di un'appropriata proteina

costitutiva. Pertanto negli studi di genere gli standard interni devono essere adeguatamente indagati in funzione del tipo cellulare e del tessuto al fine di evitare errori metodologici che compromettano la riproducibilità dei risultati.

2. Cuore

A livello cardiaco è stata osservata una maggiore espressione, statisticamente significativa, sia di mTOR che di beclina nei maschi rispetto alla femmine (fig. 7)

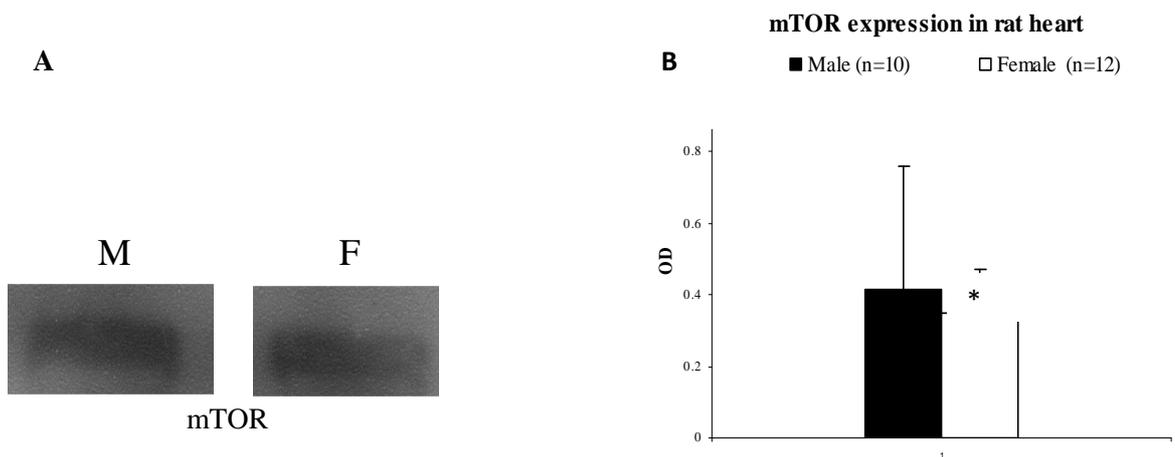


Fig. 7: immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di mTOR (panel B) nei cuori di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come media±deviazione standard. .* P=0.042.

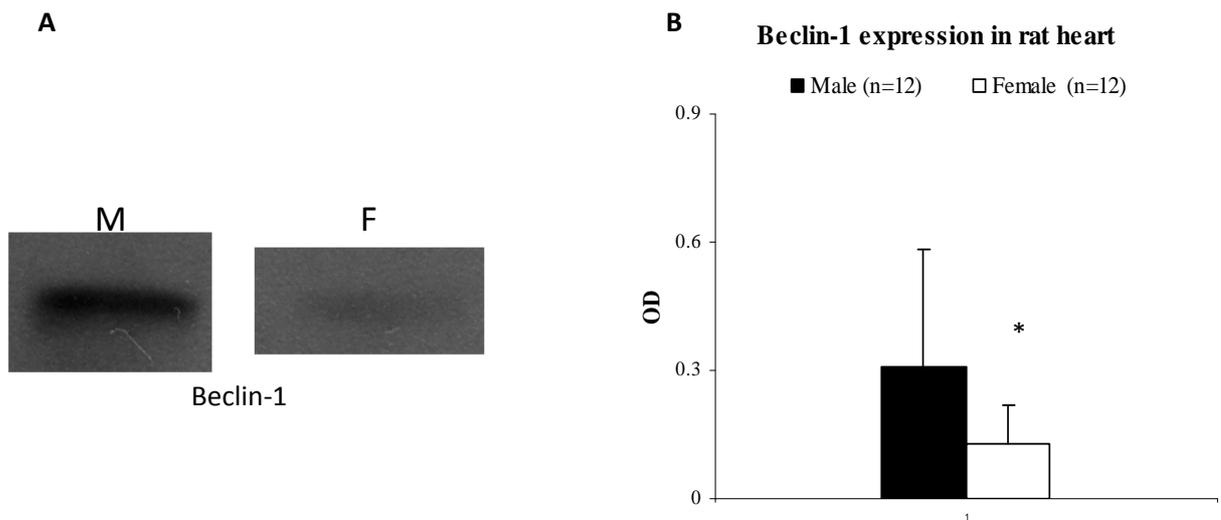


Fig. 8: immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di beclin-1 (panel B) nei cuori di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come media±deviazione standard. * P=0.038.

Anche in questo caso LC3-I e LC3-II sono espresse in maniera simile nei due generi (Fig. 9). Tuttavia, il rapporto LC3-I/LC3-II risulta essere significativamente maggiore nelle femmine, facendo ipotizzare che i maschi possano trovarsi in uno stato autofagico più avanzato. Tale dato è supportato dall'analisi dell'immunofluorescenza, dalla quale è emerso che nei maschi è presente una maggiore colocalizzazione di LC3 e Lamp-1 (Fig. 10).

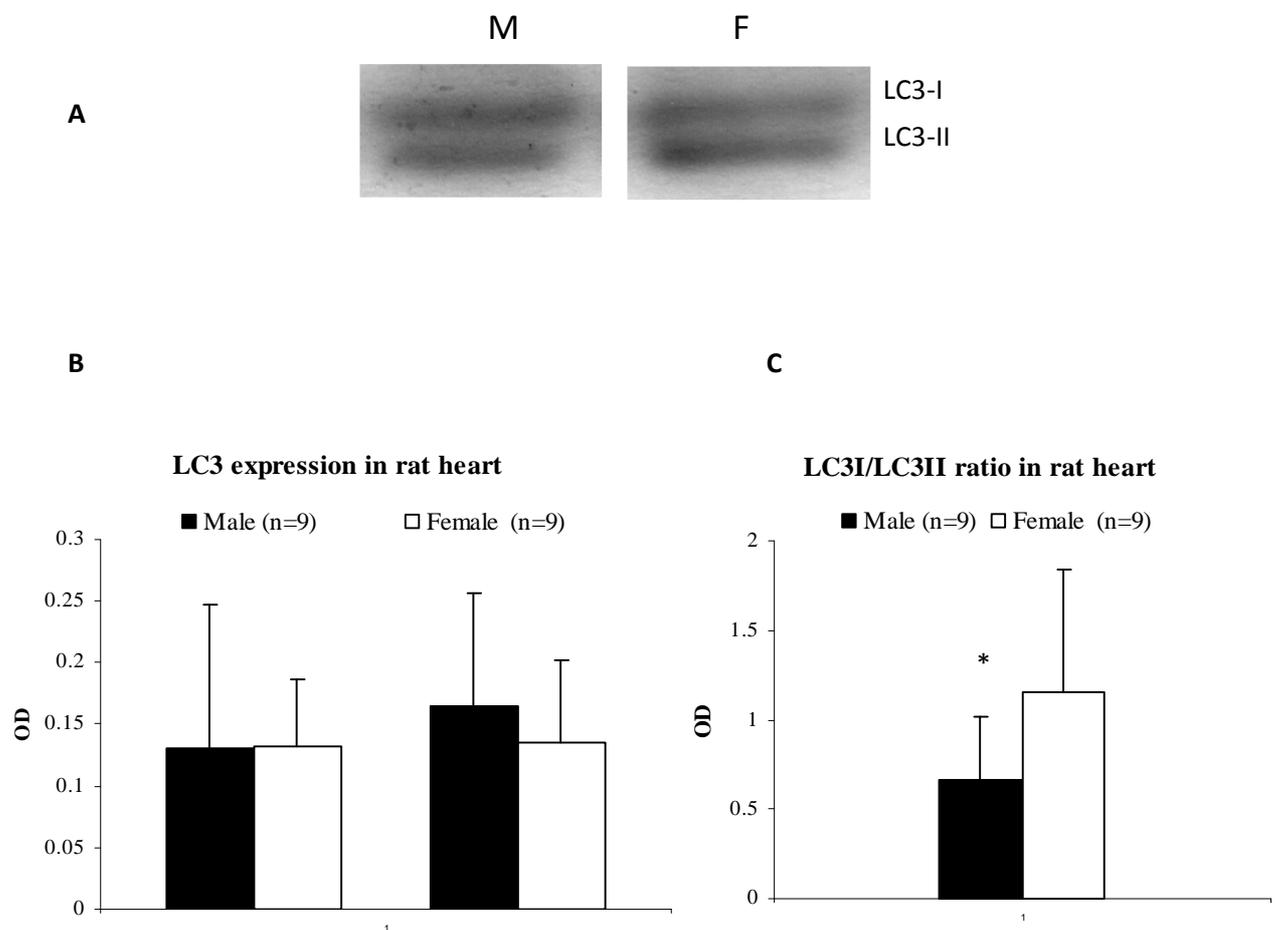


Fig. 9: Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A), analisi densitometrica dell'espressione di LC3-I e LC3-II (panel B) e rapporto LC3-I/LC3-II (panel C) nei cuori di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come media±deviazione standard. * P=0.006.

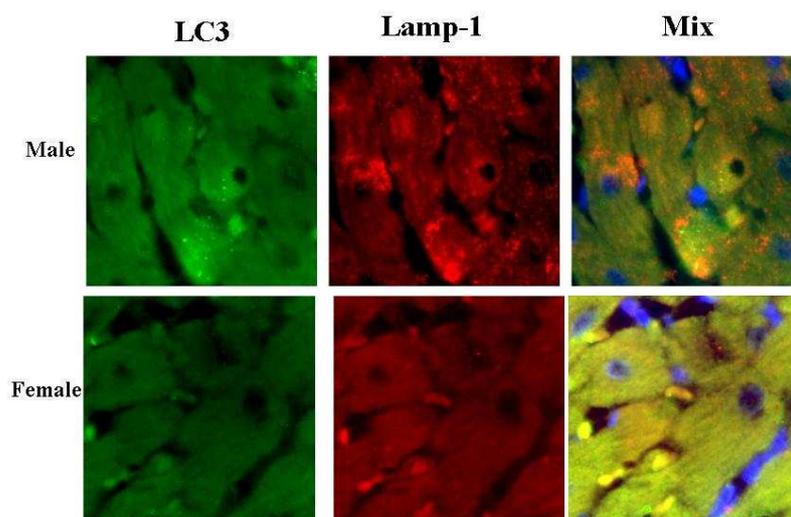


Fig. 10: Immagini rappresentative dell'analisi per immunofluorescenza di LC3 totale e LAMP-1 nei fegati di ratti maschi e femmina. Gli spot arancio indicano la co-localizzazione dei 2 marker.

Tra LAMP e LCII non esiste nessuna correlazione nei cuori ottenuti sia da femmine che da maschi.

3. Rene

I dati ottenuti nei reni provenienti da ratti maschi e femmina non mostrano nessuna differenza significativa nei livelli di espressione di mTOR, LC3 e Lamp-1, nonostante la colorazione attraverso la metodica di immunofluorescenza avesse messo in evidenza, anche in questo caso, una maggiore co-localizzazione di LC3 e Lamp-1 nei maschi. Tale dato apparentemente contrastante potrebbe essere dovuto alla numerosità campionaria utilizzata per le analisi Western blot e pertanto andrà ulteriormente approfondito.

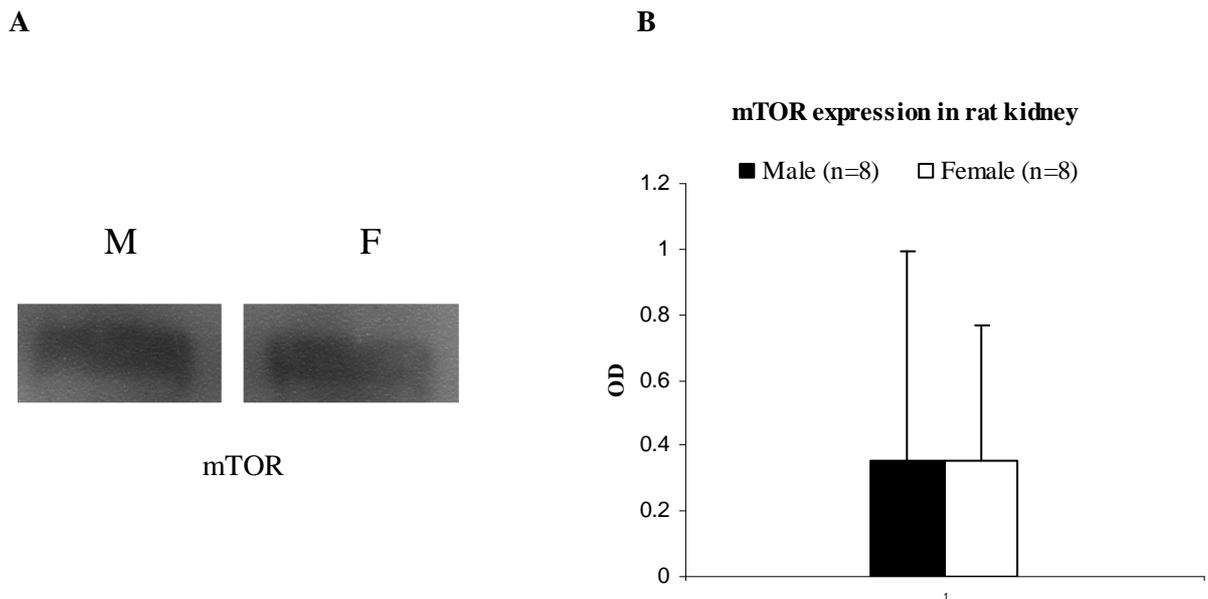


Fig. 11: immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di mTOR (panel B) nei reni di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come $media \pm$ deviazione standard.

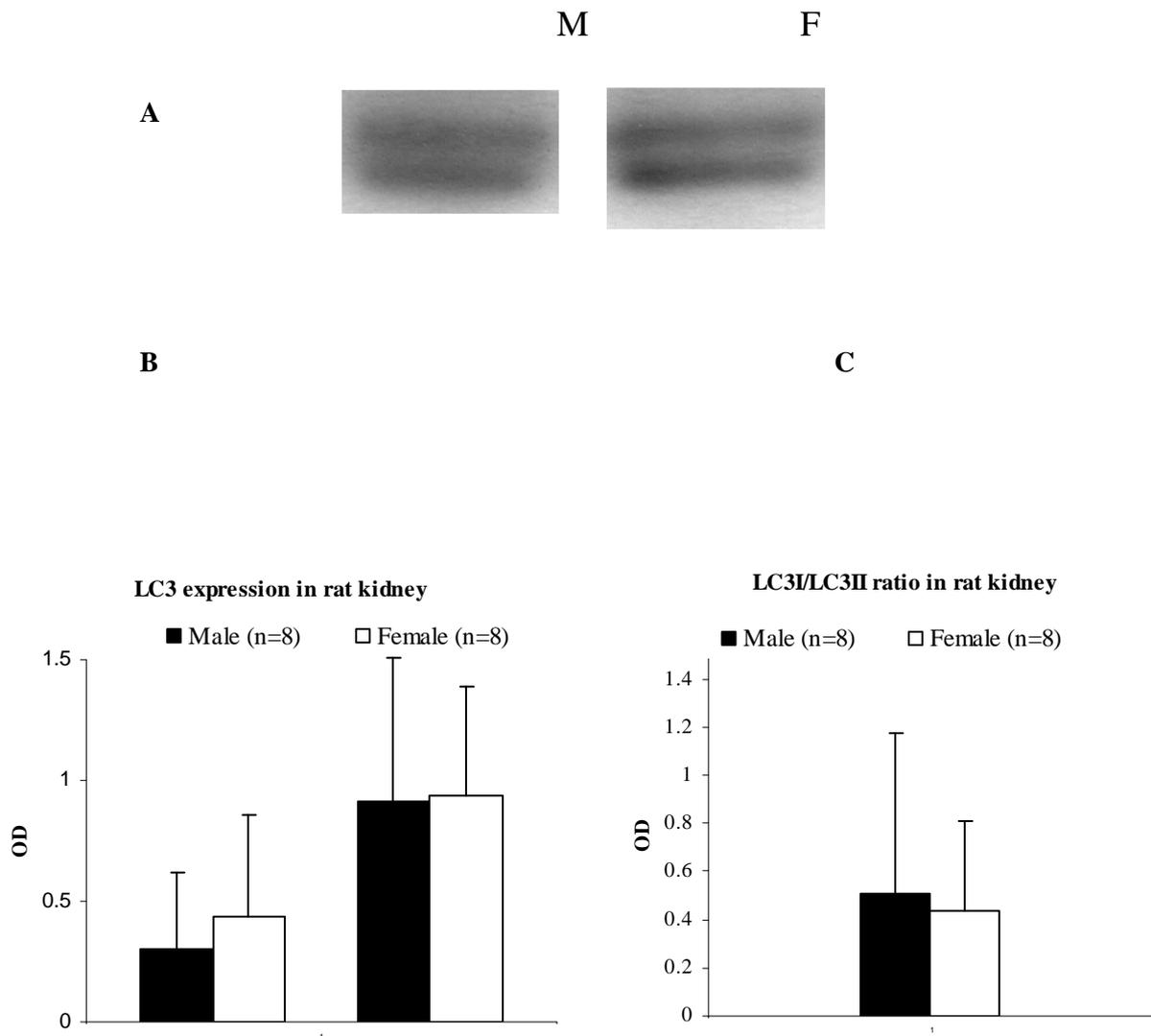


Fig. 12: Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A), analisi densitometrica dell'espressione di LC3-I e LC3-II (panel B) e rapporto LC3-I/LC3-II (panel C) nei cuori di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come media \pm deviazione standard. * P=0.006.

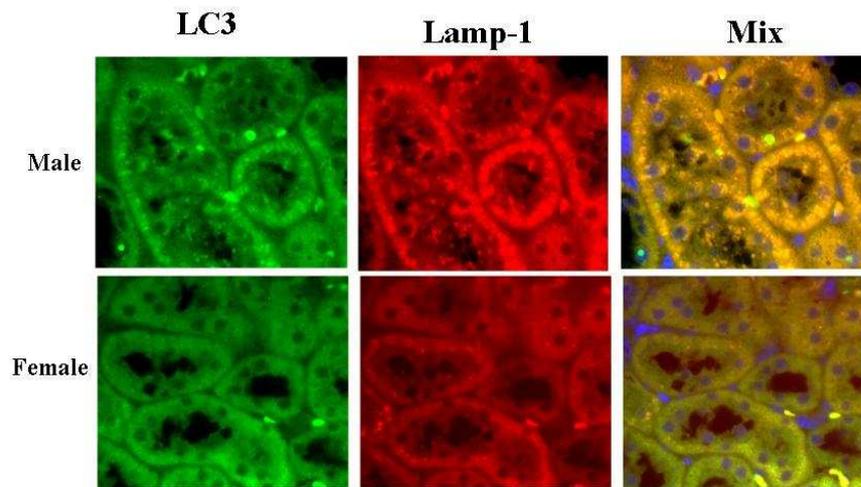


Fig. 13: Immagini rappresentative dell'analisi per immunofluorescenza di LC3 totale e LAMP-1 nei reni di ratti maschi e femmina. Gli spot arancio indicano la colocalizzazione dei 2 marker.

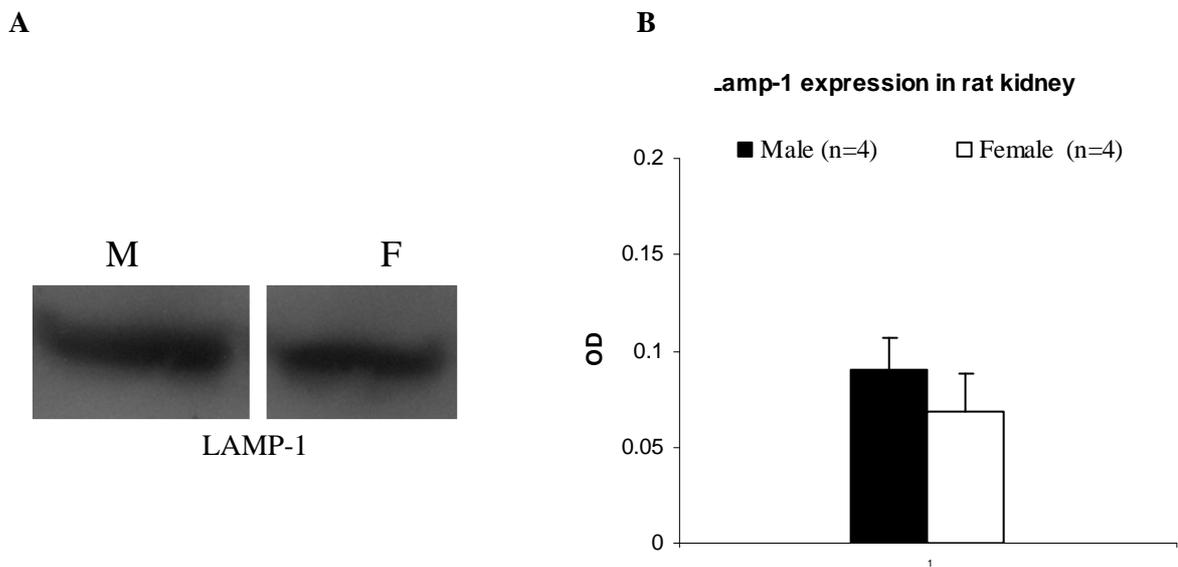


Fig. 14 Immagine rappresentativa dell'analisi Western blot (panel A) e analisi densitometrica dell'espressione di LAMP-1 (panel B) nei fegati di ratti maschi e femmina. I dati per l'analisi densitometrica sono espressi come $media \pm deviazione$ standard.

Nei reni ottenuti ($y = 3,409X - 928,63$; $r = 0,812$ $P=0.0128$) da animali maschi, come nel fegato, esiste una correlazione positiva tra LAMP e LC3II che non è presente nei reni che originano da animali di sesso femminile.

Nelle cellule di mammifero, l'autofagia è un processo cellulare complesso, universale, altamente conservato e regolato, ATP-dipendente e coinvolge il riarrangiamento di membrane subcellulari al fine di sequestrare citoplasma ed organuli da degradare nei lisosomi. (Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1383-435, Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1344-8). Il processo autofagico è coinvolto nel rimodellamento durante lo sviluppo ed il differenziamento cellulare, nella degradazione delle proteine intracellulari con conseguente liberazione di aminoacidi in caso di digiuno, nel controllo del meccanismo della morte cellulare programmata di tipo II (non-apoptotica) e in tante altre funzioni (Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;Jan 11;132(1):27-42, Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(4):210-40.)Ravikumar et al, 2010).

Esistono vari tipi di autofagia: la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia chaperone-mediata: in questo studio ci siamo occupati della macroautofagia. Essa comporta la formazione di vacuoli a doppia membrana (autofagosomi) che sequestrano il materiale che deve essere eliminato e, formando i cosiddetti autofagosomi tardivi, lo

portano ai lisosomi (Ravikumar et al, 2010) nei quali, dopo la fusione, il materiale fagocitato viene degradato dagli enzimi lisosomiali. Una volta degradate le sostanze molecolari semplici contenute nel vacuolo, le stesse sono riassorbite o utilizzate dalle cellule o messe a disposizione dell'organismo (Ravikumar et al, 2010).

La regolazione aminoacidica ed insulinica della autofagia sembra convergere sull'enzima Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), una chinasi che attiva la sintesi proteica e nel contempo inibisce l'autofagia. (Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature. 2006 May 25;441(7092):424-30, Rabinowitz JD, White E, 2010) Proprio per il suo ruolo abbiamo misurato la sua espressione nei diversi organi: in modo significativo, il sesso degli animali influenza l'espressione di mTOR ed ancora più rilevante, a nostro avviso, è il fatto che esso avvenga in maniera organo specifico. In particolare, nel fegato e nel rene non esistono differenze significative fra i due sessi, mentre nel cuore mTOR è meno espressa nelle femmine che non nei maschi suggerendo l'importanza del singolo tipo cellulare nello svilupparsi delle differenze di genere.

Poiché nelle cellule di mammifero la classe III PI3K forma un complesso con la proteina Beclin-1 (Rabinowitz JD, White E), complesso che gioca un ruolo chiave nel reclutamento delle membrane da varie strutture per l'allungamento della membrana dell'autofagosoma in seguito a vari stimoli, abbiamo misurato anche l'espressione di questa proteina. Dai nostri dati si evidenzia che la

beclina non è modificata nel fegato, mentre è ridotta nelle femmine a livello cardiaco indicando che nei cuori ottenuti dalle femmine vi è una minore tendenza ad iniziare i processi autofagici rispetto ai maschi. Anche in questo caso, si evidenzia che le differenze di sesso sono organo specifiche e che le variazioni di mTOR e beclina avvengono in parallelo.

La Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) è invece coinvolta nella formazione dell'autofosoma (Rabinowitz JD and White E 2010) e per questo motivo LC3 può essere usato come marker dell'autofosoma nelle cellule di mammifero (Rabinowitz JD, White E). Ancora una volta differenze significative sono viste solo a livello cardiaco dove il rapporto tra le due forme di LC3 è più basso nel maschio che nella femmina indicando che il cuore dei maschi è meno soggetto all'autofagia basale.

Differenze di genere nei processi autofagici fino ad ora sono stati descritti solo su modelli cellulari (Straface et al, 2009; Du L et al. 2009), ed esattamente nelle cellule muscolari lisce di aorta di ratto che in condizioni basali presentano lo stesso livello di beclina, a differenza della LC3II che è più alta nelle cellule maschili rispetto alle cellule femminili. Dopo esposizione a stress ossidativo si osserva che le isoforme di LC3 sono aumentate nelle cellule femminili mentre sono diminuite in quelle maschili. Per quanto riguarda la beclina, invece, solo nelle cellule femminili si assiste ad un aumento dell'espressione di questa proteina che fra l'altro sembra non solo essere legata all'autofagia, ma anche ad uno degli attori che guida lo shift

dall'autofagia all'apoptosi. In relazione ai neuroni è stato osservato che dopo starvation i neuroni di sesso maschile vanno più facilmente incontro ad autofagia e conseguente morte cellulare, mentre quelli femminili mobilizzano gli acidi grassi ed accumulano trigliceridi, sopravvivendo più a lungo (Du, L., Hickey, R.W., Bayir, H., Watkins, S.C., Tyurin, V.A., Guo, F., Kochanek, P.M., Jenkins, L.W., Ren, J., Gibson, G., Chu, C.T., Kagan, V.E. and Clark, R.S. (2009) Starving neurons show sex difference in autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 2383–2396.). Altre differenze genere specifiche sia nella autofagia basale che indotta dal digiuno sono presenti anche nelle cellule endoteliali ottenute da cordoni di feto maschio e feto femmine (Franconi F comunicazione personale).

Dai dati emerge altresì che in generale i maschi contengono più Lamp rispetto alle femmine, anche se biochimicamente il dato è statisticamente significativo solo a livello epatico. Il maggior numero dei lisosomi negli organi ottenuti da ratti maschi potrebbe aumentare la probabilità di colocalizzazione tra i due marker come indicato negli esperimenti di istochimica. Questa ipotesi è in parte confermata dalla correlazione lineare presente tra LAMP e LC3-II maggiormente nei maschi che non nelle femmine. In altre parole una più marcata presenza di lisosomi fa sì che l'autofagosoma abbia una maggiore probabilità di fondersi con il liposoma e quindi di rendere più "efficiente" tutto il fenomeno. Questo è più rilevante nel fegato. Il fegato è l'organo maggiormente interessato dall'incremento autofagico-proteolitico durante il digiuno (Mizushima et al., 2004).

Fino ad oggi non sono state descritte differenze significative in funzione del genere a livello lisosomiale a parte alcune sporadiche segnalazioni come la maggior presenza di lisosomi giganti a livello del rene di topo nel ceppo di DBA2 (Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Nishinakagawa H. Sex- and strain-dependent histological features of the proximal convoluted tubular epithelium of mouse kidney: association with lysosomes containing apolipoprotein B. *Histol Histopathol.* 2002 17(1):1-7). È stato visto inoltre che la secrezione cardiaca degli enzimi lisosomiali era più alta nei maschi che non nelle femmine e che queste differenze dipendevano dal ciclo ormonale e dalla somministrazione di ormoni (Kan AM, Matiushin AI. [Effect of sex steroids on the activity of cardiac lysosomal enzymes]. *Probl Endokrinol (Mosk).* 1991;37(1):53-4; Koenig H, Goldstone A, Lu CY. Testosterone-mediated sexual dimorphism of the rodent heart. Ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens. *Circ Res.* 1982 Jun;50(6):782-7.).

In conclusione, i dati indicano che esistono differenze che sono sesso dipendenti e che l'effetto del sesso deve essere indagato sul singolo organo perchè gli effetti di questo determinante appaiono essere organo specifico. A nostro avviso, un'altra importante variabile da considerare è l'età e lo stato ormonale. Accanto a questo vogliamo sottolineare che appare urgente e non più rimandabile indagare la struttura e la funzione dei lisosomi in funzione del sesso-genere avendo ben presente che prima di procedere è necessario andare ad analizzare i parametri con cui s'intendono normalizzare i dati.

In definitiva, visto il ruolo della autofagia nelle varie patologie dal cancro, alla neurodegenerazione, al diabete ecc è urgente studiare questo fenomeno in maniera genere specifico.

CONCLUSIONI

L'analisi delle caratteristiche metaboliche e del microambiente della cellula, considerata la principale unità minima che compone i diversi tessuti, è stata oggetto di numerosi studi. Ciò, è dovuto al fatto che eventuali modificazioni del micro ambiente extra ed intra-cellulare, vengono considerati fattori chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare che, a sua volta, regola l'omeostasi dei tessuti.

Alterazioni di micronutrienti o del loro utilizzo da parte della cellula, la mancanza di specifiche sostanze nutritive o l'eccesso di altre, causano modificazioni del destino cellulare, ad esempio nei tassi di proliferazione o nella morte. Ogni cambiamento nel destino cellulare si ripercuote sull'intero sistema. La letteratura presente sottolinea che le patologie spesso mostrano differenze significative tra i sessi. Molte se non tutte le malattie cardiovascolari, respiratorie, neurodegenerative, riflettono o sono dovute ad alterazioni nel metabolismo cellulare e/o ad alterazioni dei bisogni nutrizionali. Essi sono infatti il risultato di un complesso quadro di eventi che richiede un equilibrio continuo di segnali intracellulari che decidono per la sopravvivenza o la morte delle cellule.

Col nostro studio è stato dimostrato che esistono differenze nel destino cellulare che dipendono dal sesso e dal genere. Infatti complessivamente i nostri dati confermano che l'autofagia, così come tutti quei processi metabolici coinvolti nell'omeostasi cellulare, sono sia sesso-genere dipendente che tessuto dipendente, e ciò potrebbe

richiedere un riesame dei meccanismi molecolari coinvolti nei diversi pathway patologici, in una prospettiva di genere.

BIBLIOGRAFIA

- Aras M. A. and E. Aizenman "Redox Regulation of Intracellular Zinc: Molecular Signaling in the Life and Death of Neurons." Antioxid Redox Signal.
- Assmann G and H. Schulte (1992). "The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study." Eur J Epidemiol. 8(1): 99-103.
- Augustin H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays 16(12): 901-6.
- Barilli A., R. Visigalli, et al. (2008). "In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function." Cardiovasc Res 78(3): 563-71.
- Bruno P., A. Calastretti, et al. (2007). "Cell survival under nutrient stress is dependent on metabolic conditions regulated by Akt and not by autophagic vacuoles." Cell Signal 19(10): 2118-26.
- Camper-Kirby D., S. Welch, et al. (2001). "Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males." Circ Res 88(10): 1020-7.
- Ceylan-Isik A. F., K. H. LaCour, et al. (2006). "Gender disparity of streptozotocin-induced intrinsic contractile dysfunction in murine ventricular myocytes: role of chronic activation of Akt." Clin Exp Pharmacol Physiol 33(1-2): 102-8.
- Chen J. H., C. N. Hales, et al. (2007). "DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?" Nucleic Acids Res 35(22): 7417-28.
- Criollo A., J. M. Vicencio, et al. (2007). "The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy." Autophagy 3(4): 350-3.
- Crotzer V. L. and J. S. Blum (2008). "Cytosol to lysosome transport of intracellular antigens during immune surveillance." Traffic 9(1): 10-6.
- De Virgilio C. and R. Loewith (2006). "The TOR signalling network from yeast to man." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38(9): 1476.

- Du L., R. Whickey., et al. (2009). "Starving neurons show sex difference in autophagy." J Biol Chem 284(4): 2383-96.
- Fortemaison N., F. Miot, et al. (2005). "Regulation of H₂O₂ generation in thyroid cells does not involve Rac1 activation." Eur J Endocrinol 152(1): 127-33.
- Fortuno A., G. San Jose, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." Exp Physiol 90(4): 457-62.
- Franconi F. and L. I. Ferro (2010). Genere e Salute. O.N.Da La salute della donna un approccio di genere. Franconi F. Milano, Franco Angeli.
- Gesensway D. (2001). "Reasons for sex-specific and gender-specific study of health topics." Annals of Internal Medicine, 135(10): 935-938.
- Grant K. and P. Ballem (2000). A women's health research institute in the Canadian Institutes of Health Research. Ottawa, Working Group on the CIHR, Gender and Women's Health Research.
- Greaves L., O. Hankivsky, et al. (1999). CIHR 2000: Sex, gender and women's health. Vancouver, British Columbia Centre of Excellence in Women's Health.
- Groeger G., C. Quiney, et al. (2009). "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule." Antioxid Redox Signal 11(11): 2655-71.
- Hanada M., J. Feng, et al. (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta 1697(1-2): 3-16.
- Hastings R., M. Qureshi, et al. (2004). "Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells." Cell Prolif 37(4): 317-24.
- Healy B. (1991). "The Yentl Syndrome." New England Journal of Medicine 325(4): 274-276.
- Hoyer-Hansen M., L. Bastholm, et al. (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." Mol Cell 25(2): 193-205.
- Jonsdottir L. S., N. Sigfusson, et al. (2002). "Do lipids, blood pressure, diabetes, and smoking confer equal risk of myocardial infarction in women as in men? The Reykjavik Study." J Cardiovasc Risk 9(2): 67-76.

- Jonsdottir L.S., N. Sigfusson, et al. (2002). "Do lipids, blood pressure, diabetes, and smoking confer equal risk of myocardial infarction in women as in men? The Reykjavik Study." J Cardiovasc Risk 9: 67–76.
- Kabeya Y., N. Mizushima, et al. (2004). "LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation." J Cell Sci 117(Pt 13): 2805-12.
- Kang H. Y., D. Shim, et al. (2006). "Protein kinase B inhibits endostatin-induced apoptosis in HUVECs." J Biochem Mol Biol 39(1): 97-104.
- Kihara A., Y. Kabeya, et al. (2001). "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network." EMBO Rep 2(4): 330-5.
- Klebanoff S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." J Leukoc Biol 77(5): 598-625.
- Klein L., C. Munz, et al. (2010). "Autophagy-mediated antigen processing in CD4(+) T cell tolerance and immunity." FEBS Lett 584(7): 1405-10.
- Klionsky D. J., A. J. Meijer, et al. (2005). "Autophagy and p70S6 kinase." Autophagy 1(1): 59-60; discussion 60-1.
- Kuhn H. and B. J. Thiele (1999). "The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance." FEBS Lett 449(1): 7-11.
- Libby P., M. Aikawa, et al. (2006). "Vascular endothelium and atherosclerosis." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 285-306.
- Liu Z. and M. J. Lenardo (2007). "Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases." Dev Cell 12(4): 484-5.
- Lleo A., P. Invernizzi, et al. (2007). "Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario." J Autoimmun 29(2-3): 61-8.
- Loewith R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell 10(3): 457-68.
- Luscher T. F., L. L. Aarhus, et al. (1990). "Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat." Am J Hypertens 3(1): 55-8.

- Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte (1990). The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Maiuri M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol 8(9): 741.
- Malle E., P. G. Furtmuller, et al. (2007). "Myeloperoxidase: a target for new drug development?" Br J Pharmacol 152(6): 838-54.
- Malorni W., E. Straface, et al. (2008). "Redox state and gender differences in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett 582(5): 635-42.
- Malorni W., I. Campesi, et al. (2007). "Redox features of the cell: a gender perspective." Antioxid Redox Signal 9(11): 1779-801.
- Marte B. M. and J. Downward (1997). "PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond." Trends Biochem Sci 22(9): 355-8.
- Martin D. E. and M. N. Hall (2005). "The expanding TOR signaling network." Current Opinion in Cell Biology 17(2): 158.
- Maselli A., P. Matarrese, et al. (2009). "Cell sex: a new look at cell fate studies." Faseb J 23(4): 978-84.
- Miller A. A., T. M. De Silva, et al. (2007). "Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress." Clin Exp Pharmacol Physiol 34(10): 1037-43.
- Mizushima N. (2000). "[Autophagy and apoptosis]." Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 23(6): 527-30.
- Mizushima N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev 21(22): 2861-73.
- Mizushima N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature 451(7182): 1069.
- Oberstein A., P. D. Jeffrey, et al. (2007). "Crystal Structure of the Bcl-XL-Beclin 1 Peptide Complex." Journal of Biological Chemistry 282(17): 13123.
- Paul C., S. Simon, et al. (2010). "Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)." Exp Cell Res 316(9): 1535-52.
- Perez-Lopez F. R., L. Larrad-Mur, et al. (2010). "Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences." Reprod Sci 17(6): 511-31.

- Piras P. and F. Franconi (2009). Salute e Diritti nella prospettiva di genere. Cagliari, AIPSA edizioni.
- Powers T., I. Dilova, et al. (2004). "Yeast TOR signaling: a mechanism for metabolic regulation." Curr. Top. Microbiol. Immunol 279: 39–51.
- Regier D. S., D. G. Greene, et al. (2000). "Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation." J Biol Chem 275(37): 28406-12.
- Rhee S. G. (2006). "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling." Science 312(5782): 1882-3.
- Ribeiro F., A. J. Alves, et al. (2009). "Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness." Rev Port Cardiol 28(10): 1121-51.
- Risberg G., J. E. E., et al. (2009). "A theoretical model for analysing gender bias in medicine." Int J Equity Health 8: 28.
- Rosano G. M. and G. Barbaro (2010). "Gender Differences in Cardiovascular Diseases. A Need for Action." Curr Pharm Des.
- Rosano G.M.C. (2010). Malattie cardiovascolari: prevenzione con approccio di genere. O.N.Da La salute della donna un approccio di genere. Franconi F. Milano, Franco Angeli.
- Saliques S., M. Zeller, et al. "Telomere length and cardiovascular disease." Arch Cardiovasc Dis 103(8-9): 454-9.
- Shaw R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature 441(7092): 424.
- Shaw R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature 441(7092): 424-30.
- Silverman E. S. and J. M. Drazen (1999). "The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms." Proc Assoc Am Physicians 111(6): 525-36.
- Stanfel M. N., L. S. Shamieh, et al. (2009). "The TOR pathway comes of age." Biochim Biophys Acta 1790(10): 1067-74.

- Straface E., R. Vona, et al. (2009). "Cell sex determines anoikis resistance in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett 583(21): 3448-54.
- Strawbridge A. B. and J. S. Blum (2007). "Autophagy in MHC class II antigen processing." Curr Opin Immunol 19(1): 87-92.
- Taddei S., L. Ghiadoni, et al. (2003). "Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies." Curr Pharm Des 9: 2385–2402.
- Thomas S. R., P. K. Witting, et al. (2008). "Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal 10(10): 1713-65.
- Toth B., G.Saadat, et al. (2008). "Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ERbeta) and progesterone receptor A (PR-A), but not ERalpha and PR-B." Histochem Cell Biol 130(2): 399-405.
- Versari D., E. Daghini, et al. (2009). "Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease." Diabetes Care 32 Suppl 2: S314-21.
- Versari D., E. Daghini, et al. (2009). "Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension." Br J Pharmacol 157(4): 527-36.
- Yang Z. Z., O. Tschopp, et al. (2003). "Protein Kinase B \pm /Akt1 Regulates Placental Development and Fetal Growth." Journal of Biological Chemistry 278(34): 32124.
- Zeng Z., D. Sarbassov dos, et al. (2007). "Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML." Blood 109(8): 3509-12.
- Zunic G., M. Colic, et al. (2009). "Nitrite to nitrate molar ratio is inversely proportional to oxidative cell damages and granulocytic apoptosis at the wound site following cutaneous injury in rats." Nitric Oxide 20(4): 264-9.