

UNIVERSITÀ DELLA
CALABRIA

Dottorato di Ricerca

in

“BIOCHIMICA CELLULARE ED ATTIVITÀ DEI FARMACI IN ONCOLOGIA”

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14 - FARMACOLOGIA

XXV CICLO

Effetti dell’Olio Essenziale di Bergamotto (*Citrus Bergamia, Risso et Poiteau*) sul processo autofagico: identificazione dei meccanismi coinvolti e dei componenti responsabili.

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Diego Sisci

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Maria Tiziana Corasaniti

Dottoranda

Dott.ssa M.G. Valentina Cassiano

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Alla mia famiglia

INDICE

SOMMARIO:	- 1 -
INTRODUZIONE:	- 2 -
<i>CAPITOLO I: L'autofagia</i>	- 2 -
1. <i>L'autofagia</i>	- 3 -
1.1 <i>La macroautofagia</i>	- 4 -
1.2 <i>Storia della macroautofagia: dall'osservazione fenomenologica alla comprensione dei meccanismi molecolari</i>	- 4 -
2. <i>Fasi del processo autofagico e "core" molecolare del meccanismo</i>	- 7 -
2.1 <i>Biogenesi dell'autofagosoma</i>	- 8 -
2.2 <i>Formazione delle vescicole</i>	- 19 -
2.3 <i>Trasporto delle vescicole</i>	- 19 -
2.4 <i>Fusione delle vescicole</i>	- 20 -
2.5 <i>Degradazione delle vescicole e riciclo delle macromolecole risultanti</i>	- 22 -
2.6 <i>Interrelazione tra macroautofagia e sistema ubiquitina-proteosoma</i>	- 23 -
3. <i>Meccanismi di regolazione dell'autofagia</i>	- 26 -
3.1 <i>Regolazione dell'autofagia in risposta allo stato dei nutrienti</i>	- 26 -
3.2 <i>Regolazione dell'autofagia in risposta ad altri stimoli</i>	- 29 -
4. <i>Rilevanza fisiopatologica dell'autofagia</i>	- 31 -
4.1 <i>Autofagia e apoptosi: cross-talk tra "self-eating" e "self-killing"</i> -	32 -
4.2 <i>Autofagia e neurodegenerazione</i>	- 33 -
4.3 <i>Autofagia e cancro</i>	- 36 -

<i>CAPITOLO II: L'Olio Essenziale di Bergamotto</i>	- 41 -
<i>1. Il Bergamotto</i>	- 42 -
<i>1.1 Caratteristiche botaniche del Citrus bergamia</i>	- 42 -
<i>1.2 L'olio essenziale di bergamotto (BEO)</i>	- 43 -
<i>1.3 Usi dell'olio essenziale di bergamotto</i>	- 46 -
<i>1.4 Proprietà tossicologiche dell'olio essenziale di bergamotto</i>	- 48 -
<i>1.5 Proprietà farmacologiche dell'olio essenziale di Bergamotto</i>	- 49 -
<i>2. Proprietà farmacologiche e tossicologiche dei principali costituenti del BEO</i>	- 56 -
<i>2.1 Il limonene</i>	- 56 -
<i>2.2 Il linalil acetato</i>	- 58 -
<i>2.3 Il linalolo</i>	- 59 -
<i>2.4 Il bergaptene</i>	- 61 -
SCOPO DELLA TESI	- 63 -
MATERIALI E METODI	- 66 -
<i>1. Reagenti</i>	- 67 -
<i>2. Colture cellulari e trattamenti</i>	- 67 -
<i>3. Analisi citofluorimetrica</i>	- 69 -
<i>4. Immunocitochimica</i>	- 73 -
<i>5. Preparazione dei lisati cellulari e analisi Western blot</i>	- 73 -
<i>6. Knockdown dell'espressione di Beclin 1 mediante siRNA</i>	- 75 -
<i>7. Analisi statistica dei dati</i>	- 78 -
RISULTATI	- 79 -

1. Modulazione dei marker dell'autofagia da parte del BEO in diverse linee cellulari.....	- 80 -
1.1 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II e riduzione dei livelli di p62 in colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.....	- 81 -
1.2 L'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO è precoce e tempo-dipendente.....	- 83 -
1.3 Il trattamento con il BEO determina un cambiamento nella localizzazione citoplasmatica di LC3 nelle SH-SY5Y.....	- 84 -
1.4 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II e riduzione dei livelli di p62 in colture RGC-5.	- 85 -
1.5 Il trattamento con il BEO determina un cambiamento nella localizzazione citoplasmatica di LC3 nelle RGC-5.	- 87 -
1.6 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II in colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk.	- 88 -
1.7 Effetto del trattamento con inibitori dell'autofagia sull'accumulo di LC3 indotto dal BEO.....	- 90 -
1.8 Il BEO induce la fusione dell'autofagosoma con il compartimento lisosomiale.	- 94 -
2. Effetto del BEO sulla funzionalità del sistema ubiquitina-proteosoma.....	- 96 -
2.1 Il trattamento con il BEO riduce in maniera concentrazione-dipendente i livelli totali di proteine poli-ubiquitinate nelle colture SH-SY5Y e RGC-5.....	- 96 -
2.2 Effetto della contemporanea inibizione del processo autofagico e del proteosoma in colture SH-SY5Y esposte al BEO.	- 98 -
3. Ruolo dell'autofagia nella citotossicità prodotta dal BEO in vitro.....	- 100 -
3.1 Il pre-trattamento delle SH-SY5Y con inibitori dell'autofagia riduce la vitalità cellulare nei campioni trattati con il BEO.....	- 100 -

4. Meccanismi molecolari alla base dell'induzione della pathway autofagica da parte del BEO.....	- 102 -
4.1 La modulazione dei maker dell'autofagia indotta dal BEO nelle SH-SY5Y e nelle RGC-5 si osserva sia in condizioni normali che di deprivazione di siero (starvation).....	- 102 -
4.2 Effetto del pre-trattamento con Rapamicina sulla modulazione dell'autofagia indotta dal BEO in cellule SH-SY5Y.....	- 104 -
4.3 Il pre-trattamento con Rapamicina non ha effetti sulla mortalità cellulare prodotta dal BEO nelle SH-SY5Y.....	- 106 -
4.4 Il silenziamento genico di Beclin 1 non modifica l'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO nelle SH-SY5Y.....	- 107 -
5. Identificazione dei componenti responsabili della modulazione del processo autofagico da parte dal BEO.....	- 109 -
5.1 Il limonene e il linalil acetato, da soli e in associazione, modulano in maniera concentrazione-dipendente i marker dell'autofagia nelle SH-SY5Y.....	- 109 -
5.2 Il limonene e il linalil acetato, da soli e in associazione, agiscono da induttori dell'autofagia, riproducendo gli effetti prodotti dal BEO.....	- 115 -
DISCUSSIONE.....	- 116 -
1. Discussione.....	- 117 -
2. Conclusioni.....	- 128 -
BIBLIOGRAFIA.....	- 129 -
PARTE SPECIALE.....	- 158 -

Sommario

Nel presente studio, condotto *in vitro*, è stato valutato il coinvolgimento del processo autofagico negli effetti biologici dell'olio essenziale di bergamotto, BEO (*Citrus Bergamia*, Risso et Poiteau), un fitocomplesso dalle documentate proprietà farmacologiche, largamente impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica, cosmetica e in aromaterapia (si veda: *Bagetta et al., 2010*). In particolare, è stata investigata l'espressione dei principali *marker* dell'autofagia in colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, nelle quali erano stati precedentemente condotti sia gli studi di citoprotezione (*Corasaniti et al., 2007*) che di citotossicità (*Berliocchi et al., 2011*) con l'olio essenziale. Tale studio è stato esteso anche a colture di cellule ganglionari retiniche di ratto, RGC-5, e a colture di fibroblasti umani non tumorali, Hs 605.Sk.

I risultati ottenuti dimostrano che il BEO, nelle linee cellulari studiate, induce un'autofagia funzionale, non abortiva, con un effetto che è concentrazione- e tempo-dipendente. Il meccanismo di tale induzione sembra essere indipendente sia da Beclin 1 che dalla via di mTOR. L'olio essenziale di bergamotto, inoltre, aumenta anche l'attività del sistema ubiquitina-proteosoma e quindi la capacità degradativa globale della cellula.

L'autofagia indotta dal BEO non contribuisce alla citotossicità del fitocomplesso, ma esercita un ruolo citoprotettivo e gli effetti sulla *pathway* autofagica si osservano anche a concentrazioni di BEO che non producono tossicità.

Grazie al presente studio sono stati identificati nel limonene e nel linalil acetato i due costituenti dell'olio essenziale principalmente responsabili della modulazione della via autofagica nelle cellule esposte al BEO. Questi composti agiscono entrambi da induttori dell'autofagia, con effetto additivo, riproducendo gli effetti del fitocomplesso.

Alla luce dei dati raccolti, le prospettive future in questo ambito di ricerca sembrano essere promettenti. Sia il limonene che il linalil acetato sono due composti chimici ben caratterizzati e ritenuti sicuri per l'uomo, che potrebbero rivelarsi utili sia come *tool* farmacologici per lo studio del processo autofagico, sia come potenziali agenti terapeutici per il trattamento di tutte quelle condizioni patologiche (inclusi malattie neurodegenerative e cancro) in cui l'induzione dell'autofagia può risultare benefica.

CAPITOLO I: L'autofagia

1. L'autofagia

L'autofagia è un processo evolutivamente conservato attraverso il quale le cellule regolano il *turnover* di proteine a lunga emivita e organelli citoplasmatici (Klionsky, 2005).

Nelle cellule eucariotiche esistono tre tipi principali di autofagia: macroautofagia, microautofagia ed autofagia-chaperone mediata (Massey et al., 2004).

Micro- e macro-autofagia coinvolgono riarrangiamenti dinamici di membrana che permettono di inglobare porzioni del citoplasma e sequestrare strutture di grandi dimensioni, come un intero organello. In particolare, la **microautofagia** coinvolge l'inglobamento diretto del citoplasma sulla superficie dei lisosomi mediante invaginazione, protusione e settazione della membrana lisosomiale. Nella **macroautofagia**, invece, porzioni del citoplasma vengono sequestrate in una vescicola a doppia membrana formata *ex-novo* e chiamata autofagosoma; successivamente, l'autofagosoma completo si fonde con il vacuolo/lisosoma e la vescicola interna a singola membrana viene rilasciata nel lume. In entrambi i casi, la membrana del risultante corpo autofagico viene lisata per permettere la degradazione del suo contenuto e le macromolecole liberate sono trasportate nel citoplasma attraverso permeasi di membrana, per essere riutilizzate. Diversamente, l'**autofagia chaperone-mediata (CMA)** non coinvolge simili riarrangiamenti di membrana, ma permette la traslocazione di proteine solubili non ripiegate direttamente attraverso la membrana limitante dei lisosomi (fig. 1).

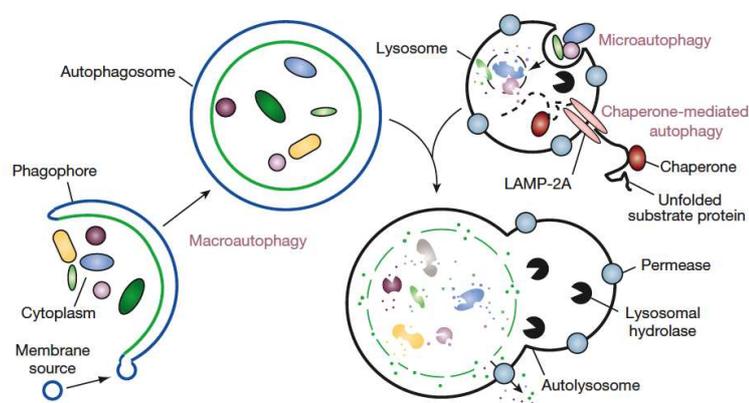


Fig. 1. Differenti tipi di autofagia: macroautofagia, microautofagia e CMA (Mizushima, 2008).

1.1 La macroautofagia

La macroautofagia (che qui chiameremo semplicemente autofagia) è un processo altamente conservato nel corso dell'evoluzione, che avviene in maniera ubiquitaria in tutte le cellule eucariotiche e che ha importanti ruoli fisiologici (Reggiori & Klionsky, 2002).

L'autofagia è attiva a livello basale per il *turnover* di proteine a lunga emivita e anche per la rimozione di organelli superflui o danneggiati. D'altra parte, essa può essere indotta come risposta cellulare a varie condizioni di stress tra cui: limitazione di nutrienti, calore e stress ossidativo.

L'autofagia gioca un ruolo importante nello sviluppo, nel differenziamento e nella estensione della durata della vita (Levine & Klionsky, 2004), inoltre, essa è implicata in varie patologie, inclusi cancro e disordini neurodegenerativi come il morbo di Parkinson, di Alzheimer e la malattia di Huntington (Huang & Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2008). L'autofagia ha un ruolo anche nella risposta immunitaria, sia innata che adattativa (Levine & Deretic, 2007), ad esempio, può permettere l'eliminazione di patogeni invasivi (inclusi virus, parassiti e batteri) e promuovere la presentazione di antigeni microbici all'MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) di classe II. Infine, in assenza di apoptosi, l'autofagia può partecipare ad un tipo di morte cellulare programmata (detta "di tipo II") distinta dalla apoptosi, sebbene la rilevanza fisiologica di questa forma di morte non sia ancora stata chiarita (Levine & Yuan, 2005).

1.2 Storia della macroautofagia: dall'osservazione fenomenologica alla comprensione dei meccanismi molecolari

Il termine "autofagia" deriva dalle parole greche "*fagia*" (mangiare) e "*auto*" (se stesso) ed è stato coniato da Christian de Duve, scopritore dei lisosomi e dei perossisomi e vincitore del premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia nel 1974. Questo medico biologo belga introdusse il termine "autofagia" al Simposio sui Lisosomi della Ciba Foundation (oggi Novartis Foundation), tenutosi a Londra nel 1963. Il termine era stato scelto per descrivere studi al microscopio elettronico in cui erano state osservate vescicole a singola o a doppia

membrana contenenti citoplasma e organelli in vari stati di disintegrazione (Clark, 1957; Ashford & Porter, 1962) (fig. 2).

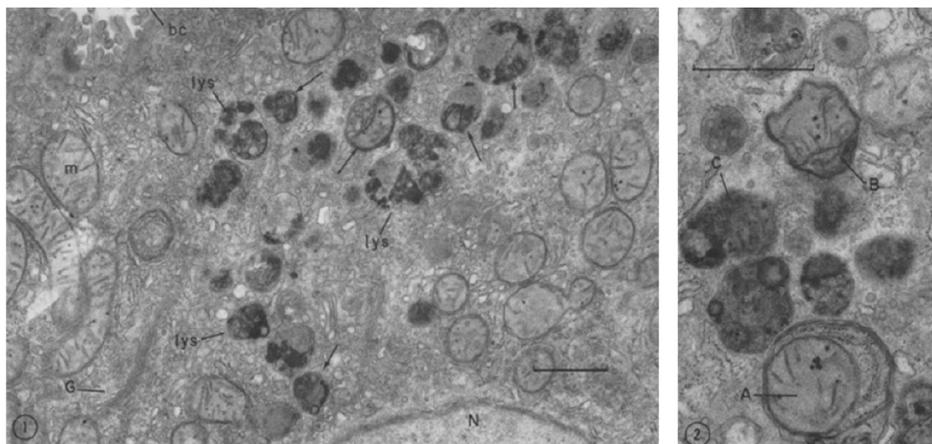


Fig. 2 Microscopia elettronica: una delle prime descrizioni morfologiche dell'autofagia.

Immagini di una sezione ottenuta da un fegato di ratto perfusa con 400 µg di glucagone per 4h (il glucagone è un ormone che induce l'autofagia nei mammiferi). Le frecce evidenziano i lisosomi (lys) che contengono resti di mitocondri e altri componenti citoplasmatici (ingrandimento 16.000x). Nel pannello di destra è possibile osservare corpi densi in differenti stati di degradazione: corpo A in uno stato iniziale (visibile al suo interno un mitocondrio ancora intatto), corpo B più avanzato e corpo C quasi completamente degradato (ingrandimento 26.000x; G=apparato di Golgi, bc = canalicoli biliari, N = nucleo, m= mitocondri) (Ashford & Porter, 1962).

"After perfusion with glucagon, the number of bodies recognized as probable lysosomes increased greatly, and their distribution changed from that normally encountered (...) and were distributed, generally, in a central part of the cytoplasm near the nucleus. (...)

As part of almost every lysosome in these glucagon-treated cells it is possible to recognize a mitochondrion or a remnant of one. (...) Other material included within the lysosomes can be identified representing other cytoplasmic components, small vesicles, RNP particles, and even cisternae of the ER. (...) It seems, therefore, as though each lysosome, when first formed, is a packet of cytoplasm segregated from the surrounding viable cytoplasm by a membrane or membranes."

Da "Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes", Ashford & Porter, 1962.

Nonostante l'autofagia fosse considerata inizialmente un semplice processo degradativo, studi successivi hanno rivelato un ruolo fondamentale dell'autofagia nella fisiopatologia umana. In accordo con ciò, nel corso degli ultimi 15 anni si è assistito ad un notevole incremento della ricerca in questo settore (si veda: *Klionsky, 2007*), che ha portato ad una svolta sostanziale nella comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base di questo processo.

Il periodo dal 1960 al 1980 ha segnato “gli anni d’oro” nell’analisi morfologica della autofagia e le evidenze sperimentali raccolte hanno dimostrato che si tratta di un processo fasico, che procede “saggiamente” per step successivi (*Fengsrud et al., 2004*).

Nel 1992 uno studio del laboratorio di Yoshinori Ohsumi dimostrò che l’autofagia nel lievito è morfologicamente simile a quella documentata nei mammiferi (*Takeshige et al., 1992*).

Sempre il gruppo di Ohsumi condusse il primo *screening* genetico per mutanti dell’autofagia, cui fece seguito una moltitudine di altri *screening*. Questi studi condotti su *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* hanno portato all’identificazione, fino ad oggi, di circa 35 geni correlati all’autofagia (*Kraft & Martens, 2012*), la cui nomenclatura, al fine di evitare confusione, è stata unificata in ATG (AuTophagy-related gene) (*Klionsky et al., 2003*). Successivamente, sono stati identificati e caratterizzati prodotti dei geni ATG negli eucarioti superiori, con ruoli del tutto simili alle loro controparti di lievito (*Reggiori & Klionsky, 2002*).

L’autofagia è generalmente considerata un sistema degradativo non selettivo, in cui una parte del citoplasma e altri componenti cellulari vengono sequestrati nell’autofagosoma in maniera non specifica. Tuttavia, sono stati descritti diversi casi di autofagia selettiva, sia nel lievito che nel mammifero.

Nei lieviti, due chiari esempi di autofagia selettiva sono la degradazione dei perossisomi superflui (*Dunn et al., 2005*) e il *targeting* dal citoplasma al vacuolo o Cvt (*cytoplasm-to-vacuole pathway*) (*Hutchins et al., 1999; Kim & Klionsky, 2000*). Quest’ultimo rappresenta l’unico esempio di *pathway* autofagia-correlato di tipo biosintetico e non degradativo e permette il trasporto selettivo di tre enzimi citosolici al vacuolo: amminopeptidasi 1 (Ape1), α -

mannosidasi (Ams1) e aspartil-aminoipeptidasi (Ape4) (Harding *et al.*, 1995; Hutchins *et al.*, 2001, Yuga *et al.*, 2011).

Nei mammiferi, altri tipi selettivi di autofagia mediano la degradazione dei mitocondri (mitofagia) (Priault *et al.*, 2005), l'eliminazione dei perossisomi (pexofagia) (Hutchins *et al.*, 1999), la rimozione selettiva dei ribosomi (ribofagia) (Kraft *et al.*, 2008) e l'eliminazione di batteri e virus intracellulari (xenofagia) (Nakagawa *et al.*, 2004; Talloczy *et al.*, 2006).

2. Fasi del processo autofagico e “core” molecolare del meccanismo

L'autofagia procede attraverso una serie di *step* morfologicamente distinti (Huang & Klionsky, 2007) (fig. 3):

- a) induzione
- b) nucleazione delle vescicole
- c) riconoscimento del carico e “impacchettamento”
- d) espansione delle vescicole e completamento
- e) fusione delle vescicole con il vacuolo/lisosoma
- f) degradazione delle vescicole e riciclo delle macromolecole risultanti.

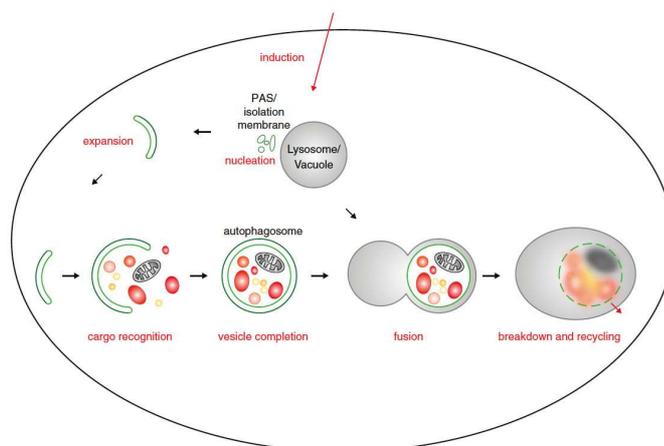


Fig. 3 Fasi del processo autofagico (Kraft & Martens, 2012).

Le proteine Atg possono essere classificate in differenti gruppi in base al ruolo che rivestono nel processo autofagico. Un sottoinsieme di Atg è necessario per la biogenesi dell'autofagosoma in tutti i tipi di autofagia e queste proteine vengono chiamate “core molecolare” (nucleo) del macchinario autofagico e possono essere distinte in cinque differenti gruppi funzionali:

- I) complessi Atg1/ULK, richiesti per l'induzione dell'autofagia;
- II) sistemi di coniugazione tipo-ubiquitina per le proteine Atg12 e Atg8, coinvolti nell'elongazione ed espansione della membrana del fagoforo;
- III) complesso della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) di classe III, richiesto per la nucleazione delle vescicole;
- IV) proteine trans membrana, tipo Atg9, che potenzialmente partecipano al trasporto di lipidi dai siti donatori all'autofagosoma in formazione.

2.1 Biogenesi dell'autofagosoma

2.1.1 Il PAS come sito di inizio per l'assemblaggio delle proteine Atg

A differenza di molti altri processi di *trafficking* intracellulare, l'autofagia comporta la formazione di vescicole a doppia membrana “*de novo*”. Le vescicole autofagiche si formano attraverso l'espansione di una membrana “*core*” di origine ignota, chiamata fagoforo. Il sito proposto per la formazione delle vescicole è il sito di assemblaggio del fagoforo, PAS (*pre-autophagosomal structure*). Nel lievito il PAS è perivacuolare ed è definito come il sito in cui risiedono quasi tutte le proteine Atg, almeno transientemente (*Suzuki et al., 2001*). Anche nelle cellule di mammifero è stata riscontrata colocalizzazione delle proteine Atg, tuttavia, a differenza del lievito che presenta un singolo sito specializzato nella formazione del fagoforo, le cellule di mammifero presentano più siti, potenzialmente corrispondenti a PAS multipli (*Yang & Klionsky, 2009*).

Sebbene il ruolo del PAS non sia completamente noto, l'ipotesi più accreditata è che esso serva per facilitare la nucleazione e/o l'espansione del fagoforo, attraverso il reclutamento delle proteine Atg (*Suzuki et al., 2007*). Inoltre, in contrasto agli studi iniziali che

consideravano il PAS una struttura statica, recenti evidenze sperimentali hanno messo in luce aspetti dinamici del PAS, che può essere versatile nella sua composizione in base alle condizioni fisiologiche della cellula (*Nakatogawa et al., 2009*).

Per molto tempo durante lo studio dell'autofagia le origini delle membrane del fagoforo sono rimaste controverse. Tuttavia, negli ultimi anni è stato dimostrato che diversi compartimenti cellulari possono fornire lipidi (e proteine) per permettere la formazione dell'autofagosoma e, tra questi, il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, i mitocondri e la membrana plasmatica (*Rubinsztein et al., 2012*).

2.1.2 Complessi Atg1/ULK

La proteina Atg1 di lievito è una proteina chinasi a serina\treonina che esercita un ruolo chiave nell'induzione dell'autofagia, agendo a valle del complesso I del *target* della rapamicina (TORC1). Sono state identificate una serie di proteine omologhe di Atg1 anche nei mammiferi, tra queste, ULK1 e ULK2 (unc-51-like Chinasi 1 e 2) sono quelle più strettamente correlate e con il più alto livello di omologia. Il *knockdown* di ULK1 o ULK2 nelle cellule HEK293 blocca l'autofagia (*Young et al., 2009*). Tuttavia, i topi ULK1^{-/-} mostrano una normale risposta autofagica alla deprivazione di nutrienti, sebbene abbiano una ritardata rimozione dei mitocondri durante la maturazione dei reticolociti (*Kundu et al., 2008*). Le basi di queste differenze non sono note. È possibile che in alcuni tessuti ULK2 possa compensare la deficienza di ULK1. Inoltre, è stato recentemente descritto il ruolo di una ULK3 nell'induzione della autofagia nella senescenza cellulare oncogene-indotta (*Young et al., 2009*). Sia Atg1 che le ULK sono proteine altamente fosforilate e il loro stato di fosforilazione cambia in dipendenza dalla disponibilità di nutrienti, suggerendo un meccanismo fosfo-dipendente nella regolazione dell'induzione della autofagia. Atg1 e ULK sono fosforilate da TORC1 in condizioni di presenza di nutrienti, sia nel lievito che nelle cellule di mammifero (*Kijanska et al., 2010*).

Atg1 di lievito esiste in un complesso con Atg13 e Atg17. Atg13 è fosforilata in modo TORC1-dipendente e lo stato di fosforilazione di Atg13 modula il suo legame ad Atg1 e Atg17 (*Yang & Klionsky, 2009; Kamada et al., 2000*). In condizioni di ricchezza di nutrienti Atg13

è altamente fosforilato e ha bassa affinità per Atg1 e Atg17. Quando TORC1 è inattivato (farmacologicamente o mediante deprivazione di nutrienti), Atg13 è rapidamente e parzialmente defosforilato, portando ad una maggiore affinità per Atg1 a Atg17. L'interazione di Atg1 con Atg13 ipofosforilato e con Atg17 porta all'attivazione della funzione chinasi di Atg1, che è necessaria sia per l'autofagia sia per la *pathway* Cvt. Tuttavia, i substrati a valle della chinasi Atg1 non sono del tutto chiari e rimane aperto il dibattito se Atg1 agisce nell'autofagia primariamente attraverso la sua attività chinasi o attraverso un ruolo strutturale durante la formazione del complesso autofagico (Yang & Klionsky, 2010).

Nei mammiferi, ULK1 e ULK2 fanno anche parte di un complesso che include l'omologo di mammifero di Atg13 (mAtg13) e la proteina scaffold FIP200 (un ortologo della Atg17 di lievito) (Jung et al., 2009; Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009). mAtg13 è essenziale per l'autofagia ed interagisce direttamente con ULK1, ULK2 e FIP200, indipendentemente dal suo stato di fosforilazione (Jung et al., 2009; Hosokawa et al., 2009). Anche FIP200 è richiesto per l'autofagia e lega ULK1 e ULK2 indipendentemente dallo stato dei nutrienti (Hara et al., 2008), a differenza della interazione Atg1-Atg17 nel lievito. Inoltre, in presenza di nutrienti, il complesso ULK1-Atg13-FIP200 contiene l'omologo TORC1 di mammifero (mTORC1), mentre, in seguito a deprivazione di nutrienti, mTORC1 si dissocia rapidamente (Hosokawa, 2009). All'interno di questo complesso si verificano diversi eventi fosforilativi, inclusa la fosforilazione di mAtg13 (da parte di ULK1, ULK2 ed mTORC1), la fosforilazione di FIP200 (da parte di ULK1 e ULK2) e la fosforilazione di ULK1 e ULK2 (da parte di mTORC1). In condizioni che inducono l'autofagia si ha una riduzione nell'attività di mTORC1, di conseguenza ULK1, ULK2 e Atg13 sono parzialmente defosforilati e l'attivazione di ULK1 e ULK2 promuove la fosforilazione di FIP200 (Jung et al., 2009; Hosokawa et al., 2009) (fig 4). Il significato funzionale di questi eventi fosforilativi tuttavia non è ancora del tutto chiaro.

Recentemente è stata identificata un'altra proteina, Atg101, che interagisce con ULK1 in modo mAtg13-dipendente e che è essenziale per l'autofagia (Mercer et al., 2009), ma anche il ruolo del complesso ULK1-Atg13-Atg101 durante il processo autofagico rimane da chiarire.

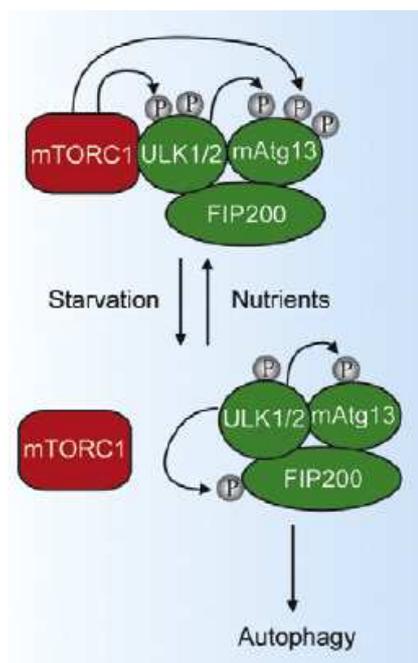


Fig. 4 Complessi ULK e loro ruolo nella regolazione della autofagia.

I complessi ULK1 e ULK2 hanno un ruolo regolatorio nell'induzione della autofagia. Essi contengono diverse proteine Atg necessarie al processo. In presenza di nutrienti, mTORC1 è associato ai complessi di ULK1 e ULK2 e fosforila ULK1, ULK2 e mAtg13. Durante l'inattivazione di mTORC1 in seguito a deprivazione di nutrienti, mTORC1 si dissocia, mATG13, ULK1 e ULK2 sono parzialmente defosforilati e l'attivazione di ULK1 e ULK2 promuove la fosforilazione di FIP200 (Yang & Klionsky, 2010).

2.1.3 Sistemi di coniugazione proteica “ubiquitin-like”

Studi condotti nei lieviti e nei mammiferi hanno portato all'identificazione di due proteine *ubiquitin-like*, Atg12 e Atg8/LC3, e dei loro rispettivi sistemi di coniugazione, che agiscono durante l'elongazione e l'espansione della membrana del fagoforo.

Atg12 è covalentemente legata ad Atg5 attraverso un legame isopeptidico (tra la glicina C-terminale di Atg12 e un residuo di lisina interno di Atg5). La reazione di coniugazione è catalizzata da due proteine aggiuntive, Atg7 e Atg10 (Mizushima *et al.*, 1998a). Atg7 è un omologo dell'enzima E1 attivante l'ubiquitina (Uba1), non in termini della sua struttura molecolare, ma del sito di legame dell'ATP e del residuo di cisteina attivo (Tanida *et al.*, 1999). Atg10 invece funziona come un enzima E2 coniugante l'ubiquitina, sebbene non

presenti omologia con gli enzimi E2 del sistema di coniugazione dell'ubiquitina (*Shintani et al., 1999*). Come avviene durante l'ubiquitinazione, Atg7 idrolizza l'ATP, con conseguente attivazione di Atg12 attraverso la formazione di un legame tioestere ad alta energia tra la glicina C-terminale di Atg12 e la cisteina attiva 507 di Atg7. Successivamente, Atg12 attivato è direttamente trasferito alla cisteina attiva di Atg10 per formare un tioestere Atg13-Atg10; infine, Atg12 è trasferito alla proteina *target* Atg5 per formare il coniugato finale Atg12-Atg5. Quest'ultimo, a sua volta, interagisce non covalentemente con un'altra proteina, Atg16, che omo-oligomerizza per formare un complesso multimerico dal peso molecolare nel lievito di circa 350 KDa (che è stato predetto rappresenti un tetramero di complessi Atg12-Atg5-Atg16) e che è funzionalmente essenziale per l'autofagia (*Kuma et al., 2002*).

La seconda proteina *ubiquitin-like*, Atg8, è coniugata a un lipide di membrana, la fosfatidiletanolamina (PE) (*Ichimura et al., 2000*). Il residuo di arginina C-terminale 117 della proteina Atg8 neosintetizzata è inizialmente clivato da una proteasi cisteinica, Atg4, con esposizione di una glicina (*Kirisako et al., 2000*). La glicina viene poi legata alla cisteina attiva 507 di Atg7, lo stesso enzima tipo-E1 usato dal sistema di coniugazione Atg12-Atg5. La proteina Atg8 attivata è poi trasferita alla cisteina 234 di un altro enzima tipo-E2 (Atg3) con formazione di un legame tioestere. Atg8 è poi eventualmente coniugata con la PE attraverso un legame ammidico tra la glicina C-terminale e il gruppo amminico della PE. Il coniugato Atg8-PE è strettamente associato alle membrane, diventando una proteina integrale di membrana.

A differenza della coniugazione Atg12-Atg5, la coniugazione Atg8-PE è un processo reversibile in cui Atg4 può liberare Atg8 dal suo *target* lipidico. La proteina Atg8 liberata può essere riciclata e usata in un'altra reazione di coniugazione, permettendo così una progressione rapida ed efficiente della autofagia (*Kirisako et al., 2000*) (fig 5).

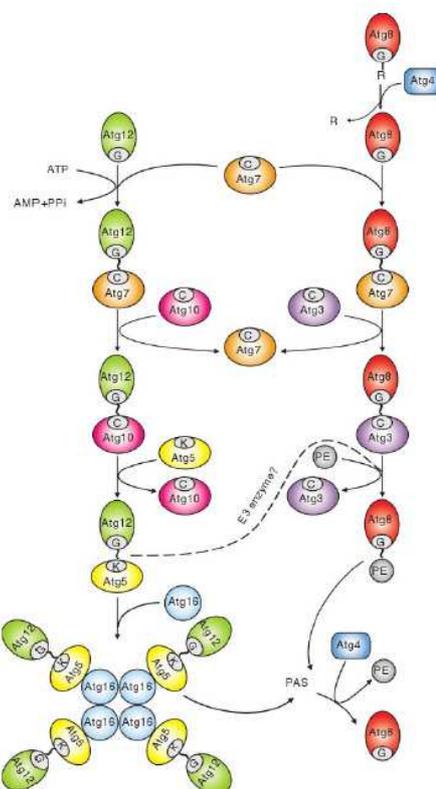


Fig. 5 Due sistemi di coniugazione proteica “ubiquitin-like”.

Atg12 è coniugato ad *Atg5* in una reazione che richiede *Atg7* e *Atg10* (enzimi tipo-E1 e tipo-E2, rispettivamente). Il coniugato *Atg12-Atg5* poi interagisce non covalentemente con *Atg16* che oligomerizza per formare un tetramero di complessi *Atg12-Atg5-Atg16*. *Atg8* neosintetizzato è clivato da *Atg4* al suo C-terminale, generando la forma citosolica con un residuo di glicina C-terminale usato per la coniugazione alla fosfatidiletanolamina (PE) (Yang & Klionsky, 2009).

Recenti lavori suggeriscono che questi due sistemi di coniugazione sono intimamente connessi. Da un lato, sembra che il complesso *Atg12-Atg5-Atg16* localizzato al fagoforo possa agire come un enzima E3 (ubiquitina-ligasi) determinando il sito della lipidazione di *Atg8* (Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008b), dall'altro lato, il macchinario per la coniugazione di *Atg8* sembra essere essenziale per la formazione del complesso *Atg12-Atg5-Atg16*. Infatti, nei topi *Atg3* deficienti (in cui non è riscontrata la presenza del coniugato *Atg8-PE*), la coniugazione *Atg12-Atg5* è marcatamente ridotta e la dissociazione del complesso *Atg12-Atg5-Atg16* dal fagoforo è ritardata. Gli autofagosomi sono più piccoli rispetto a quelli dei topi *wild-type* e risultano aperti o multilamellari (Sou et al., 2008).

Durante la formazione dell'autofagosoma, sia il complesso Atg12-Atg5-Atg16 che il coniugato Atg8-PE localizzano al PAS (Kim et al., 2000; Suzuki et al., 2001).

Il complesso Atg12-Atg5-Atg16 è principalmente localizzato sul lato esterno del fagoforo e rilasciato nel citoplasma prima o subito dopo il completamento dell'autofagosoma. Queste osservazioni suggeriscono che il complesso possa servire come un rivestimento (“coating”) che dirige l'estensione o la curvatura della membrana durante la formazione dell'autofagosoma. Al contrario, Atg8-PE presenta una distribuzione simmetrica su entrambi i lati del fagoforo. Tuttavia, il coniugato localizzato sulla superficie esterna della vescicola autofagica viene rilasciato dalla membrana per opera di un secondo clivaggio Atg4-dipendente, mentre la restante parte permane all'interno della vescicola ed è direzionata al vacuolo/lisosoma, dove viene degradata (Kirisako et al., 1999; Kabeia et al., 2000). In accordo con ciò, Atg8-PE è un'altra proteina *scaffold* candidata a guidare l'espansione e il completamento delle vescicole.

In seguito all'induzione dell'autofagia, i livelli di Atg8 aumentano notevolmente ed è stata documentata una correlazione tra la quantità di Atg8 presente nella cellula e le dimensioni delle vescicole sequestranti (Xie et al., 2008). Inoltre, Atg8 sembra poter mediare l'incatenamento e l'emifusione di vescicole liposomiali *in vitro* (Nakatogawa et al., 2007), sebbene il significato fisiologico della sua attività *in vivo* non sia stata ancora del tutto chiarita (fig. 6).

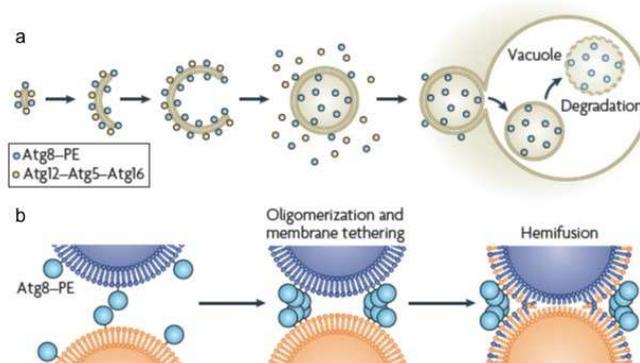


Fig. 6 Localizzazione dei coniugati proteici “ubiquitin-like” sulle membrane autofagiche e ruolo di Atg8-PE nella emifusione delle membrane.

(a) *Atg12-Atg5-Atg16* localizza principalmente sulla superficie esterna della membrana e si dissocia in seguito al completamento dell'autofagosoma. *Atg8-PE* è presente su entrambi i lati delle membrane di isolamento e parte del coniugato resta all'interno dell'autofagosoma, viene veicolato al vacuolo/lisosoma e degradato. (b) *Atg8-PE* oligomerizza e concatena le membrane, portando al processo di emifusione (in cui solo i lipidi del foglietto esterno interdiffondono nelle membrane emifuse) (Nakatogawa et al., 2009).

I sistemi di coniugazione di *Atg12* e di *Atg8* sono entrambi evolutivamente conservati. Gli omologhi di mammifero per ciascun componente del sistema di coniugazione di *Atg12-Atg5* (*Atg5*, *Atg7*, *Atg12*, *Atg10*) sono stati caratterizzati e funzionano in maniera del tutto simile alle loro controparti di lievito (Mizushima et al., 1998b; Mizushima et al., 2002). È stata identificata anche una proteina di mammifero *Atg16-Like* (*Atg16L*), che forma un complesso proteico di circa 800 KDa con il coniugato *Atg12-Atg5*, ancora una volta mediato dalla omo-oligomerizzazione di *Atg16L* (Mizushima et al., 2003).

Per *Atg8* di lievito esistono almeno 4 omologhi di mammifero, *MAP1-LC3*, *GATE16*, *GABARAP* e *Atg8L*. Tutte le proteine possiedono un residuo di glicina conservato vicino al C-terminale e sono coniugate alla PE, analogamente a quanto avviene nei lieviti, attraverso la catalisi di *Atg4*, *Atg7* e *Atg3* (Hemelaar et al., 2003; Kabeya et al., 2000, 2004; Tanida et al., 2002a, 2002b, 2003). Tra queste, *LC3* è la proteina più abbondante nelle membrane autofagosomiche ed è considerata un *marker* per monitorare l'autofagosoma e l'attività autofagica.

LC3 è stata inizialmente identificata come proteina associata ai microtubuli, denominata *MAP1-LC3* (light chain 3) perchè (come le proteine in precedenza note *LC1* ed *LC2*) forma un complesso con la catena pesante di *MAP-1* (*microtubule-associated protein 1*, un polipeptide ad alto peso molecolare associato ai microtubuli) (Kuznetsov & Gelfand, 1987). Nel 2000 il gruppo di Yoshimori dimostrò che la proteina può esistere in due forme, una citosolica (nota come *LC3-I*) ed una associata alla membrana degli autofagosomi (*LC3-II*) (Kabeya et al., 2000), quest'ultima corrispondente al coniugato *Atg8-PE* di lievito (fig. 7).

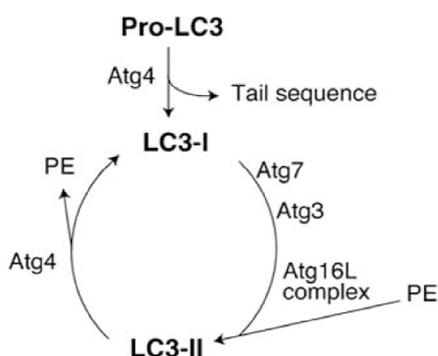


Fig. 7 Diagramma schematico della pathway di reazione di LC3.

pro-LC3 possiede una coda C-terminale non necessaria che viene successivamente clivata dalla proteasi Atg4 generando la forma LC3-I (citosolica) con una glicina C-terminale. La forma LC3-I viene attivata da Atg7 (E1) per diventare un tioestere intermedio ad alta energia coniugato poi all'enzima Atg3 (E2). Il coniugato Atg3-LC3 è reclutato al sito in cui avviene la lipidazione mediante legame diretto al complesso Atg16L, ed il C-terminale di LC3 forma un legame amminico con la fosfatidiletanolamina (PE), generando la forma LC3-II che diventa legata alla membrana. La forma II di LC3 può essere poi clivata a livello della PE (da parte di Atg4) per rigenerare la forma I (Noda et al., 2009).

2.1.4 Complessi della fosfatidil inositolo-3-chinasi (PI3K)

È noto che la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) di classe III partecipa a fenomeni di *trafficking* di membrana. Vps34 è l'unica PI3K identificata nel lievito, ed essa forma almeno due complessi distinti, complesso I e II, ognuno dei quali contiene 3 componenti comuni: Vps34, Vps15 e Vps30/Atg6. Vps15 è una serina/treonina chinasi necessaria per l'associazione di Vps34 in membrana, mentre ancora non si conosce la funzione di Vps30. In aggiunta, ogni complesso contiene un'altra specifica proteina, Atg14 (nel complesso I) o Vps38 (nel complesso II), che funzionano come connettori tra Vps30 e Vps15-Vps34. L'associazione con Atg14 o Vps38 conferisce specificità funzionale ai due complessi della PI3K, regolando perciò differenti eventi di *trafficking*.

La PI3K ha una funzione importante nell'autofagia. Un possibile ruolo è quello di produrre fosfatidilinositolo-3-fosfato (PtdIns3P) a livello del PAS; questo permetterebbe il reclutamento di proteine che legano il PtdIns3P, che a loro volta recluterebbero altri

effettori a valle. Il PtdIns3P è legato, infatti, da proteine che hanno specifici siti di legame, come il dominio PX (*phox omology*) e il dominio *zing finger* FYVE (conservato in Fab1, YOTB, Vac1, EEA1). Tra le Atg, ad esempio, Atg20, Atg24, Atg18 e Atg21 sono capaci di legare il PtdIns3P e sono reclutate al PAS tramite l'azione del complesso I della PI3K (Yang & Klionsky, 2010) (fig. 8).

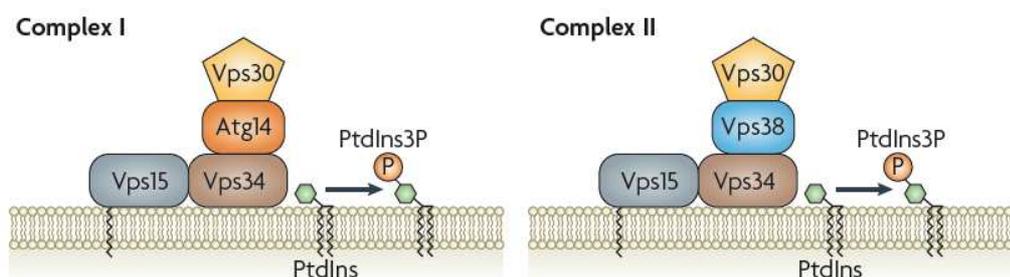


Fig. 8 I due complessi della fosfatidil inositolo-3-chinasi di lievito.

Il complesso I localizza al PAS e agisce nella biogenesi dell'autofosoma. Il complesso II localizza nell'endosoma e ha un ruolo in altri processi di trafficking (Nakatogawa et al., 2009).

Differentemente dal lievito, nei mammiferi esistono due diversi tipi di PI3K: di classe I e di classe III. La PI3K di classe III, hVps34 (omologa alla proteina Vps34 di lievito), genera PtdIns3P ed ha un effetto stimolatorio sull'autofagia. Essa forma un complesso con il suo regolatore p150 (omologo di Vps15) e con la proteina accessoria Beclin 1 (*coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein*; omologo di Vps30/Atg6) (Panaretou et al., 1997; Liang et al., 1999). La PI3K di classe I produce invece fosfatidilinositolo(3,4,5)trisfosfato [PtdIns(3,4,5)P₃], agisce a livello della membrana plasmatica e funziona attraverso la cascata del segnale dell'insulina per attivare mTOR e la PKB, con effetto inibitorio sull'autofagia (Jacinto et al., 2003).

Un fattore chiave nella regolazione dell'autofagia nei vertebrati è AMBRA1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), che è richiesta per l'attività di Beclin 1. Infatti, la *downregulation* di AMBRA1 porta ad una ridotta capacità di Beclin 1 di interagire con Vps34, questo porta ad una sua minore attività chinastica e quindi ad una riduzione della

risposta autofagica per ridotta nucleazione delle vescicole (Fimia et al., 2007). *In vivo*, AMBRA1 ha un ruolo cruciale nell'embriogenesi e la deficienza funzionale di AMBRA1 negli embrioni di topo porta a gravi difetti del tubo neurale, associati ad alterazioni dell'autofagia, accumulo di proteine ubiquitinate, proliferazione cellulare non bilanciata ed eccessiva morte apoptotica (Fimia et al., 2007; Cecconi et al., 2007).

È interessante la recente scoperta dell'esistenza di una stretta relazione tra il citoscheletro e la formazione degli autofagosomi. L'induzione dell'autofagia è regolata da un'interazione dinamica tra il complesso Beclin 1/Vps34 e il complesso della dineina, mediato da un legame diretto tra AMBRA1 e DLC1/2 (dynein light chain 1/2) (fig.9). Quando l'autofagia è indotta, ULK1 fosforila AMBRA1, rilasciando il complesso di Beclin 1 dalla dineina. Questo evento permette la sua traslocazione al reticolo endoplasmatico dove può iniziare la nucleazione delle vescicole (Di Bartolomeo et al., 2010).

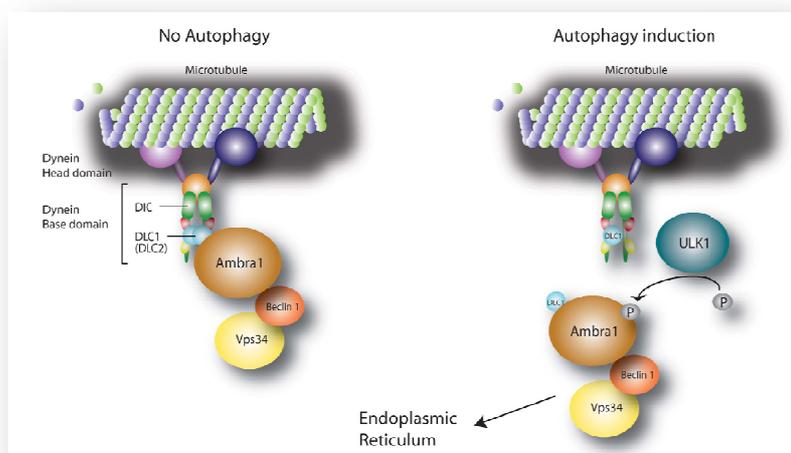


Fig. 9 Modello proposto per l'interazione dinamica tra il complesso motore della dineina e AMBRA1 durante l'induzione dell'autofagia.

AMBRA1 è legata in uno stato presumibilmente inattivo al complesso della dineina attraverso il legame a DLC1. In seguito all'induzione dell'autofagia, AMBRA1 è rilasciata dal complesso della dineina dopo fosforilazione ULK1-dipendente e trasloca al reticolo endoplasmatico insieme a Beclin1/Vps34 per permettere la formazione dell'autofagosoma. Il complesso motore della dineina consiste di un "Head domain" (catena pesante della dineina) e di un "Base domain" (DIC, DLC1 o DLC2 e altri fattori) (Di Bartolomeo et al., 2010).

2.2 Formazione delle vescicole

Una delle questioni più interessanti riguardanti l'autofagia è il meccanismo utilizzato per il movimento dei lipidi dalla fonte al sito di assemblaggio dell'autofagosoma.

Atg9 è una proteina integrale di membrana che sembra funzionare come un “carrier di membrane” durante il processo di assemblaggio (Noda *et al.*, 2000). Il “cycling” di Atg9 tra il PAS e le altre strutture non-PAS potrebbe permettere il trasporto di lipidi dal sito donatore al PAS ed essere essenziale per la formazione dell'autofagosoma (Yang & Klionsky, 2010).

La localizzazione delle proteine Atg al PAS durante l'autofagia è stata studiata in cellule che hanno perso una o più proteine Atg, mostrando che esse si organizzano al PAS secondo un modello “gerarchico”. Se una delle proteine Atg che stanno a monte del modello gerarchico viene rimossa geneticamente, la localizzazione al PAS di tutte le altre viene significativamente intaccata. Mentre, in assenza delle proteine a valle, quelle a monte si accumulano a livello del PAS. Sembra, dunque, che la gerarchia nella localizzazione delle proteine al PAS rappresenti il loro ordine di azione nella formazione dell'autofagosoma (Yang and Klionsky, 2009).

2.3 Trasporto delle vescicole

Una volta che la vescicola a doppia membrana è stata formata, è veicolata al vacuolo/lisosoma per il processo di fusione.

Osservando immagini *live* delle particelle GFP-Atg5 positive (che rappresentano gli autofagosomi in via di formazione), è possibile notare il loro movimento casuale in prossimità del PAS (Kimura *et al.*, 2008). Anche le particelle GFP-LC3 positive mostrano un movimento *random* iniziale, ma poi si muovono linearmente verso la regione perinucleare dove sono localizzati i lisosomi. Questo movimento lineare utilizza i microtubuli come traccia e la dineina come motore (Fass *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2008).

Poichè le particelle GFP-Atg5 positive non mostrano questo movimento lineare, deve esistere un meccanismo di regolazione che assicura che solo gli autofagosomi completi

siano agganciati in questo *trafficking* verso i lisosomi. Una possibilità è che il reclutamento della dineina avvenga dopo il distacco del complesso Atg16L, tuttavia i dettagli di questo processo rimangono da chiarire. Il coinvolgimento di LC3 in questa regolazione è un'altra possibilità interessante, poiché, come menzionato in precedenza, esso era stato inizialmente identificato come proteina associata ai microtubuli (*Kuznetsov et al., 1987*).

Il *delivery* degli autofagosomi dineina-dipendente è un processo fisiologicamente importante, dato che esso permette il trasporto efficiente dei substrati catturati nel citoplasma fino ai lisosomi. La rilevanza del processo è evidente anche dagli studi condotti su LAMP-2 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 2*), una proteina della membrana lisosomiale la cui assenza è alla base della patologia di Danon. Nei topi *knock-out* per LAMP-2 i lisosomi non sono concentrati nella regione perinucleare, ma appaiono dispersi nella cellula, ne consegue che gli autofagosomi, non potendo fondere con il lisosoma, si accumulano nel citoplasma (*Saftig et al., 2008*).

2.4 Fusione delle vescicole

Il lisosoma è la destinazione finale degli autofagosomi e la membrana esterna degli autofagosomi fonde con la membrana lisosomiale formando un organello chiamato autolisosoma. Questo processo, noto anche come “maturazione dell'autofagosoma”, è stato studiato più nei dettagli nel sistema di lievito come processo di fusione tra l'autofagosoma e il vacuolo. Nel lievito esso dipende dal canonico macchinario di fusione, il sistema Rab-SNARE, e il set di molecole coinvolte è quasi identico a quello necessario per la fusione omotopica vacuolo-vacuolo (*Ostrowicz et al., 2008*).

Vam3, Vam7 e Vti1 sono proteine SNARE di lievito che prendono parte al processo di fusione dell'autofagosoma (*Darsov et al., 1997; Fisher et al., 1999*). Anche NSF/Sec18, generalmente richiesta per la fusione tra vescicole, è necessaria per la fusione tra autofagosoma e vacuolo (*Ishihara et al., 2001*). Ypt7, una piccola Rab GTP-asi, è coinvolta sia nella fusione vacuolo-vacuolo che vacuolo-autofagosoma (*Kirisako et al., 1999*). Inoltre, intervengono in questo processo di fusione anche il complesso proteico Ccz1-Mon1 (*Wang*

et al., 2002) e il complesso di classe C Vps/HOPS, che permette l'ancoraggio e la fusione delle vescicole mediante l'interazione con Ypt7 (Ostrowicz et al., 2008) (fig. 10).

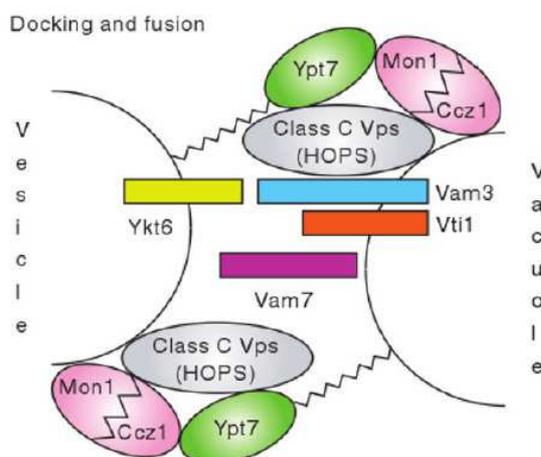


Fig. 10 Ancoraggio e fusione delle vescicole con il vacuolo.

Le proteine SNARE (*Vam3*, *Vam7*, *Vti1* e *Ykt1*) funzionano in vari eventi di fusione tra membrane, incluso il processo di fusione dell'autofosoma con il vacuolo. Mostrati anche il complesso *Mon1-Ccz1* e il complesso *Vps/HOPS* di classe C che funzionano nello stadio di ancoraggio e fusione dipendente da *Ypt7* (Yang & Klionsky, 2009).

Nei mammiferi, la maturazione degli autofagosomi include diversi eventi di fusione, sia con le vescicole che originano dal processo di endocitosi (endosomi), sia con i lisosomi. La fusione con gli endosomi rappresenta il punto di convergenza tra *pathway* autofagico ed endocitotico e il prodotto risultante è chiamato anfisoma. In seguito alla fusione di un autofosoma/anfisoma con un lisosoma si genera l'autolisosoma (Berg et al., 1998). In alcuni casi non è possibile distinguere la natura precisa del compartimento e si parla di “vacuolo autofagico”, per riferirsi genericamente alle tre principali strutture autofagiche: autofagosomi, anfisomi e autolisosomi.

Il macchinario molecolare che sottende al processo di fusione nei mammiferi non è ancora del tutto noto, tuttavia, la proteina *Vtil1* è coinvolta nella fusione degli autofagosomi con gli endosomi (Atlashkin et al., 2003), mentre l'omologo di *Ypt7*, *Rab7*, gioca un ruolo nella fusione autofosoma-lisosoma (Jager et al., 2004; Gutierrez et al., 2004). Sempre nei mammiferi

è stato recentemente identificato anche il complesso HOPS, che lega UVRAG, una proteina che interagisce con Beclin 1 (*Liang et al., 2008*). L'overespressione di UVRAG promuove la fusione autofagosoma-lisosoma, perciò è possibile che Beclin 1 sia un facilitatore del processo di fusione in aggiunta al suo ruolo nella formazione dell'autofagosoma.

2.5 Degradazione delle vescicole e riciclo delle macromolecole risultanti

Dopo il processo di emifusione con il lisosoma/vacuolo, la vescicola interna a singola membrana è rilasciata all'interno del lume vacuolare/lisosomiale, dove è chiamata corpo autofagico e dove viene degradata. Il processo di degradazione dipende dalle funzioni proprie del compartimento (inclusa l'acidificazione vacuolare/lisosomiale) e dalla attività delle idrolasi residenti (incluse Pep4 e Prb1). In aggiunta a questi fattori, una lipasi putativa, Atg15, è anche implicata in questo processo e sembra che abbia un ruolo chiave nella lisi vacuolare del corpo autofagico (*Epple et al., 2001*).

Per la cellula, lo scopo principale dell'autofagia è di degradare se stessa e riciclare le macromolecole risultanti per sintetizzare componenti essenziali al fine di soprafare varie condizioni di stress. In accordo con ciò, le macromolecole liberate dal processo degradativo devono essere rilasciate nel citoplasma, per essere riutilizzate. I particolari di questo fenomeno non sono ancora noti, ma Atg22, un trasportatore di amminoacidi localizzato sulla membrana vacuolare, sembra avere un ruolo importante nel mediare l'efflusso di leucina e altri amminoacidi risultanti dalla degradazione autofagica (*Yang et al., 2006*). Anche Avt3 e Avt4 sembrano far parte della stessa famiglia di permeasi. In seguito alla rimozione di questi tre trasportatori vacuolari si ha una rapida perdita di vitalità cellulare in condizioni di deprivazione di nutrienti, mentre l'aggiunta di leucina ripristina parzialmente la sopravvivenza cellulare (*Russnak et al., 2001*).

Sebbene non siano stati identificati omologhi di mammifero di Atg22, sono stati caratterizzati gli omologhi di Avt3 e Avt4 indicati come SLC36A1 e SLC36A4/LYAAT-2 (trasportatore degli amminoacidi lisosomiali 1 e 2), rispettivamente (*Sagne et al., 2001; Yang & Klionsky, 2009*). Tuttavia, come l'autofagia contribuisca al riciclo di altre macromolecole, quali carboidrati e lipidi, rimane ancora da chiarire.

2.6 Interrelazione tra macroautofagia e sistema ubiquitina-proteosoma

Insieme all'autofagia, l'altro grande sistema di degradazione delle proteine negli eucarioti è il sistema ubiquitina-proteosoma (UPS).

In questo sistema, la proteina *target* viene attaccata all'ubiquitina attraverso una serie di reazioni enzimatiche finemente regolate, che coinvolgono l'azione di più enzimi, tra cui enzimi attivanti (E1), coniuganti (E2) e liganti (E3) (Goldberg, 2003). L'ubiquitina legata alla proteina da degradare diventa a sua volta il nuovo bersaglio per la successiva ubiquitinazione, portando alla formazione di una catena di poli-ubiquitina. Le risultanti proteine poli-ubiquitinate sono poi trasportate, attraverso un sistema navetta poco conosciuto, al proteosoma, dove vengono degradate in oligopeptidi, rilasciati poi nel citoplasma o nel nucleoplasma, dove sono digeriti in amminoacidi attraverso peptidasi solubili (Korolchuk et al., 2010).

Il proteosoma è un organello di forma cilindrica che consiste di un complesso centrale 20S e di due piccoli complessi a cappello 19S (fig. 11). Questi ultimi legano le proteine *target*, deubiquitinano il substrato e controllano l'accesso ai sei centri catalitici all'interno del *core* della subunità 20S. Le dimensioni limitate del poro catalitico del proteosoma suggeriscono che i substrati proteici devono essere parzialmente denaturati prima di entrare nella subunità 20S, perciò, i complessi proteici e gli aggregati possono essere digeriti solo se precedentemente disassemblati. Al contrario, l'autofagia è capace di degradare un più ampio spettro di substrati, che, in media, tendono ad essere proteine di lunga emivita e di grandi dimensioni. Questi includono proteine solubili funzionali o mal ripiegate, complessi proteici, oligomeri, aggregati e interi organelli (mitocondri, ribosomi, perossisomi, ecc.).

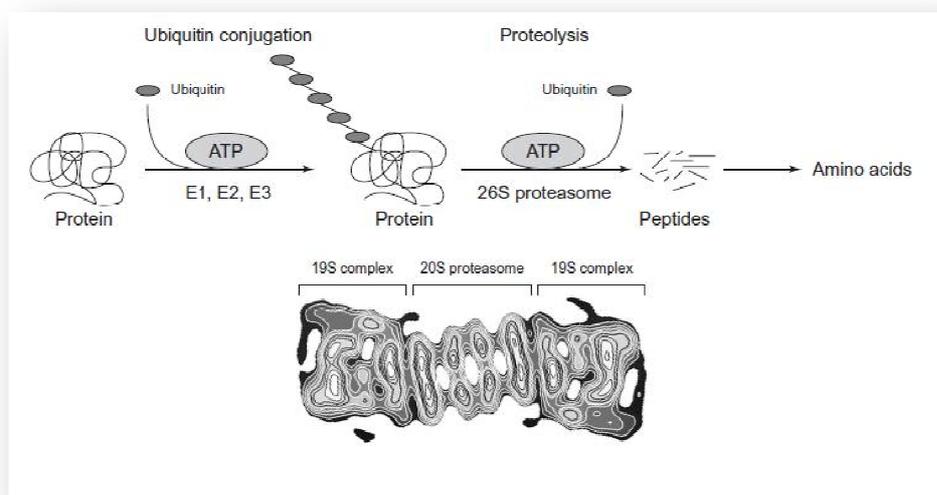


Fig. 11 Sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) per la degradazione proteica (Lee & Goldberg, 1998).

È molto interessante la scoperta secondo la quale le subunità dei proteosomi possono essere degradate dai lisosomi (Cuervo *et al.*, 1995). Questo suggerisce la possibilità che il sistema autofagia-lisosomi possa intaccare l'attività dell'UPS controllando il numero di proteosomi, un'ipotesi che, al momento, non è stata però ancora investigata.

Sebbene autofagia e UPS siano due *pathway* che differiscono in maniera significativa (per meccanismo, substrati, specificità, cinetica, elementi di controllo, ecc.), recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato una complessa intercorrelazione tra questi due meccanismi catabolici. Innanzi tutto, è stato scoperto che l'ubiquitinazione può “taggare” i substrati per la degradazione attraverso entrambe le *pathway*. Infatti, è noto che molte proteine possono essere substrati di entrambi i sistemi degradativi e in certe condizioni i substrati ubiquitinati, normalmente degradati dal proteosoma, possono essere digeriti anche mediante autofagia, e viceversa (Fuertes *et al.*, 2003a; Fuertes *et al.*, 2003 b; Wooten *et al.*, 2008). In aggiunta, il danneggiamento dell'attività del proteosoma porta ad un incremento dell'attività dell'autofagia, che può essere considerata un meccanismo compensatorio che permette alla cellula di ridurre i livelli dei substrati dell'UPS (Ding *et al.*, 2007). Invece, studi genetici nei topi hanno dimostrato che l'inattivazione dell'autofagia mediante *knockout* di

geni essenziali per l'autofagia (Atg5 o Atg7) risulta nell'accumulo e aggregazione di proteine ubiquitinate (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

La comprensione dei meccanismi alla base del *cross-talk* tra autofagia e sistema del proteosoma è utile al fine di comprendere come questi due sistemi siano integrati nel catabolismo cellulare. Questo aspetto potrebbe essere di notevole importanza quando si cerca di manipolare una delle due vie per scopi terapeutici e per capire se lo sviluppo di una patologia causato dalla deficienza primaria di un sistema degradativo potrebbe essere intaccato da cambiamenti secondari nell'altra *pathway*.

Diverse proteine permettono il collegamento tra il *target* ubiquitinato e il sistema UPS o autofagico, tra queste p62 (anche nota come sequestrome1 SQSTM1/A170), NBR1 (neighbour of BRCA1 gene1), HDAC6 (histone deacetilasi 6) e Alfy (Kirkin et al., 2009). Queste proteine hanno la capacità di interagire direttamente o indirettamente con i componenti di entrambi i sistemi del macchinario autofagico o dell'UPS, fungendo da "*scaffold protein*". Il più studiato di questi adattatori è p62, che è esso stesso substrato dell'autofagia poichè può interagire direttamente con LC3 ed essere inglobato nell'autofagosoma e degradato (Kirkin et al., 2009).

3. Meccanismi di regolazione dell'autofagia

Un'autofagia insufficiente può essere deleteria per la cellula (*Kuma et al., 2004; Komatsu et al. 2006, 2007a*), ma anche livelli eccessivi possono essere nocivi, perciò, l'autofagia è un processo finemente regolato in tutti gli eucarioti.

L'induzione e la regolazione dell'autofagia sono state ampiamente studiate nel lievito, nelle cellule di mammifero e in *Drosophila* e differenti vie di trasduzione sembrano essere coinvolte nel controllo del processo autofagico. In particolare, l'autofagia è primariamente regolata dallo stato di nutrienti, fattori di crescita e ormoni (come insulina e glucagone), ma è modulata anche in risposta allo stato energetico, a differenti tipi di stress cellulari (tra cui: stress del reticolo endoplasmatico, ipossia, stress ossidativo) e all'invasione da parte di microrganismi patogeni.

3.1 Regolazione dell'autofagia in risposta allo stato dei nutrienti

Durante la deprivazione di nutrienti la formazione degli autofagosomi è indotta drammaticamente. Sia nei lieviti che nei mammiferi, due importanti "sensori" dello stato nutritivo, che attivano la divisione e la crescita cellulare e regolano negativamente l'autofagia, sono TOR e la via Ras-cAMP-PKA.

3.1.1 TORC1

La proteina *target* della rapamicina, TOR, gioca il principale ruolo regolatorio nell'induzione della autofagia (*Carrera, 2004*). Essa forma due complessi proteici funzionalmente distinti, complesso TOR 1 e 2 (indicati come TORC1 e TORC2) (*Loewith et al., 2002*). TORC1 ha un ruolo determinante nella regolazione dell'autofagia. In condizioni di disponibilità di nutrienti TORC1 è attivo e inibisce l'autofagia, mentre durante la deprivazione di nutrienti TORC1 è inibito e l'autofagia è indotta (*Noda & Ohsumi, 1998*).

TORC1 è sensibile all'inibizione da rapamicina (da qui il suo nome TOR, *target of rapamycin*). Il trattamento con rapamicina causa l'inattivazione di TORC1 e in queste condizioni l'autofagia è indotta anche in presenza di nutrienti, suggerendo che TOR regola negativamente l'autofagia (Noda & Oshumi, 1998).

La proteina TOR di mammifero (mTOR) è anch'essa sensibile allo stato dei nutrienti e modula l'autofagia, ma il meccanismo della regolazione è molto più complesso che nei funghi, che non sono responsivi agli ormoni. La cascata regolatoria a monte di mTOR include il recettore per l'insulina, i substrati 1 e 2 del recettore dell'insulina, la PI3K di classe I, e la PKB/Akt (Majier & Codogno, 2006).

L'attività di mTOR è controllata dall'eterodimero TSC1-TSC2 che agisce come GAP (*GTP-ase activating protein*) per la GTPasi Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). La forma di Rheb legata al GDP inibisce mTOR, mentre la forma legata al GTP stimola l'enzima. La PKB fosforila e inibisce il complesso TSC1-TSC2, portando all'attivazione della via di mTOR. Al contrario, PTEN (*3'-phosphoinositide phosphate*), antagonizzando la PKB, ha un effetto stimolatorio sull'autofagia (Arico et al., 2001).

Inizialmente si riteneva che mTORC1 fosse capace di "sentire" direttamente gli amminoacidi e venisse fosforilato in risposta al segnale dei nutrienti (Long et al., 2005a). Tuttavia, recenti osservazioni in *Drosophila* e nei mammiferi suggeriscono che proteine Rag attivano TORC1 in risposta agli amminoacidi attraverso la mediazione della traslocazione di TORC1 a specifici compartimenti subcellulari che contengono l'attivatore di TORC1 Rheb (Sancak et al., 2007; Kim et al., 2008). Altri studi invece indicano che gli amminoacidi attivano mTOR attraverso la PI3K di classe III (hVps34) (Byfield et al., 2005; Nobukuni et al., 2005) (fig. 12).

Una volta attivato, mTORC1 guida la fosforilazione di una serie di substrati a valle. Tra questi, quelli meglio caratterizzati sono la eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*)-*binding protein 1* (4E-BP1) e la chinasi S6 (S6K1). La S6K1 di mammifero, anche conosciuta come proteina ribosomiale p70^{S6K}, è una kinasi serina/treonina che una volta fosforilata da mTORC1 promuove la trascrizione dell'mRNA mediante la fosforilazione o il legame a molteplici proteine (Bové et al., 2011). Inoltre, la S6K esercita un *feedback* negativo sul segnale di mTOR fosforilando IRS1 per regolare negativamente il segnale

dell'insulina, portando così ad una riduzione di fosfatidilinositolo(3,4,5)trifosfato, un inibitore dell'autofagia. Questo *feedback* regolatorio potrebbe assicurare un livello basale di autofagia anche in condizioni di ricchezza di nutrienti (Klionsky et al., 2005).

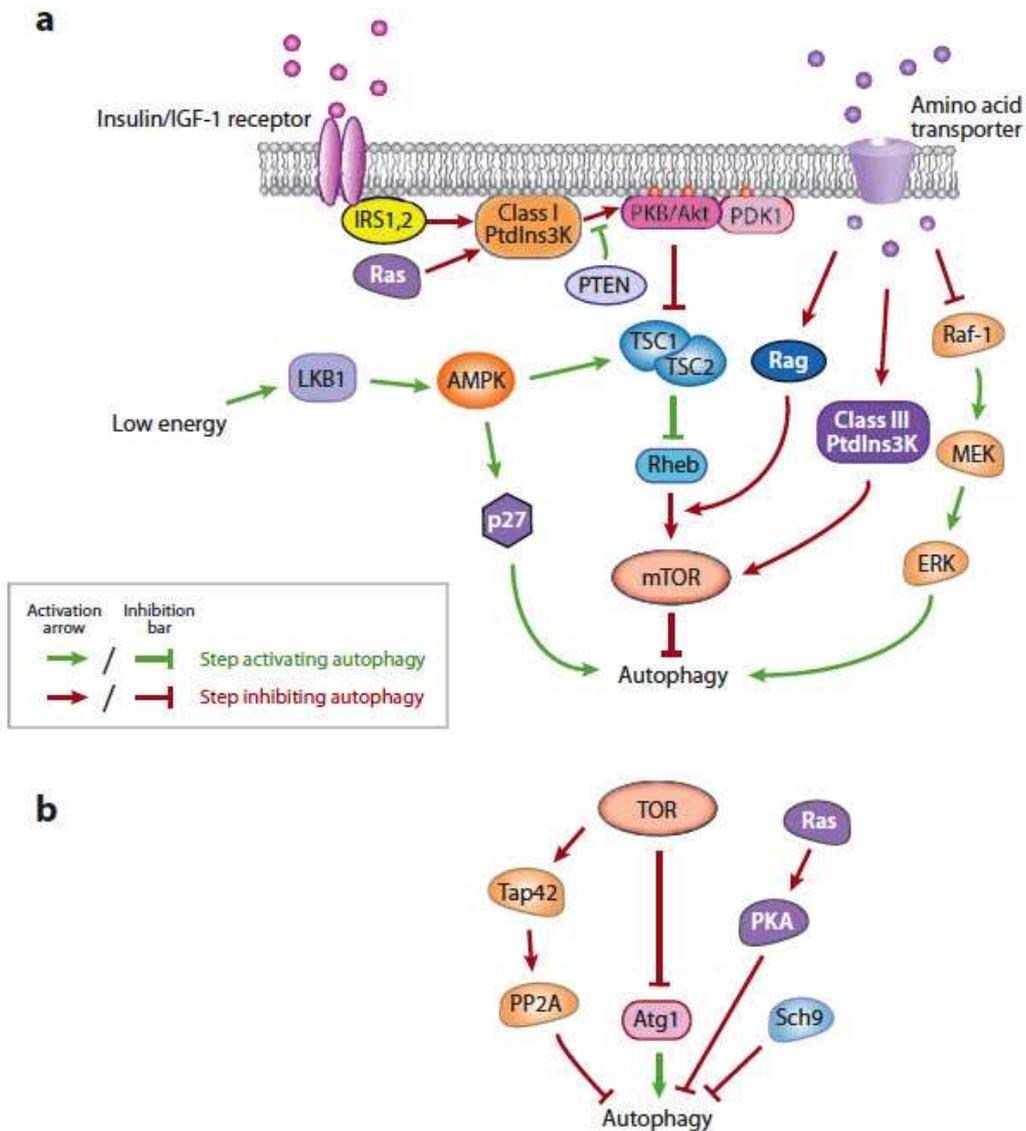


Fig. 12 Vie del segnale e meccanismi di regolazione dell'autofagia.

(a) Pathway che regolano l'autofagia nei mammiferi in risposta ai nutrienti, agli ormoni e al livello energetico della cellula. (b) Signaling dell'autofagia nei lieviti (He & Klionsky, 2009).

3.1.2 Via Ras/PKA

In aggiunta a TORC1, la via del segnale Ras/PKA gioca anch'essa un ruolo importante nell'autofagia (Yang & Klionsky, 2009). Nel lievito, in condizioni di disponibilità di nutrienti sono attivate due piccole GTPasi (Ras1 e Ras2) che stimolano l'adenilato ciclasi a produrre AMP ciclico (cAMP). Il cAMP lega la subunità regolatoria (Bcy1) della PKA permettendo la dissociazione dalle tre subunità catalitiche (Tpk1, Tpk2 e Tpk3), con conseguente attivazione della PKA (Thevelein & de Winde, 1999). L'attivazione costitutiva della PKA previene l'induzione della autofagia indotta da deprivazione di nutrienti o da rapamicina, mentre l'inattivazione di PKA induce l'autofagia in condizioni di ricchezza di nutrienti (Budovskaya et al., 2004; Schmelzle et al., 2004), suggerendo che anche Ras/PKA, in aggiunta a TORC1, è un regolatore negativo dell'autofagia (fig. 12).

3.2 Regolazione dell'autofagia in risposta ad altri stimoli

Oltre che dallo stato dei nutrienti, l'autofagia è finemente regolata anche in funzione degli ormoni e dei fattori di crescita. Quando i fattori di crescita sono rimossi dal mezzo extracellulare, nonostante la presenza di nutrienti, l'autofagia è indotta ed è indispensabile per il mantenimento delle funzioni cellulari e per la produzione di energia (Lum et al., 2005).

Negli eucarioti superiori la via attraverso la quale gli ormoni regolano l'autofagia è differente da quella dei nutrienti, ma entrambe convergono su TOR. Quando gli ormoni sono assenti, mTOR è inattivato, con rilascio del suo effetto inibitorio sull'autofagia (Long et al., 2005a).

Oltre a mTOR, anche il *signaling* di Ras gioca un ruolo importante nella regolazione dell'autofagia da parte dei fattori di crescita. Ras trasduce il segnale dal recettore a tirosin chinasi del fattore di crescita a effettori intracellulari, come Raf-1/MAP (*miogeno-activated-protein*) chinasi 1 e la PI3K di classe I. Ras attivo sopprime l'autofagia attraverso la PI3K di classe I (Furuta et al., 2004). L'altro effettore di Ras, Raf-1, a differenza della PI3K di classe I, è un sensore degli amminoacidi e regola positivamente l'autofagia. Di conseguenza, esistono due cascate effettrici di Ras, la via Ras-PI3K (che sopprime

l'autofagia) e la via Ras-Raf1/ERK1/2 (che la stimola) e che sembrano opposte l'una all'altra nel regolare l'autofagia in risposta a fattori di crescita piuttosto che all'assenza di amminoacidi (si veda: *He & Klionsky, 2009*).

L'autofagia viene regolata anche in risposta al livello energetico della cellula e durante i periodi di stress metabolico l'attivazione dell'autofagia è essenziale per la sopravvivenza. Nelle cellule di mammifero la riduzione del livello di energia (ATP) cellulare è sentito da AMPK (*5'-AMP-Activated Protein Kinase*) che è attivata dalla riduzione del rapporto ATP/ADP attraverso la chinasi a monte LKB1. L'attivazione di AMPK porta alla fosforilazione e attivazione del complesso TSC1/2, che inibisce l'attività di mTOR attraverso Rheb (*Liang et al., 2007*).

Anche altri tipi di stress extra- ed intracellulari (tra cui: stress del reticolo endoplasmatico, ipossia e stress ossidativo) inducono potentemente l'autofagia, permettendo alla cellula di adattarsi e superare varie condizioni sfavorevoli (si veda: *He & Klionsky, 2009*).

4. Rilevanza fisiopatologica dell'autofagia

Il sistema del proteosoma (UPS) e l'autofagia rappresentano due pietre angolari del catabolismo cellulare, sono coinvolti in molti aspetti della normale fisiologia e dello sviluppo e sono implicati anche in una vasta gamma di stati patologici, inclusi cancro, neurodegenerazione e invecchiamento. La degradazione proteica controlla processi come il ciclo cellulare, il *signaling*, la trascrizione del DNA, la sintesi proteica e la riparazione dei danni al genoma, mediante la *downregulation* di elementi regolatori critici. In aggiunta, l'UPS e l'autofagia sono coinvolti nella degradazione di ogni componente cellulare in eccesso o non funzionale.

L'autofagia basale, permettendo la rimozione di proteine e organelli danneggiati, esercita un importante "controllo di qualità" e risulta essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Sridhar et al., 2012). In più, l'autofagia serve come risposta adattativa a condizioni di stress, consentendo la sopravvivenza cellulare grazie al mantenimento del bilancio energetico (Singh & Cuervo, 2011). Di notevole rilevanza è anche il suo ruolo nel rimodellamento cellulare e nello sviluppo, contribuendo al differenziamento cellulare, che richiede l'eliminazione di proteine, acidi nucleici e organelli inutili (Takano-Ohmuro et al., 2000; Tsukamoto et al., 2008; Singh et al., 2009).

Sempre maggiori sono i dati a supporto della rilevanza fisiologica dell'autofagia e questo giustifica perché alterazioni di questo processo catabolico portano al malfunzionamento cellulare e spesso alla morte, facendo sì che l'autofagia contribuisca alla patogenesi di gravi malattie umane, tra cui cancro, malattie neurodegenerative, infezioni e disordini autoimmuni (Cuervo, 2004; Sridhar et al., 2012). L'autofagia ha un ruolo rilevante anche nelle miopatie, nell'invecchiamento/longevità, nelle patologie associate ad ischemia/riperfusion (come l'infarto del miocardio), nelle malattie epatiche e nella risposta immunitaria innata e adattativa nel corso di infezioni batteriche e/o virali (fig. 13) (Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2008; Yang & Klionsky, 2009; Sridhar et al., 2012).

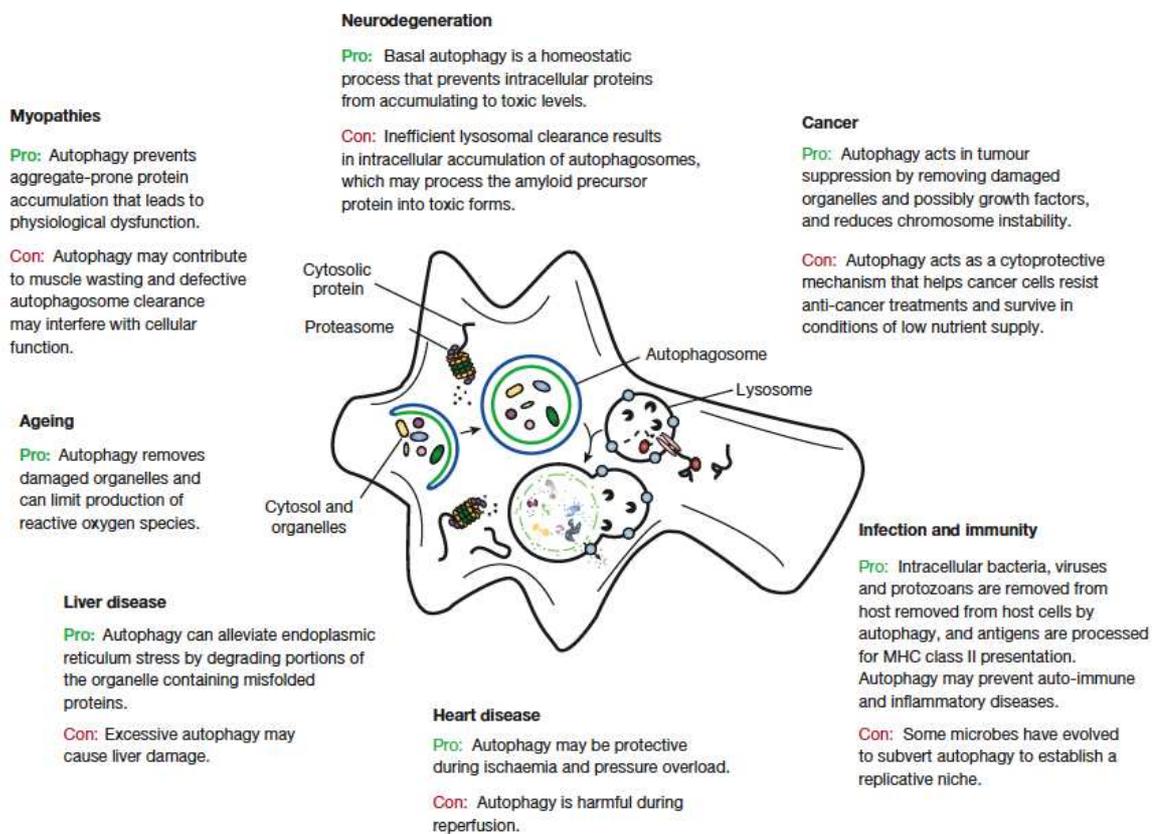


Fig. 13 Ruolo dell'autofagia nella malattie umane.

L'autofagia può agire come un meccanismo citoprotettivo per prevenire varie malattie. In alcuni casi, comunque, l'autofagia può essere deleteria (ad esempio, alcuni microbi sfruttano l'autofagia per sopravvivere) (Mizushima et al., 2008).

4.1 Autofagia e apoptosi: *cross-talk* tra “self-eating” e “self-killing”

La capacità dell'autofagia di permettere alle cellule di adattarsi ai cambiamenti ambientali e di proteggerle contro il danno causato dagli insulti tossici, hanno portato alla classificazione della stessa come meccanismo di sopravvivenza cellulare. Tuttavia, diversi dati suggeriscono che l'autofagia agisce sia nella citoprotezione che nella morte cellulare.

In risposta a molte forme di stress l'autofagia gioca un ruolo citoprotettivo, perché il *knockdown/knockout* dei geni ATG accelera piuttosto che ritardare la morte (Levine & Yuan, 2005). Tuttavia, in condizioni di attivazione incontrollata dell'autofagia (ad esempio,

l'overespressione di Beclin 1 nelle cellule di mammifero o di Ag1 in *Drosophila*), l'autofagia può portare alla morte cellulare, potenzialmente attraverso l'attivazione dell'apoptosi (Pattingre et al., 2005; Scott et al., 2007) o come risultato dell'incapacità delle cellule di sopravvivere alla degradazione non specifica di grandi quantità di contenuti citoplasmatici.

L'autofagia interviene come meccanismo alternativo di morte soprattutto nelle cellule apoptosi-deficienti (Shimizu et al., 2004; Levine & Yuan, 2005), suggerendo che come via di morte è scelta dalla cellula quale ultima risorsa. Al contrario, l'apoptosi è promossa quando l'autofagia è inibita (Hara et al., 2006).

L'interazione tra l'autofagia e l'apoptosi è comunque molto complessa, le due *pathway* sono regolate da fattori comuni, condividono componenti comuni e ciascuna può modificare e regolare l'attività dell'altra (Mizushima et al., 2008). La funzione citoprotettiva dell'autofagia è mediata in molte circostanze dalla modulazione negativa dell'apoptosi.

Sebbene i meccanismi che mediano la complessa regolazione crociata di autofagia e apoptosi non siano ancora completamente conosciuti, importanti punti di *cross-talk* includono l'interazione tra Beclin 1 e Bcl-2/Bcl-xL, l'interazione tra FADD e Atg5, il clivaggio caspasi- e calpaine-mediato di proteine autofagia-correlate, e la degradazione autofagica delle caspasi (Maiuri et al., 2007; Gordy & He, 2012).

4.2 Autofagia e neurodegenerazione

Il mantenimento dell'omeostasi cellulare è essenziale per i neuroni, un tipico esempio di cellule differenziate che non si dividono. L'esistenza di un'autofagia basale nei neuroni e del suo contributo al mantenimento della sopravvivenza neuronale è stata confermata da studi condotti su modelli di topi transgenici sottoposti al *knockout* nel sistema nervoso centrale di geni essenziali per l'autofagia (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Questi animali, anche in assenza di altri stress, presentano una marcata neurodegenerazione associata all'accumulo di corpi d'inclusione intracellulari di natura proteica.

Come molte altre cellule, i neuroni up-regolano l'autofagia in risposta ai più comuni stressogeni, ma anche in difesa a danni neurone-specifici, come l'axotomia, l'ischemia neuronale o l'eccitossicità (Midorikawa *et al.*, 2010; Piras *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2011; Rodriguez-Muela, 2012). La compromissione dell'attività autofagica precipita la morte neuronale dopo il danno (Liu *et al.*, 2010).

Alterazioni della *pathway* autofagica sono state descritte in diverse patologie neurodegenerative, come alcune forme di malattia di Parkinson, di Huntington e di Alzheimer (Rubinsztein *et al.*, 2005; Nixon, 2006). Queste condizioni patologiche condividono la presenza di proteine alterate che si accumulano all'interno dei neuroni, organizzandosi in forma di strutture oligomeriche o multimeriche. Sia la perdita di funzione della proteina patogena, sia la tossicità associata alla presenza di aggregati proteici, contribuiscono allo sviluppo della malattia. Una prima correlazione tra neurodegenerazione e autofagia origina dall'osservazione che questi aggregati proteici possono essere eliminati mediante autofagia (Ravikumar *et al.*, 2002; Yamamoto & Simonsen, 2011).

Nella malattia di Alzheimer la macroautofagia contribuisce all'eliminazione del prodotto tossico del precursore della proteina amiloide (APP), la proteina β -amiloidica ($A\beta$). Tuttavia, la *clearance* della proteina $A\beta$ è compromessa con la progressione della malattia, a causa di difetti nel processo autofagico (Yu *et al.*, 2005). Nella malattia di Parkinson la proteina patogena più comune, la α -sinucleina, nella sua forma solubile è un substrato sia per il sistema del proteosoma che per l'autofagia chaperone-mediata (CMA); tuttavia, la macroautofagia è l'unica via per l'eliminazione delle varianti patogene di questa proteina una volta aggregate (Webb *et al.*, 2003). La macroautofagia è stata dimostrata essere un meccanismo efficace anche nella rimozione degli aggregati di huntingtina, la proteina mutata nella malattia di Huntington e il principale componente dei corpi di inclusione osservati nei neuroni affetti dalla patologia (Ravikumar *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 2005).

In queste patologie l'autofagia gioca, generalmente, un ruolo protettivo grazie alla sua funzione degradativa, che permette la *clearance* delle forme potenzialmente tossiche delle proteine patogene.

L'attivazione farmacologica dell'autofagia in un modello animale sperimentale di malattia di Huntington riduce la tossicità cellulare e rallenta la progressione della malattia (Ravikumar et al., 2004). Gli effetti benefici della *up-regulation* dell'autofagia sono stati dimostrati anche in modelli sperimentali di altre condizioni neurodegenerative (si veda: Harris & Rubinsztein 2012). Queste osservazioni suggeriscono la possibilità di utilizzare modulatori dell'autofagia come base per l'approccio terapeutico a questo tipo di malattie e, infatti, sono in corso *screening* mirati ad identificare composti chimici con una maggiore selettività e potenza (Fleming et al., 2011).

Tuttavia, ci sono delle limitazioni riguardo l'uso dell'*upregulation* dell'autofagia a scopo neuroprotettivo (Wong et al., 2010). Ad esempio, non tutti gli aggregati proteici sono riconosciuti dal "macchinario" autofagico (Wong et al., 2008); inoltre, la funzione protettiva dell'autofagia può essere ristretta a particolari stadi della malattia, mentre in altre fasi può essere inefficace (Kegel et al., 2000) o addirittura dannosa (Cheng et al., 2011).

Una condizione in cui indurre l'autofagia potrebbe non essere efficace contro la neurodegenerazione è quando il macchinario autofagico stesso è compromesso e quindi la formazione o la *clearance* degli autofagosomi non sono garantite. In varie condizioni neurodegenerative sono stati descritti difetti a carico di uno o più step del processo macroautofagico, dalla fase di inizio (Lim et al., 2011), al riconoscimento del carico (Martinez-Vicente et al., 2010), al *trafficking* vescicolare (Ravikumar et al., 2005), alla fusione con i lisosomi (Lee et al. 2010b). Alterazioni in ciascuna di queste fasi hanno come conseguenza l'accumulo intracellulare degli autofagosomi, che in alcuni casi può contribuire alla conversione della proteina precursore nelle sue forme tossiche (Yu et al., 2005). In più, recenti studi hanno dimostrato che, in certe condizioni, gli autofagosomi possono diventare una risorsa di specie reattive dell'ossigeno e aggravare la neurotossicità (Kubota et al., 2010).

Anche difetti nel compartimento lisosomiale possono rappresentare una limitazione per la modulazione dell'autofagia a scopo terapeutico, dato l'impatto negativo che questi possono avere sulla degradazione degli autofagosomi nei disordini neurodegenerativi (Settembre et al., 2008; Lee et al., 2010a).

In conclusione, in ogni tentativo di manipolazione terapeutica della autofagia è importante prendere in considerazione la natura dinamica dei cambiamenti a carico del sistema

autofagico durante il corso della malattia e conoscere gli effetti dell'autofagia nei differenti stadi della patologia, al fine di evitare trattamenti arbitrari potenzialmente dannosi per il paziente.

4.3 Autofagia e cancro

4.3.1 L'autofagia come meccanismo oncosoppressore

L'autofagia gioca un ruolo importante nella soppressione dei tumori. Deficienze nell'autofagia portano all'accumulo di macromolecole e organelli danneggiati (soprattutto mitocondri), inducendo conseguentemente stress ossidativo, danno al DNA e instabilità genomica; perciò, difetti nell'autofagia sono stati associati con l'accumulo di mutazioni oncogeniche e incremento della suscettibilità ai tumori (Choi, 2012).

Il cancro è stato la prima patologia umana ad essere connessa all'autofagia dopo la scoperta che Beclin 1, componente centrale del complesso di formazione dell'autofagosoma, è monoallelicamente deleta nel 40-74% delle forme sporadiche di cancro umano alla mammella, alle ovaie e alla prostata (Liang et al., 1999). Studi indipendenti dimostrarono che topi eterozigoti Beclin 1^{+/-} sviluppano tumori spontanei, inclusi linfomi, carcinoma polmonare, carcinoma epatocellulare e lesioni precancerose mammarie (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). La comparsa di tumori spontanei iperproliferanti è stata in seguito osservata durante la delezione di altri geni autofagia-correlati, come UVRAG, Bif-1 e Atg4c (Liang et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Mariño et al., 2007). Inoltre, i prodotti di comuni oncogeni, come PI3K di classe I, PKB, TOR e Bcl-2, agiscono come repressori dell'autofagia, mentre i prodotti dei geni oncosoppressori, come p53, PTEN, DAPk e TSC1/TSC2 esercitano un effetto stimolatorio sull'autofagia (Sridhar et al., 2012) (fig. 14).

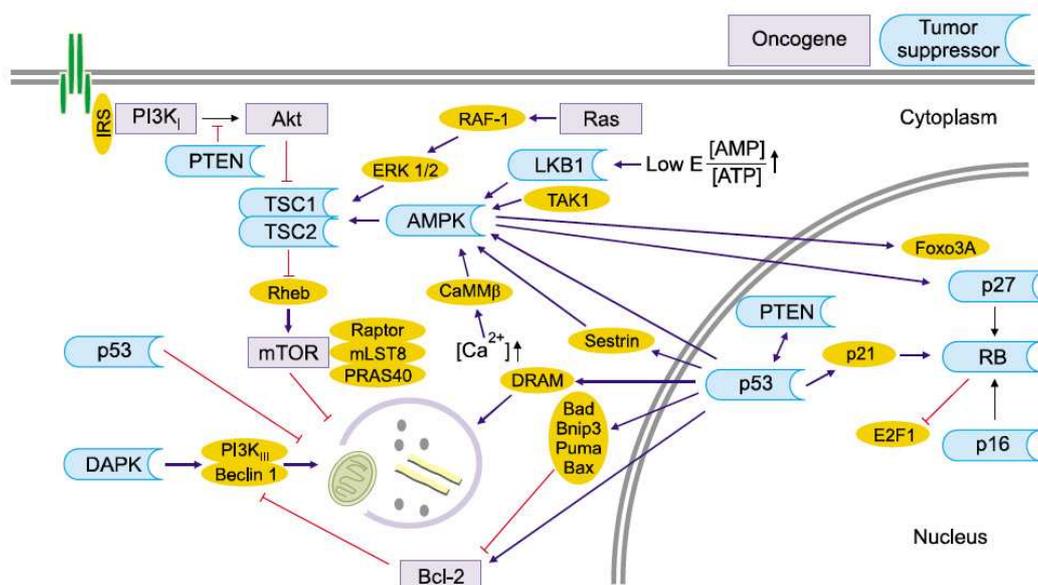


Fig. 14 Oncogeni e oncosoppressori associati con la regolazione dell'autofagia.

I geni oncosoppressori (in blu), ad eccezione di p53 citoplasmatico, sono tra i fattori che regolano positivamente l'autofagia, mentre gli oncogeni (in rosa) inibiscono l'autofagia (Choi, 2012).

4.3.2 Modulazione dell'autofagia per la terapia del cancro

Il meccanismo molecolare sottostante alla regolazione dell'autofagia e il ruolo dell'autofagia nelle cellule cancerose non è stato completamente compreso. Tuttavia, la modulazione farmacologica dell'autofagia sembra avere un potenziale clinico significativo come nuova strategia terapeutica per l'eradicazione del cancro.

Il duplice ruolo dell'autofagia nella citoprotezione e nella morte cellulare programmata fa sì che questo processo possa agire sia per proteggere che per uccidere le cellule cancerose, dipendentemente dal particolare tipo di cancro, dalla progressione della malattia e dal metodo di trattamento che si sta applicando (fig. 15). È necessario, quindi, che tutti questi fattori vengano considerati quando si contempla la modulazione dell'autofagia come intervento terapeutico.

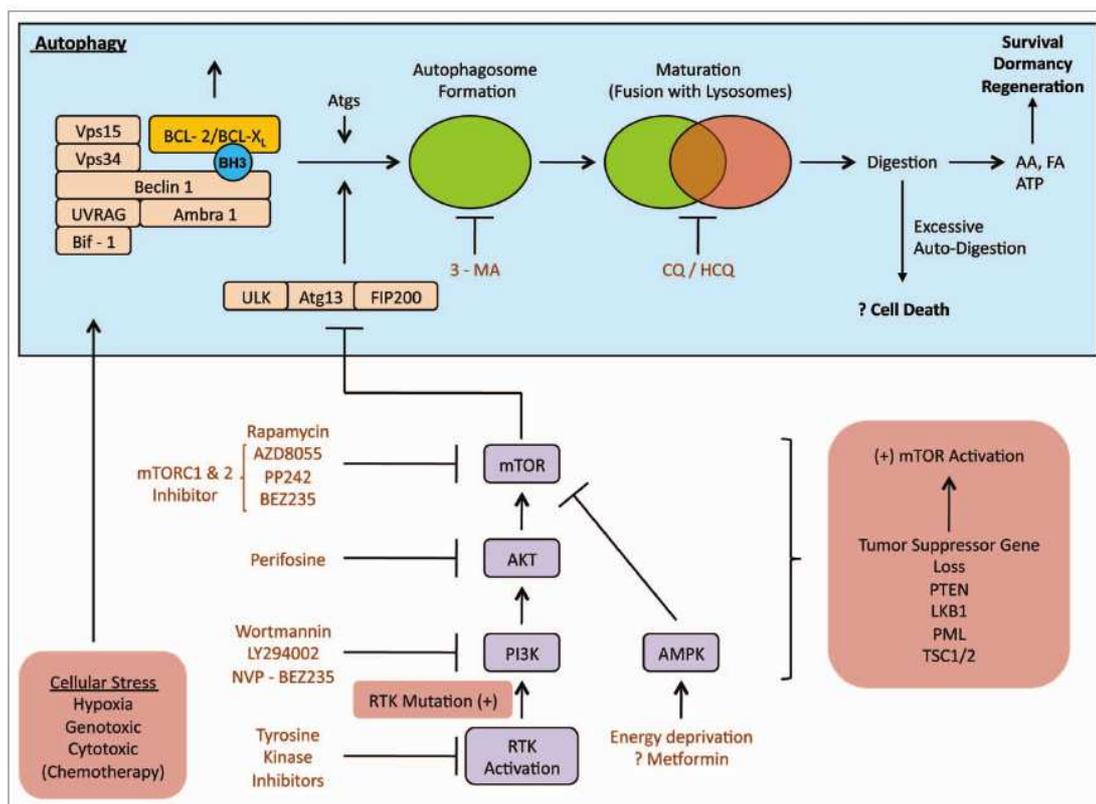


Fig. 15 Modulazione dell'autofagia per la terapia del cancro.

L'inibizione dell'autofagia citoprotettiva mediante l'uso di 3-Metiladenina (3-MA) o Clorochina/Idroclorochina (CQ/HCQ) può incrementare la morte delle cellule tumorali. L'inibizione di mTOR, invece, può indurre l'autofagia e in alcuni contesti cellulari l'autofagia eccessiva o sostenuta può promuovere la morte cellulare e risultare utile a scopo terapeutico (Yang et al., 2011a).

Sebbene l'autofagia fosse stata inizialmente classificata come un meccanismo oncosoppressivo, evidenze sperimentali suggeriscono che in certe condizioni essa esercita un ruolo pro-oncogenico.

Nello stadio iniziale di sviluppo del cancro, il controllo di qualità operato dall'autofagia, in particolare sul mantenimento della stabilità genomica, inibisce la tumorigenesi, conferendo a questa via una funzione anti-oncogena. L'autofagia potrebbe giocare un ruolo importante anche nel mantenimento o nell'entrata delle cellule in fase G₀ e, conseguentemente, prevenire l'iperproliferazione spontanea delle cellule (Scott et al., 2007). Al contrario, in una

fase più tardiva della malattia, lo stress metabolico (che deriva dalla deficienza di nutrienti e ossigeno e/o dalla crescente domanda energetica delle cellule tumorali in rapida divisione) causa induzione dell'autofagia, poiché la cellula, necessitando di risorse alternative di energia e metaboliti, inizia a degradare parte di se stessa per rimanere in vita (*Rabinowitz & White, 2010*). In più, l'autofagia può essere indotta come risposta cellulare adattativa alle terapie anticancro, portando alla chemioresistenza e alla sopravvivenza cellulare (*Chen & Karantza-Wadsworth, 2009*).

Difetti nell'apoptosi sono stati osservati in differenti tumori solidi ed essi possono incrementare la resistenza delle cellule tumorali a varie terapie anticancro. Un'attivazione sostenuta dell'autofagia, che porta alla degradazione di organelli e proteine al di là della soglia di sopravvivenza, può uccidere alcune cellule cancerose con un'alta soglia apoptotica (*Yang et al., 2011a*). In questo caso, perciò, la morte cellulare *via* autofagia potrebbe rappresentare un'utile strategia terapeutica alternativa (*Eisenberg-Lerner et al., 2009*).

La “morte cellulare autofagica” è anche nota come morte cellulare programmata di tipo II (*Gozuacik & Kimchi, 2007*), ed è definita come un tipo di morte: 1) che avviene in assenza di apoptosi, 2) in cui c'è un incremento del flusso autofagico nelle cellule che stanno morendo e 3) che può essere prevenuta sopprimendo l'autofagia attraverso l'inibizione farmacologica o approcci genetici (*Shen & Codogno, 2011*).

Alcune cellule tumorali (specialmente quelle che hanno perso modulatori essenziali dell'apoptosi, come BAK, BAX o le caspasi) mostrano morte cellulare autofagica quando sono trattate con alcuni agenti chemioterapici, come etoposide, fenretinide e desametasone (*Choi, 2012*). Anche alcuni fitocomposti, come fisetina e resveratrolo, sono capaci di indurre morte cellulare autofagica in diversi tipi di cellule tumorali (*Puissant et al., 2010; Suh et al., 2010*). Tuttavia, la morte cellulare sembra essere indotta in maniera strettamente dipendente dallo stimolo, dal tipo di cellula e dal *background* genetico (*Choi, 2012*). Nonostante ciò, studi preclinici confermano l'utilità di induttori dell'autofagia come strategia per la terapia di alcuni tumori (*Yang et al., 2011a*) (Tabella 1).

Cancer type	Treatment	Delayed cell death by autophagy inhibition		
		Early step	Late step	siRNA
Prostate cancer	Phenethyl isothiocyanate	3-MA		ATG5
	Fisetin		CQ	Beclin 1
Glioma	Sodium selenite	3-MA	CQ	ATG6, ATG7
	Imatinib	3-MA		ATG5
	Cannabinoid	3-MA	HCQ, E64+Pepstatin A	ATG1, ATG5, AMBRA1
	β -Lapachone	3-MA	BFA	ATG5, ATG6
Lung cancer	Elisidepsin (PM02734)	3-MA		ATG5
CML	Resveratrol		BFA	ATG5, LC3, p62

Tabella 1. Studi preclinici che supportano l'efficacia dell'induzione dell'autofagia per la terapia del cancro (Choi, 2012).

CAPITOLO II: L'Olio Essenziale di Bergamotto

1. Il Bergamotto

1.1 Caratteristiche botaniche del *Citrus bergamia*

Il *Citrus bergamia*, Risso et Poiteau, anche classificato come *Citrus aurantium L. subspecies bergamia*, Wigt et Arn, è un agrume appartenente alla famiglia delle Rutaceae, genere Citrus, che cresce quasi esclusivamente nel sud Italia, in una limitata area della costa ionica calabrese. La pianta viene coltivata anche in Africa (Mali, Guinea, Costa d'Avorio e Camerun) e Sud America (Argentina e Brasile), ma è in Calabria che essa dà il meglio dei suoi frutti, poiché è in questa regione che sono soddisfatte le condizioni microclimatiche favorevoli al suo sviluppo (soprattutto per la presenza di argillite, calcare e depositi alluvionali).

La specie coltivata in Calabria è la *Vulgaris*, distinta in tre *cultivar*, morfologicamente differenti dal punto di vista botanico: *Femminello*, *Castagnaro* e *Fantastico*. Quest'ultima *cultivar* rappresenta circa l'80% delle piante di bergamotto coltivate sulla costa ionica calabrese ed è caratterizzata da una resa elevata e da un'ottima qualità dei frutti prodotti.

L'origine del *Citrus bergamia* non è nota, ma studi genetici lo considerano un ibrido tra il *Citrus limetta* e il *Citrus aurantium*. Il bergamotto viene riprodotto per innesto e il portainnesto più usato è l'arancio amaro, che dà luogo ad alberi robusti, longevi e resistenti alle avversità (Crispo & Dugo, 2003).

L'albero di bergamotto normalmente non supera i tre metri di altezza e si presenta con una struttura di modesto vigore. Le foglie sono oblunghe, scure e glabre, mentre i fiori (zagare) sono bianchi e riuniti in gruppi. Il suo frutto, simile ad un arancio, profumatissimo, appare rotondeggiante o piriforme, di un colore che va dal verde al giallo, secondo il grado di maturazione, ed è caratterizzato da una parte esterna (esocarpo o epicarpo) di notevole spessore e ricca di ghiandole (otricoli) che contengono un olio essenziale; la parte direttamente saldata all'esocarpo è detta mesocarpo ed appare bianca e spugnosa, mentre la parte più interna (endocarpo), costituisce la vera polpa del frutto ed è suddivisa in 12-15 logge o spicchi per mezzo di sottili membrane (fig. 1).



Fig. 1 Tavola botanica del *Citrus Bergamia*.

Cromolitografia di Köhler in cui sono raffigurate le caratteristiche botaniche del Citrus bergamia, anche noto come Bergamot Orange (Hermann Köhler, Medical Plants, 1887).

1.2 L'olio essenziale di bergamotto (BEO)

Dal frutto del *Citrus Bergamia* viene prodotto un olio essenziale noto come BEO (*Bergamot Essential Oil*), che si presenta come un liquido di colore giallo-verde, dal profumo intenso, molto richiesto dalle industrie cosmetiche, profumiere, alimentari e farmaceutiche.

L'estrazione dell'olio essenziale di bergamotto ebbe inizio in Calabria già intorno alla metà del XVII secolo e fu a lungo eseguita mediante un processo manuale detto "a spugna", consistente nel tagliare i frutti a metà, cavare la polpa con un rastrello e comprimere, con un movimento rotatorio della mano, la scorza contro una spugna naturale in modo da far sprizzare dagli otricoli l'essenza. Le spugne erano poi spremute in una "concolina" e l'olio

separato per decantazione. Negli anni '40 fu messa a punto da Nicola Barillà la prima macchina operativa nell'estrazione dell'olio (la "macchina calabrese"), caratterizzata però da una bassa resa e perciò sostituita successivamente dalle più moderne "macchine pelatrici", tuttora in uso.

Attualmente, in accordo con la Farmacopea Ufficiale italiana (1991), l'olio essenziale di bergamotto è ottenuto mediante spremitura a freddo ("cold press") dell'epicarpo e, in parte, del mesocarpo del frutto fresco. Il BEO così prodotto è chimicamente composto da una frazione volatile (circa il 93-96%) e da una frazione non volatile (il restante 4-7%). La frazione volatile è costituita da idrocarburi monoterpenici e sesquiterpenici (limonene, α - e β -pinene, β -mircene, γ -terpinene, terpinolene, sabinene, β -bisabolene) e derivati ossigenati (linalolo, nerale, geraniale, acetato di geranile, linalil acetato, acetato di nerile), mentre la frazione non volatile contiene cere, flavoni polimetossilati, cumarine e psoraleni (Mondello et al., 1993; Dugo et al., 2000).

Dall'analisi quantitativa della frazione volatile è emerso che gli idrocarburi monoterpenici costituiscono dal 38,7 al 70,5%, gli esteri dal 22,8 al 42,2% e gli alcoli dal 3,8 al 22,8%; i composti carbonilici e gli idrocarburi sesquiterpenici sono invece poco rappresentati (Verzera et al., 2003). Più nello specifico, l'analisi quali-quantitativa condotta mediante gascromatografia ad alta risoluzione accoppiata alla spettrometria di massa (HRGC/MS), ha permesso di identificare la presenza di 78 componenti (fig. 2).

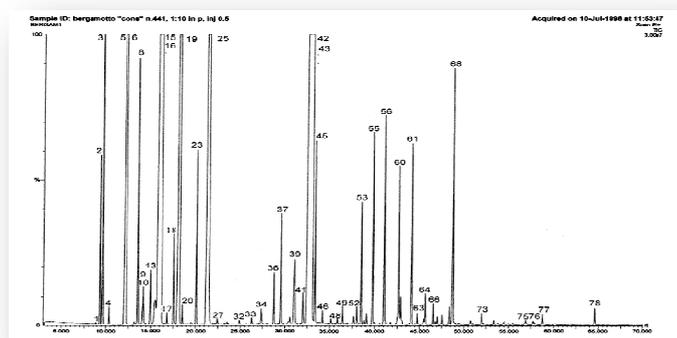


Fig. 2 Cromatogramma HRGC/MS della frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto (Verzera et al., 2003).

I composti quantitativamente più abbondanti nella frazione volatile sono gli idrocarburi monoterpenici limonene, γ -terpinene e β -pinene, l'alcol monoterpenico linalolo e l'estere monoterpenico linalil acetato che, insieme, costituiscono più del 90% dell'intero olio (Mondello et al., 1995; Verzera et al., 1996; Verzera et al., 2003).

Il linalolo e il linalil acetato caratterizzano le note olfattive del BEO ed il loro contenuto (in particolare, un basso rapporto linalolo/linalil acetato) è considerato un indice di qualità del prodotto (Statti et al., 2004).

Anche la composizione enantiomerica dei singoli componenti è ritenuta fondamentale al fine di stabilire la qualità e la genuinità dell'olio, in esso, infatti, ogni composto chirale è presente in un caratteristico rapporto enantiomerico (Verzera et al., 2003). Per il linalolo, il linalil acetato, il β -pinene, il sabinene e il terpinen-4-olo vi è un eccesso dell'isomero (-), mentre per il limonene e l' α -terpinolo prevale l'isomero (+) (Statti et al., 2004).

Durante la stagione produttiva i rapporti enantiomerici di linalolo, linalil acetato e limonene si presentano costanti, quelli del β -pinene e del sabinene variano entro limiti piuttosto piccoli, quelli del terpinen-4-olo variano invece in maniera irregolare (Mondello et al., 1998). L'analisi della distribuzione enantiomerica dei costituenti del BEO permette, perciò, di avere informazioni sul periodo di produzione dell'olio, ma anche sulla tecnica di estrazione utilizzata e sul grado di purezza. Infatti, la presenza di sostanze, naturali o di sintesi, di origine diversa da quelle presenti nel bergamotto, determina una variazione del rapporto enantiomerico dei componenti originali dell'olio (Verzera et al., 2003).

Anche il residuo non volatile, che influenza le proprietà olfattive dell'essenza, dal momento che si comporta come fissativo naturale dei profumi, fornisce indicazioni ed informazioni utili sulla qualità dell'olio. Esso contiene cere, flavoni polimetossilati, cumarine e psoraleni. In particolare, mediante cromatografia HPLC sono state identificate le cumarine citroptene e 2,5-geranilossi-7-metossicumarina e gli psoraleni bergaptene (5-metossipsoralene) e bergamottina (5-geranilossipsoralene) (Verzera et al., 2003).

Il bergaptene ed il citroptene sono eccellenti indicatori della genuinità dell'olio di bergamotto, in quanto, nel caso di oli ricostituiti o addizionati di sostanze estranee, i loro

valori risultano più bassi del normale, anche in seguito a piccole aggiunte (*Mondello et al., 1993*).

A causa della crescente domanda da parte delle industrie, l'olio essenziale di bergamotto è stato soggetto negli ultimi anni ad adulterazioni con prodotti più economici, come l'olio di limetta; pertanto, allo scopo di tutelare la qualità e la genuinità del BEO, nel 1931 è stato istituito il "Consorzio Produttori Bergamotto", antenato dell'attuale "Consorzio del Bergamotto", con lo scopo di gestire e tutelare il prodotto mediante un'azione a garanzia della purezza dell'essenza. Il Governo italiano, con la Legge n° 41 del 14/10/2002 ha disciplinato il settore con le "Norme per la salvaguardia della coltura e della qualità della produzione di bergamotto", introducendo controlli accurati del prodotto, inclusi test di qualità e certificati di purezza. La legge, in particolare, prevede che l'essenza di bergamotto sia estratta a freddo dai frutti di bergamotto che abbiano raggiunto la cosiddetta "maturazione tecnologica" (art. 4) e che tutte le essenze prodotte annualmente debbano essere obbligatoriamente consegnate al Consorzio di Reggio Calabria (art. 2; art. 3). I diversi campioni di essenza sono poi sottoposti ad un'analisi chimica presso la Stazione Sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati degli agrumi di Reggio Calabria (art. 13), dove le partite di essenze saranno poi classificate da una commissione di valutazione merceologica che attribuirà un coefficiente variabile da 0.90 a 1.10 alle partite dichiarate pure e che non presentano difetti organolettici (art. 14).

Data l'unicità del prodotto, la Comunità Europea, nel marzo del 2001, ha conferito all'olio essenziale di bergamotto di Reggio Calabria la Denominazione di Origine Protetta (D.O.P.) (Reg. CE n. 509/01, GUCE L.76 del 16/03/01).

1.3 Usi dell'olio essenziale di bergamotto

L'olio essenziale di bergamotto resta da secoli uno dei principali costituenti di base per la realizzazione dei profumi; ciò è dovuto al suo odore intenso e gradevole e alle sue proprietà d'amalgama che fissano il *bouquet* aromatico dei profumi ed armonizzano tra loro tutte le essenze, esaltandone la fragranza. Trascorsi ormai tre secoli dall'invenzione dell'acqua di

Colonia, di cui l'essenza di bergamotto costituisce il maggior componente, l'olio essenziale di bergamotto rientra tutt'oggi nella composizione dei più noti profumi (*Peyron, 2003*).

Il BEO viene impiegato anche in ambito cosmetico per la produzione di detergenti e creme per il corpo. Nell'industria farmaceutica è utilizzato per la produzione di lozioni per la pulizia del viso e come disinfettante del cavo orale e ad esso vengono attribuite anche proprietà antisettiche delle vie respiratorie e urinarie, nonché proprietà digestive, che ne hanno consentito il suo inserimento nelle Farmacopee ufficiali di molti paesi (*Capasso et al., 2000*).

Fra gli usi storici del bergamotto si ricorda il suo impiego nella preparazione delle famose "tabacchiere di Varapodio", piccole ampolle prodotte dall'essiccazione della buccia del frutto svuotato della polpa, poi utilizzate per contenere e aromatizzare il tabacco da pipa (*De Masi, 2003*).

Molto diffuso è anche l'impiego del bergamotto e del suo olio nell'industria alimentare, la tradizione gastronomica calabrese vanta, infatti, una serie di ottimi prodotti realizzati con l'essenza di bergamotto (creme, cioccolatini, canditi, torroni, gelati, liquori, bibite). Inoltre, in Francia vengono prodotte le caramelle "bergamotes di Nancy", dall'aroma inconfondibile, e in Inghilterra il famoso "Twinings Earl Grey Tea", un tè aromatizzato al bergamotto esistente fin dal 1830 e tuttora uno dei più apprezzati dagli intenditori (*Spinelli, 2003*).

Va ricordato anche l'uso dell'olio essenziale di bergamotto nella medicina popolare come antisettico, per facilitare la guarigione delle ferite e come antielmintico (www.bergamottoconsorzio.it).

Le prime osservazioni sulle proprietà medicamentose e balsamiche dell'essenza di bergamotto, ed in particolare sulle proprietà antinfettive rigeneranti, balsamiche e cicatrizzanti, furono fatte nel 1804 dal medico reggino Francesco Calabrò ("*Della Balsamica virtù dell'essenza di bergamotta nelle ferite*". *Tip. Fiumara e Nobolo, Messina*). Risale, invece, al 1932 un primo studio clinico-sperimentale condotto da Antonio Spinelli sull'uso dell'essenza di bergamotto come antisettico chirurgico, in cui sono riportate anche le esperienze di un

altro medico reggino, Vincenzo De Domenico (1854), che ne autosperimentò l'uso per os, assumendo 15 gocce in un'unica somministrazione, riscontrando soprattutto effetti sedativi generali e di sonnolenza, di abbassamento della frequenza cardiaca e respiratoria. Lo stesso medico fu autore del libro *"Sulla efficacia della essenza di Bergamotto nel trattamento delle febbri intermittenti"*, in cui, descrivendo alcuni casi di febbre malarica trattati, cita gli ottimi risultati ottenuti con l'essenza di bergamotto, sia come antifebbrile che come vermifugo.

Fu molto diffuso in passato anche l'impiego dell'olio essenziale di bergamotto come fragranza per ambienti, soprattutto per le proprietà ritenute "psicotropiche" del suo aroma, che sembra agire sulla psiche in senso tonico e antidepressivo.

L'olio essenziale di bergamotto trova applicazione tutt'oggi nell'ambito dell'aromaterapia, una medicina alternativa molto diffusa nei paesi industrializzati. Benché non siano del tutto comprese le basi razionali degli effetti esercitati, l'aromaterapia è ritenuta un valido approccio terapeutico per migliorare l'umore, lenire l'ansia da stress, la depressione ed il dolore cronico (Brooker et al., 1997; Perri & Perri, 2006). Diversi studi fisiologici e farmacologici, combinati con analisi fitochimiche, indicano che una gran varietà di oli essenziali esercita specifici effetti sul SNC e questo è supportato dal fatto che singoli componenti degli oli essenziali raggiungono il sangue, sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica ed entrare nel sistema nervoso centrale (SNC) dopo inalazione, applicazione transdermica, somministrazione intraperitoneale, sottocutanea o somministrazione orale (Perri & Perri, 2006).

1.4 Proprietà tossicologiche dell'olio essenziale di bergamotto

L'applicazione diretta dell'olio essenziale di bergamotto sulla pelle ha un effetto fototossico, che si manifesta con aumento del rossore dopo esposizione alla luce ultravioletta (Zaynoun et al., 1977). Questa proprietà è condivisa con molti altri frutti del genere Citrus e, a causa delle richieste di mercato imposte dall'industria cosmetica, gli oli essenziali sono spesso privati di alcuni costituenti come il bergaptene e i monoterpeni

idrocarburi; il primo è responsabile delle reazioni di fototossicità dell'olio, mentre i monoterpeni idrocarburi, oltre che essere irritanti per la cute (Karlberg *et al.*, 1992), sono molecole particolarmente instabili poiché vanno incontro a processi di ossidazione (Karlberg *et al.*, 1992; Neuenschwander *et al.*, 2010) e possono alterare le proprietà organolettiche degli oli essenziali.

A partire dall'olio essenziale di bergamotto, le industrie estrattive preparano, quindi, un'essenza di bergamotto priva di bergaptene (BEO-BF, *bergaptene free*) e un'essenza priva sia di bergaptene che della frazione idrocarbonica dell'olio (BEO-HF/BF, *hydrocarbon fraction/bergaptene free*).

Il bergaptene sembra essere implicato anche nella tossicità causata dall'abuso di tè aromatizzato al bergamotto ("Twinings Eal Grey Tea"). La rivista medica *Lancet* (Finsterer, 2002) riportò il caso clinico di un uomo che accusava crampi muscolari ai piedi, insensibilità alle mani ed annebbiamenti della vista in seguito al consumo giornaliero di oltre tre litri di tè aromatizzato. La tossicità neuromuscolare fu poi attribuita al bergaptene, per la sua capacità di alterare la permeabilità dei canali al potassio (During *et al.*, 2000).

Il bergamotto è anche una risorsa di bergamottina che, insieme al composto chimicamente correlato 6',7'-diidrobergamottina, si crede essere responsabile dell'interazione tra il succo di pompelmo (ingerito come alimento) e una grande varietà di farmaci, di cui causa un'alterazione del metabolismo epatico (Bailey *et al.*, 1998).

1.5 Proprietà farmacologiche dell'olio essenziale di Bergamotto

1.5.1 Azione antibatterica e antimicotica

L'azione antibatterica e antimicotica del bergamotto e dei suoi estratti è stata ampiamente documentata in letteratura. Tra i ceppi batterici gram-negativi studiati *in vitro*, l'*Escherichia Coli* risulta essere sensibile all'estratto di bergamotto e la concentrazione minima che determinava l'inibizione della crescita batterica (MIC) è compresa tra 200-600 µg/ml. Sono risultati sensibili anche *Pseudomonas putida* e *Salmonella enterica* (Mandalari

et al., 2007) e tra i batteri gram-positivi, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Fisher & Phillips, 2006).

È stata documentata l'attività del bergamotto anche contro alcuni micoplasmi, batteri a localizzazione intracellulare, tra i quali: *M. pneumoniae*, *M. hominis* e *M. fermentans* (Bisignano et al., 2003). Recentemente, il BEO e i suoi maggiori costituenti sono stati dimostrati efficaci anche contro ceppi di *Mycoplasma hominis* (incluso PG21), *Mycoplasma fermentans* (Pg18 eK7) e *Mycoplasma pneumoniae* (m129) (Furneri et al., 2012).

L'olio essenziale di bergamotto è risultato efficace *in vitro* anche su colonie di *Arcobacter butzleri* (Fisher et al., 2007) ed è stato dimostrato essere un potente agente antifungineo nei confronti di specie di *Candida* clinicamente importanti, tra cui *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (Romano et al., 2005). In aggiunta, l'olio di bergamotto è attivo contro specie piuttosto severe di dermatofiti, come *Trichophyton*, *Microsporum* ed *Epidermophyton*, suggerendo il suo potenziale uso per il trattamento topico delle dermatofitosi (Sanguinetti et al., 2007).

1.5.2 Proprietà neurobiologiche

I dati accumulati finora in letteratura indicano che il BEO è dotato di interessanti effetti neurobiologici, originati, almeno in parte, da una documentata interferenza con i meccanismi di base della plasticità sinaptica, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Bagetta et al., 2010).

a) Effetti sul comportamento e sull'EEG

Numerosi dati sono stati raccolti a supporto degli effetti esercitati dal BEO a livello del SNC di ratto. In particolare, attraverso tecniche di elettroencefalografia (EEG) sviluppate per monitorare aree discrete del SNC e correlare cambiamenti comportamentali a variazioni dello spettro EEG, è stato riscontrato che la somministrazione sistemica di dosi crescenti (100, 250, 500 µl/Kg, intraperitoneale, i.p.) di BEO causa una sequenza di effetti sedativi e

stimolanti, dose-dipendenti. Un aumento della locomozione e dell'atteggiamento esplorativo, correlato ad un aumento delle bande ad alta frequenza dello spettro EEG, si osserva in seguito alla somministrazione i.p. di 250 µl/Kg, mentre dosi più basse sono associate ad una protratta immobilità e all'aumento delle bande a bassa frequenza (Rombolà *et al.*, 2009).

Ulteriori dati a supporto degli effetti esercitati dal BEO a livello del SNC derivano dalle osservazioni fatte da Saiyudthong e Marsden, che descrivono l'effetto ansiolitico indotto dal fitocomplesso nel ratto. In questo studio sono stati investigati gli effetti della somministrazione nei ratti di BEO per via inalatoria sulle risposte comportamentali associate allo stress e sui livelli di corticosterone plasmatico, in comparazione con gli effetti del diazepam. Dallo studio è emerso che il BEO (1-5% w/w) ha un effetto ansiolitico sovrapponibile a quello indotto dalla somministrazione di diazepam (1 mg/kg, i.p.) e attenua l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), riducendo la risposta del corticosterone allo stress (Saiyudthong & Marsden, 2011).

b) Effetti sulla trasmissione sinaptica

Mediante esperimenti di microdialisi intracerebrale *in vivo*, condotti nell'animale libero di muoversi, Morrone e collaboratori hanno dimostrato che il BEO è in grado di promuovere il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori nel SNC di ratto (Morrone *et al.*, 2007). Il BEO somministrato per via sistemica (i.p.), aumenta i livelli di aspartato, di glicina e di taurina nell'ippocampo attraverso un meccanismo Ca^{2+} -dipendente; somministrato localmente, direttamente nell'ippocampo, aumenta i livelli di aspartato, glicina, taurina, glutammato e GABA, con un meccanismo Ca^{2+} -indipendente.

Esperimenti condotti su preparazioni di sinaptosomi ottenute da ippocampo di ratto hanno permesso di caratterizzare i meccanismi alla base degli effetti indotti dal BEO sul rilascio di neurotrasmettitori. In particolare, a basse concentrazioni (diluizione 1:10000), il rilascio di amminoacidi eccitatori indotto dal BEO risulta di tipo esocitotico, possibilmente dovuto alla stimolazione di recettori presinaptici presenti sulle terminazioni nervose, mentre ad alte

concentrazioni (diluizione 1:3000), determina un rilascio Ca^{2+} -indipendente e carrier-mediato, apparentemente dovuto all'inversione della direzione di lavoro dei trasportatori degli amminoacidi eccitatori (Morrone *et al.*, 2007; Attwell *et al.*, 1993; Levi & Raiteri, 1993).

c) Proprietà neuroprotettive

È stato documentato che la somministrazione intraperitoneale di BEO riduce, in maniera dose-dipendente, il volume d'infarto conseguente ad ischemia cerebrale indotta sperimentalmente nel ratto mediante occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo) (Amantea *et al.*, 2009). Nelle stesse condizioni sperimentali, tramite microdialisi, è stato possibile documentare che il BEO (0,5 ml/Kg i.p.) previene l'aumento dei livelli extracellulari degli amminoacidi a carattere eccitatorio, glutammato ed aspartato, che si osserva nella penombra ischemica subito dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale media (Amantea *et al.*, 2005). Tuttavia, rimane da stabilire se l'effetto sia dovuto ad una normalizzazione dell'attività e/o della direzione di lavoro dei trasportatori o se dipende dall'azione *scavenger* e antiossidante del BEO (Corasaniti *et al.*, 2007). Nello stesso modello sperimentale di MCAo, negli animali pretrattati con il BEO si osserva anche un significativo aumento dei livelli di fosforilazione della chinasi Akt e di uno dei suoi principali substrati, GSK-3 β , rispetto alla corteccia ischemica degli animali controllo (Amantea *et al.*, 2009).

La fosforilazione di Akt promuove la sopravvivenza cellulare mediante la fosforilazione e inattivazione di proteine implicate nei meccanismi di morte (tra cui Bad, caspasi-9 e GSK-3 β), prevenendo, quindi, il rilascio di citocromo c dai mitocondri e l'attivazione della caspasi 3 (Cardone *et al.*, 1998; Brazil & Hammings, 2001; Grimes & Jope, 2001). È quindi concepibile che la neuroprotezione offerta dal BEO nel modello sperimentale MCAo possa derivare dalla sua capacità di incrementare la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di Akt.

L'azione neuroprotettiva del BEO è stata confermata anche da esperimenti condotti *in vitro* su colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, esposte all'azione eccitotossica dell'NMDA (N-metil-D-aspartato). In particolare, il pretrattamento di 1h con BEO (0,005-0,01%) protegge dalla morte cellulare attraverso un meccanismo PI3K-dipendente, che

coinvolge la chinasi Akt, dato che l'effetto neuroprotettivo è revertito in maniera dose-dipendente dall'LY294002, un inibitore della PI3K (Vlahos *et al.*, 1994). In questo stesso modello sperimentale, la preincubazione con un estratto dell'essenza di bergamotto privo di bergaptene (BEO-BF) riduce anch'esso in maniera concentrazione-dipendente la morte cellulare indotta dall'NMDA, mentre una frazione dell'olio priva sia di bergaptene che di idrocarburi monoterpenici (BEO-BF/HF) non risulta protettiva per le cellule, suggerendo che gli idrocarburi monoterpenici potrebbero essere responsabili dell'effetto neuroprotettivo del BEO (Corasaniti *et al.*, 2007).

d) Effetti antinocicettivi

Studi recenti documentano gli effetti antinocicettivi del BEO e dei suoi principi attivi in modelli animali di dolore (Bagetta *et al.*, 2010; Sakurada *et al.*, 2011). Queste osservazioni scientifiche forniscono una base razionale al diffuso impiego del BEO nei massaggi e in aromaterapia, tecnica che si è rilevata utile non solo nell'attenuare gli stati d'ansia e depressivi nei pazienti affetti da cancro (Wilkinson *et al.*, 2007), ma anche nel lenire il dolore neuromuscolare (Ferrel-Torry & Glick 1993).

Gli effetti del BEO sulla nocicezione sono stati studiati mediante il test della capsaicina, un principio attivo contenuto nelle bacche di piante del genere *Capsicum*, che somministrato per via sottocutanea induce nei topi risposte nocicettive simili a quelle ottenute dalla somministrazione intraplantare di formalina (Sakurada *et al.*, 1992). In questo modello sperimentale di dolore, l'iniezione intraplantare, ipsilaterale, di BEO (5, 10, 20 µg) produce un significativo effetto antinocicettivo; al contrario, l'iniezione controlaterale al sito di iniezione della capsaicina (50 µg), non produce alcun effetto antinocicettivo, escludendo un'azione sistemica del BEO, a favore dell'effetto analgesico locale. Tuttavia, il meccanismo periferico attraverso il quale l'olio produce i suoi effetti antinocicettivi è poco chiaro e richiede studi aggiuntivi (Sakurada *et al.*, 2011).

Altri oli essenziali, come quelli estratti da *Salvia sclarea*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula hybrida reydovan* e *Lavandula angustifolia*, riproducono gli effetti antinocicettivi del BEO

nel test della capsaicina; l'azione è probabilmente ascrivibile ad uno o più componenti di natura monoterpica, trattandosi di essenze particolarmente ricche di linalolo e/o linalil acetato (Sakurada *et al.*, 2009). A supporto di questa osservazione, è stato dimostrato che il linalolo (2.5, 5, 10 µg) e il linalil acetato (10, 20 µg), come il BEO (10, 20 µg), riducono in maniera statisticamente significativa la risposta nocicettiva indotta dalla somministrazione intraplantare di capsaicina nei topi (Sakurada *et al.*, 2011).

Recentemente è stato anche riportato che la somministrazione di morfina (intraperitoneale o intratecale) e la somministrazione intraplantare di BEO o di linalolo, a concentrazioni che non producono effetti antinocicettivi, risulta in un sinergico effetto antinocicettivo, suggerendo che i recettori oppioidi locali possono contribuire alla riduzione del dolore indotta dall'iniezione intraplantare di BEO o di linalolo nel test della capsaicina (Sakurada *et al.*, 2009). Questo è in linea con l'osservazione che l'effetto analgesico del linalolo, somministrato per via sottocutanea, è ridotto dal pre-trattamento con l'antagonista dei recettori oppioidi, naloxone (Peana *et al.*, 2004).

Un'altra importante osservazione sperimentale ha documentato che il BEO (1 ml/Kg s.c.) (Bagezza *et al.*, 2010) ed il linalolo (100 mg/Kg s.c.) (Berliocchi *et al.*, 2009) attenuano significativamente l'allodinia meccanica in un modello sperimentale di dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale nel topo, effetto attribuibile, solo in parte, all'azione antinfiammatoria del linalolo (Berliocchi *et al.*, 2009). L'importanza di questo dato deriva soprattutto dalla limitata disponibilità di farmaci efficaci contro il dolore neuropatico che, come è noto, è resistente al trattamento con gli oppioidi (Mao *et al.*, 1995; Ossipov *et al.*, 1995).

1.5.3 Proprietà antiossidanti

Evidenze sperimentali sia *in vitro* che *in vivo* documentano proprietà antiossidanti del BEO. Nello studio condotto da Corasaniti e collaboratori su cellule di neuroblastoma, SH-SY5Y, è stato dimostrato che la pre-incubazione di 1h con il BEO (0.01%) riduce in maniera statisticamente significativa la produzione di specie reattive dell'ossigeno associata all'eccitotossicità da NMDA (1mM) (Corasaniti *et al.*, 2007).

Recentemente, Mollace e collaboratori hanno evidenziato l'azione protettiva esplicata dalla frazione non-volatile dell'olio di bergamotto (BEO-NVF) in un modello sperimentale di angioplastica nei ratti. In tale modello, l'introduzione di un catetere a palloncino nella carotide comune causa un danno meccanico a carico dell'endotelio vasale che determina proliferazione delle cellule della muscolatura liscia vasale e la formazione di un tessuto neointimale; questo processo è associato a stress ossidativo e ad aumento dell'espressione del recettore LOX-1 per le lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate. Il pretrattamento con il BEO-NVF riduce la formazione della neointima, l'accumulo di radicali liberi e l'espressione del recettore LOX-1 (*Mollace et al., 2008*), suggerendo che gli antiossidanti naturali possono rappresentare una strategia terapeutica importante per il trattamento di alcuni disordini vascolari.

2. Proprietà farmacologiche e tossicologiche dei principali costituenti del BEO

I composti quantitativamente più abbondanti nella frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto sono quelli di natura terpenica, in particolare il limonene (25,3-45,4%), il linalil acetato (21,8-41,4%) e il linalolo (3,6-22,7%) (fig. 3). Il principale costituente del residuo non volatile è, invece, il bergaptene (Verzera *et al.*, 2003).

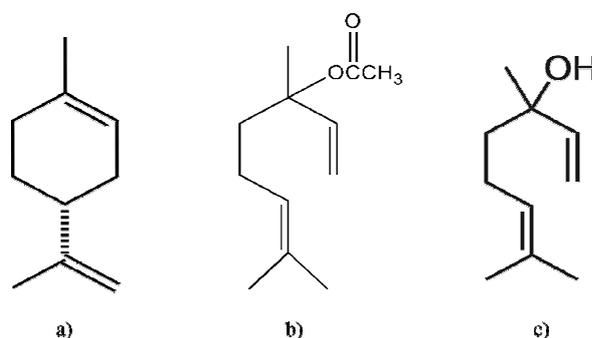


Fig. 3 Struttura chimica di a) limonene, b) linalil acetato, c) linalolo.

2.1 Il limonene

Il limonene [1-metil-4-(1-metiletenil)cicloesano] è un idrocarburo monoterpenco a struttura ciclica ed è il principale costituente degli oli essenziali di varie piante del genere *Citrus* (arancio, limone, mandarino, bergamotto, limetta, pompelmo). Per il suo gradevole odore di limone è commercialmente impiegato come aroma nell'industria alimentare e come additivo nell'industria cosmetica e profumiera.

Essendo un solvente del colesterolo, il limonene è stato usato clinicamente per dissolvere i calcoli biliari (Igimi *et al.*, 1991). È stato anche impiegato per contrastare il bruciore di stomaco, data la sua capacità di neutralizzare l'acidità gastrica e di supportare la peristalsi intestinale (Sun, 2007).

Nel corso degli ultimi 50 anni, diversi studi, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno documentato l'attività chemiopreventiva del limonene nei confronti di vari tipi di cancro.

È stata dimostrata l'efficacia del limonene nel prevenire l'insorgenza di tumori alla mammella indotti chimicamente mediante 7,12-dimetilbenz[α]antracene (DMBA) o nitrosometilurea (*Elson et al., 1988; Maltzman et al., 1989*). Altri studi clinici sull'animale hanno dimostrato che il limonene è efficace nell'inibire lo sviluppo di tumori al polmone, al fegato e allo stomaco (*Wattenberg et al., 1989, 1991*).

La maggior parte delle evidenze sperimentali raccolte finora sono a supporto di una maggiore attività del limonene nello stadio iniziale dello sviluppo neoplastico. Esistono, però, anche prove a dimostrazione dell'attività anticancerosa del monoterpene durante la fase più tardiva della trasformazione e progressione neoplastica, come dimostrato da alcuni studi clinici, condotti su modelli sperimentali animali, in cui il trattamento con il limonene ha determinato la regressione di masse tumorali preesistenti, fino al 50-80% del loro volume iniziale (*Chander et al., 1994*).

I meccanismi alla base dell'azione antitumorale del limonene sono stati solo parzialmente chiariti. È stata dimostrata la capacità di questo composto di indurre gli enzimi epatici di fase I e II (tra cui il citocromo p450) che legano e catalizzano il metabolismo di molti carcinogeni, trasformandoli in composti meno tossici e più velocemente eliminati dall'organismo. In aggiunta, il limonene incrementa anche l'attività della UGT (UDP-glucuronosiltransferasi) nei ratti (*Van der Logt et al., 2004*).

Un altro ruolo importante nell'attività antitumorale del limonene potrebbe essere svolto dalla sua capacità di interferire con l'isoprenilazione delle proteine (*Crowell et al., 1994; Kawata et al., 1994*), un processo di modificazione post-trascrizionale consistente nell'aggiunta di un residuo di cisteina all'estremità carbossiterminale di alcune proteine delle cellule eucariotiche (*Schafer & Rine, 1992*). Molte proteine prenilate regolano la crescita cellulare e/o la trasformazione neoplastica (come Ras e p21) e l'alterazione della prenilazione di una o più di queste proteine potrebbe contribuire all'attività antitumorale del limonene (*Crowell et al., 1991; 1994*).

È stata inoltre evidenziata l'azione pro-apoptotica del limonene in modelli di xenotrapianto di cellule di tumore gastrico nel topo e, *in vitro*, nella linea tumorale BGC-823, con un'efficacia potenziata dal 5-fluorouracile (Lu et al., 2003; 2004).

Il limonene è risultato efficace nell'attenuare il tumore gastrico nel ratto attraverso un incremento dell'apoptosi, la riduzione della sintesi di DNA e la riduzione dell'attività della ornitina decarbossilasi (Uedo et al., 1999; Yano et al., 1999).

In aggiunta, il limonene inibisce la carcinogenesi epatica mediante inibizione della proliferazione cellulare, incremento dell'apoptosi e blocco dell'espressione di oncogeni (Giri et al., 1999; Kaji et al., 2001).

Al limonene è stata anche attribuita la capacità di modulare la risposta immunitaria. Uno studio condotto nel 2005 ha documentato un incremento della sopravvivenza di topi affetti da linfoma nutriti con una dieta ricca di limonene. I macrofagi ottenuti dal fluido peritoneale di questi topi hanno mostrato anche un aumento della fagocitosi, dell'attività microbica e della produzione di ossido nitrico (Del Toro-Arreola et al., 2005).

Dopo i numerosi studi clinici condotti sugli animali, nel 1998 è stato pubblicato uno studio farmacocinetico e di fase I riguardante il trattamento con d-limonene di 32 pazienti affetti da vari tipi di cancro in stadio avanzato. I risultati ottenuti documentarono in molti casi una risposta benefica del paziente, con stabilizzazione e arresto della progressione della malattia, mantenuta anche per diversi mesi (Vigushin et al., 1998).

2.2 Il linalil acetato

Il linalil acetato (3,7-dimetilotta-1,6-dien-3-il etanoato) chimicamente costituisce l'estere acetico del linalolo. Noto anche come *bergamol*, per il suo profumo intenso di agrume, è usato come additivo in diversi prodotti cosmetici, shampoo e saponi.

Nel 2004 un lavoro *in vitro* ha documentato l'effetto citotossico del linalil acetato e dell'olio di lavanda (*Lavandula angustifolia*) (0,25% v/v) (di cui il linalil acetato costituisce circa il 51%) su cellule endoteliali HNDF e fibroblasti umani 153BR (Prashar et al., 2004).

Da studi recenti è emerso anche che il linalil acetato, in associazione con altri costituenti di oli essenziali, quali terpineolo e canfora, esercita un'azione antiproliferativa nelle linee cellulari di cancro al colon HCT-116, mentre non sono stati osservati effetti tossici sulle cellule intestinali non tumorali FHs74Int (Itani, 2008). Nel lavoro è riportato che l'esposizione delle colture HCT-116 ai tre composti (10^{-3} M ciascuno) determina attivazione della poli-(ADPribosio)-polimerasi (PARP) sia nella linea HCT-116 [p53(+/+)] che in quella HCT-116 [p53(-/-)]. In particolare, è stato osservato che la morte cellulare per apoptosi segue la via mitocondriale nelle cellule HCT-116 ($p53^{+/+}$), con un meccanismo caspasi-dipendente, mentre la morte cellulare nelle colture HCT-116 ($p53^{-/-}$), nonostante la presenza degli eventi caratteristici dell'apoptosi, quali il rilascio del citocromo-c e il clivaggio di PARP, è caspasi-indipendente (Itani et al., 2008).

Altre evidenze sperimentali *in vitro* hanno documentato che il linalil acetato ha un effetto miorilassante, come dimostrato su cellule muscolari lisce di arteria carotide di coniglio precontratte da fenilefrina. In particolare, è stato suggerito che tal effetto possa essere mediato dal nitrossido, in parte dovuto all'azione del terpene sulla fosfatasi della catena leggera della miosina (Koto et al., 2006).

2.3 Il linalolo

Il linalolo (3,7-dimetilotta-1,6-dien-3-olo), insieme con altri terpeni, rientra nella composizione di prodotti cosmetici e dermatologici sia come principio attivo che come promotore dell'assorbimento transdermico di farmaci a bassa permeabilità (“*penetration enhancer*”) (Vaddi et al., 2002), azione quest'ultima che condivide con il limonene.

Il linalolo è presente in molti oli essenziali usati in aromaterapia e si ritiene responsabile degli effetti sedativi dell'olio essenziale di lavanda inalato (Buchbauer et al., 1991).

Nel topo, in seguito a somministrazione intraperitoneale, il linalolo esplica effetti sedativi, ipnotici ed anti-convulsivanti in modelli sperimentali di epilessia indotta da pentilentetrazolo, picrotossina, acido N-metil-D-aspartico (NMDA) ed acido chinolinico (Elisabetsky et al., 1999). Inoltre, studi *in vitro* su membrane ottenute da cortecce cerebrali di

ratto o su sinaptosomi ottenuti da corteccia cerebrale di topo, hanno documentato la capacità del linalolo di interferire con la neurotrasmissione glutammatergica (Brum *et al.*, 2001).

Il linalolo, inoltre, è dotato di documentate proprietà anti-infiammatorie e antinocicettive. Ghelardini e collaboratori hanno dimostrato per primi l'attività anestetica locale del linalolo, valutata *in vivo* mediante il test del riflesso della congiuntiva di coniglio e *in vitro* mediante una preparazione di giunzione neuromuscolare tra nervo frenico ed emidiaframma di ratto (Ghelardini *et al.*, 1999).

In seguito ad iniezione intraperitoneale nel topo, il linalolo produce effetti antinocicettivi e anti-iperalgescici, come dimostrato in differenti modelli animali (Peana *et al.*, 2002, 2003, 2004). La somministrazione intraplantare nei topi di linalolo (2,5-10 µg) o di linalil acetato (10-20 µg) inibisce in maniera significativa la risposta comportamentale al dolore nel test della capsaicina (Sakurada *et al.*, 2009).

È stata documentata l'azione antinocicettiva del linalolo oltre che nel dolore infiammatorio, anche in quello neuropatico. Recentemente, Berliocchi e collaboratori hanno osservato che il linalolo attenua l'allodinia meccanica indotta dalla ligatura del nervo spinale nel topo. In particolare, una singola dose di linalolo (100 mg/Kg, sottocutanea, s.c.) risulta inefficace, mentre somministrato quotidianamente per 7 giorni produce una riduzione dell'allodinia meccanica, statisticamente significativa rispetto agli animali SHAM e a quelli trattati con il solo veicolo (Berliocchi *et al.*, 2009).

Negli ultimi anni sono stati indagati anche gli effetti antiproliferativi del linalolo. Cherng e collaboratori hanno dimostrato che il linalolo possiede un'attività antiproliferativa in diverse linee cellulari di carcinoma umano di cervice, pelle, polmone e ossa (Cherng *et al.*, 2007). È stato dimostrato che il linalolo, da solo, è capace di inibire la proliferazione di cellule di adenocarcinoma mammario MCF-7 (fenotipo *wild type*) e del fenotipo MDR (*multi drug resistance*) (MCF-7 AdrR) mentre, impiegato a concentrazioni sub-tossiche, potenzia la citotossicità indotta dalla doxorubicina in entrambe le linee cellulari. Il sinergismo, evidente nella linea MCF-7 AdrR, sembra essere dovuto alla capacità del

linalolo di aumentare le concentrazioni intracellulari di doxorubicina e di ridurre i livelli della proteina anti-apoptotica Bcl-xL (Ravizza *et al.*, 2008).

2.4 Il bergaptene

Il bergaptene (5-metossipsoralene; 5-MOP) è una sostanza appartenente alla famiglia degli psoraleni (furocumarine lineari) e rappresenta il costituente quantitativamente più rilevante nella frazione non volatile dell'olio essenziale di bergamotto (fig.4).

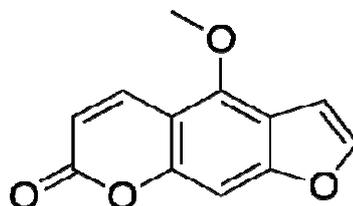


Fig. 4 Struttura chimica del bergaptene.

È un composto fototossico per la cute in seguito ad applicazione topica ed esposizione alle radiazioni UVA (320-400 nm) (Zaynoun *et al.*, 1977).

Gli psoraleni in passato erano molto utilizzati nella preparazione delle creme abbronzanti poiché sono sostanze capaci di stimolare la melanogenesi, come dimostrato in colture di melanoma murino S91 e melanociti umani (Mengeaud & Ortonne, 1994, 1996), e di determinare l'ispessimento dello strato corneo dell'epidermide (Treffel *et al.*, 1991).

Per le loro proprietà biologiche, gli psoraleni contenuti nel BEO trovano applicazione nella fotochemioterapia, un trattamento in cui la risposta terapeutica è indotta dall'applicazione di un farmaco sensibilizzante, in presenza di una radiazione di lunghezza d'onda adeguata.

L'utilizzo delle piante contenenti psoraleni per la cura delle malattie cutanee ha origini remote (1500 a.c.) e negli anni '70 Parrish e collaboratori introdussero l'impiego di 8-MOP (P) e UVA per il trattamento della psoriasi, coniato il termine "PUVA-terapia" (Parrish *et*

al., 1974; *Pathak et al.*, 1992). Successivamente, questa tecnica trovò applicazione anche nel trattamento della vitiligine (*Souetre et al.*, 1988).

Oltre ai ben accertati effetti fotosensibilizzanti, gli sporaleni mostrano, *in vitro*, proprietà antiproliferative. In esperimenti condotti su colture di cellule T24 (cellule derivanti da carcinoma della vescica), l'esposizione ad una miscela costituita da 8-MOP, 5-MOP e 4'-amminometil 4,5',8'-trimetilpsoralene (AMT) determina una significativa riduzione della proliferazione cellulare (*Keane et al.*, 1994). Dati aggiuntivi derivano da esperimenti condotti su cellule di carcinoma epatico umano, J5, in cui è stata osservata una significativa compromissione della proliferazione cellulare in seguito a trattamento con lo psoralene 5-MOP (*Lee et al.*, 2003). In particolare, il 5-MOP determina morte cellulare dovuta a citotossicità diretta e a induzione di apoptosi mediante blocco delle cellule nella fase G₂/M del ciclo cellulare (che coinvolgerebbe l'inibizione dell'espressione della ciclina B1) (*Lee et al.*, 2003).

È stato dimostrato che il bergaptene è in grado di influenzare i bioritmi ormonali determinando un progressivo aumento dei livelli sierici di melatonina nell'uomo (*Souetre et al.*, 1987). Esso agirebbe inibendo il processo di degradazione dell'ormone, prolungandone di conseguenza l'emivita (*Mauviard et al.*, 1995).

SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi

In un precedente lavoro del nostro gruppo sono stati caratterizzati gli effetti citotossici *in vitro* dell'olio essenziale di bergamotto (BEO) (Berliocchi *et al.*, 2011).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che, in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y, il BEO induce in maniera concentrazione-dipendente: disfunzione mitocondriale, riorganizzazione del citoscheletro, riduzione del volume cellulare, frammentazione del DNA e morte cellulare caspasi-dipendente e caspasi-indipendente. Le alterazioni cellulari determinate dal BEO (0,02% e 0,03% v/v) sono visibili già dopo un'ora di esposizione al fitocomplesso e concentrazioni inferiori allo 0,02% risultano inattive (Berliocchi *et al.*, 2011).

Le caratteristiche miste, necrotiche e apoptotiche, della morte cellulare che è stata osservata, indicano che il BEO può essere letale per le cellule mediante l'attivazione di multipli *pathway* di morte.

La morte cellulare è stata classificata in tre sottogruppi sulla base di criteri morfologici, identificando così una morte cellulare di tipo 1 (apoptotica), 2 (autofagica) e 3 (necrotica) (Diaz *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2012). Nei mammiferi la morte cellulare è spesso preceduta o accompagnata dalla vacuolizzazione autofagica, scoperta che inizialmente ha portato ad ipotizzare l'esistenza di una forma di morte cellulare autofagia-dipendente. Tuttavia, alla luce delle evidenze sperimentali raccolte negli ultimi anni, l'espressione "morte autofagica" (ritenuta ormai inadeguata), in realtà descrive una condizione in cui le cellule muoiono *con* l'autofagia piuttosto che *per* l'autofagia (Kroemer & Levine, 2008; Shen & Codogno, 2011).

Lo scopo del presente studio, condotto *in vitro*, è stato quello di valutare il coinvolgimento della *pathway* autofagica negli effetti biologici osservati in seguito all'esposizione al BEO. In particolare, è stata investigata l'espressione dei principali *marker* dell'autofagia in colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, nelle quali erano stati precedentemente condotti sia gli studi di citoprotezione (Corasaniti *et al.*, 2007) che di citotossicità (Berliocchi *et al.*, 2011) con l'olio essenziale.

Lo studio è stato esteso a colture di cellule ganglionari retiniche di ratto, RGC-5, di cui era già stata documentata la capacità autofagica in condizioni di deprivazione di siero (*Russo et al., 2011*), al fine di documentare se gli effetti osservati fossero dipendenti o indipendenti dalla linea cellulare utilizzata. Inoltre, esperimenti paralleli sono stati condotti anche su colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk, dotati di un fenotipo normale, per valutare l'azione del BEO sulla *pathway* autofagica di cellule non tumorali.

Tramite esperimenti di silenziamento genico e l'utilizzo di induttori/inibitori farmacologici dell'autofagia, sono stati studiati i meccanismi molecolari alla base dei fenomeni osservati. Infine, sono stati valutati gli effetti sulla via autofagica dei principali costituenti del BEO, al fine di identificare il/i principio/i attivo/i responsabile/i delle modulazioni osservate.

MATERIALI E METODI

1. Reagenti

L'olio essenziale di bergamotto (BEO) è stato fornito da CAPUA s.r.l. (Reggio Calabria, Italy; www.webcapua.com). Il BEO conteneva il 39,76% di limonene, 29,59% di linalil acetato, 8,09% di γ -terpinene, 7,32% di β -pinene, 6,71% di linalolo, 1,28% di α -pinene, 1,23% di sabinene, 1,00% di mircene, 0,45% di β -bisabolene e 0,35% di terpinolene, 0,34% di neril acetato, 0,33% di α -tuienene, 0,32% di geranil acetato, 0,31% di β -cariofillene, 0,31% di *trans*- α -bergamoptene, 0,25% di geraniale, 0,17% di fellandrene, 0,16% di nerale, 0,13% di *p*-cimene, 0,12% di decanale, 0,03% di camfene, 0,02% di *o*-cimene, come determinato mediante analisi gas cromatografica (GC-FID) e 2,331 g/Kg di bergaptene, valutato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC/UV).

Il d-limonene, il linalil acetato, l'induttore dell'autofagia Rapamicina, gli inibitori dell'autofagia Bafilomicina A1 e Cloroquina e l'inibitore del proteosoma MG132 sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

2. Colture cellulari e trattamenti

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state ottenute dall'ICLC-IST (Genova, Italia). Questa linea è un sub-clone delle cellule umane SK-N-SH, ottenute da un aspirato di midollo osseo di una bambina di 4 anni affetta da neuroblastoma metastatico (*Biedler et al., 1973*). Queste cellule di origine neuroectodermale, con caratteristiche fenotipiche molto simili a quelle delle cellule neuronali, sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in presenza di siero bovino fetale (10% vol/vol) inattivato al calore, L-glutammina (2 mM) e sodio piruvato (1 mM).

I fibroblasti di cute umana Hs 605.Sk sono stati ottenuti dall'*American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA). Questa linea cellulare presenta un fenotipo normale (non tumorale) ed è stata preparata dal tessuto cutaneo, apparentemente normale, di una donna affetta da carcinoma mammario. Le condizioni di coltura di tale linea cellulare, la cui

propagazione avviene in adesione, prevedono l'utilizzo di DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con aggiunta di siero fetale bovino (10% vol/vol).

La linea cellulare di ratto RGC-5, ottenuta trasformando cellule di retina di ratto postnatali di 1 giorno con il virus 2ψ E1A (Krishnamoorthy et al., 2001), è stata ottenuta dall'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA). Le cellule sono state coltivate in un terreno DMEM *high-glucose* con L-glutammina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Le linee cellulari utilizzate sono state cresciute a 37°C in atmosfera umidificata, al 5% di CO₂.

Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state piastrate circa 24h prima del trattamento, in piastre a sei pozzetti o su vetrini, a seconda delle esigenze sperimentali; successivamente, il mezzo di crescita è stato sostituito con mezzo fresco semplice (colture controllo) o mezzo contenente i composti testati o i corrispondenti veicoli, per il periodo di tempo indicato.

Il BEO è stato diluito 1:1 con una soluzione idroalcolica di etanolo al 90% e successivamente, per diluizione in terreno di coltura, sono state ottenute le concentrazioni (vol/vol) impiegate negli esperimenti (0,005%; 0,01%; 0,02%; 0,03%). Al fine di valutare gli effetti dell'etanolo sui parametri cellulari studiati, in ogni esperimento colture cellulari sono state parallelamente trattate con *medium* contenente etanolo ad una concentrazione pari a quella dell'etanolo presente nelle varie diluizioni di BEO (0,0045-0,027%) (colture veicolo-trattate).

Soluzioni *stock* (10%) di limonene in dimetil solfossido (DMSO) e di linalil acetato, in etanolo al 90%, sono state successivamente diluite nel mezzo di coltura per ottenere le concentrazioni finali di 500-750 µM per il limonene e 250-375 µM per il linalil acetato. DMSO o etanolo sono stati aggiunti al mezzo di colture controllo parallele, in modo da ottenere concentrazioni uguali a quelle presenti nelle colture trattate con il principio attivo, oscillanti tra 0,071 e 0,108 % di DMSO per il limonene e da 0,044 a 0,066 % di etanolo per il linalil acetato (colture veicolo-trattate).

Le soluzioni *stock* di Bafilomicina A1 (100 μ M) e Rapamicina (2,74 mM) in DMSO, e di Cloroquina (10 mM) in acqua, sono state diluite nel mezzo di coltura ed applicate alle SH-SY5Y per il tempo indicato, prima dell'esposizione al BEO o ai suoi costituenti. Colture controllo sono state trattate con le corrispondenti concentrazioni di veicolo.

Per gli esperimenti condotti con l'inibitore del proteosoma, MG132: la soluzione *stock* di MG132 (10 mM), in DMSO, è stata diluita nel mezzo di coltura ed applicata alle SH-SY5Y per 2h (concentrazione finale 10 μ M). Successivamente, un opportuno volume della soluzione *stock* di Bafilomicina è stato aggiunto direttamente nel pozzetto di coltura, ottenendo la concentrazione finale desiderata (100 nM). Dopo altre 2h di incubazione, anche il BEO è stato diluito direttamente nel pozzetto (senza rimuovere il *medium* contenente gli inibitori), utilizzando una soluzione di BEO concentrata 2X. Dopo il co-trattamento di 1h con BEO + Bafilomicina A1 + MG132, le cellule sono state raccolte e processate come indicato. Colture controllo sono state esposte alle corrispondenti concentrazioni di veicolo utilizzate.

Quando indicato, le cellule sono state sottoposte a deprivazione in terreno senza siero per le 24h precedenti il trattamento; in questi set sperimentali, anche le soluzioni di trattamento sono state preparate in terreno senza siero, per preservare le condizioni di deprivazione.

3. Analisi citofluorimetrica

La citometria a flusso o citofluorimetria è una tecnica d'analisi che permette di contare, esaminare e in alcuni casi "sortare" (quando presente l'apposito dispositivo) particelle in sospensione, come le cellule.

Essa consente l'analisi multiparametrica di una vasta popolazione cellulare e l'aspetto innovativo di questa tecnica è che ogni cellula della sospensione viene analizzata individualmente. La citofluorimetria si basa sulla capacità della cellula di riflettere/rifrangere (*scattering*) la luce in base alla sua forma/dimensione ed alla sua complessità interna (o granularità), o in base alla presenza di molecole marcate con un fluoroforo in grado di emettere fluorescenza se eccitate da una appropriata lunghezza

d'onda. La possibilità di rilevare contemporaneamente le informazioni provenienti dallo *scattering* e dall'emissione di fluorescenza (anche di più fluorofori) permette l'acquisizione simultanea di diverse informazioni per ogni cellula che attraversa il fascio di eccitazione.

Una delle peculiarità della citofluorimetria risiede nell'elevata velocità di acquisizione dei dati, essa, infatti, consente l'analisi di un numero di cellule dell'ordine delle decine di migliaia al secondo.

All'interno del citofluorimetro le cellule sono forzate a scorrere in un flusso laminare garantito da un sistema idrodinamico (*FACS flow*), che fa sì che esse passino allineate davanti al raggio laser (principio della focalizzazione idrodinamica).

Lo strumento utilizzato per gli esperimenti condotti nel nostro laboratorio è un FacsCalibur a tre colori (Becton-Dickinson, CA, USA) (fig. 1).

Le cellule passano singolarmente nella camera di flusso dove vengono colpite da un raggio laser ad argon alla lunghezza d'onda di 488 nm. Una parte della radiazione che colpisce ciascuna cellula viene raccolta da uno specchio diodo posto nella stessa direzione del raggio laser, chiamato FSC (acronimo di *Forward Side Scatter*), perché il rilevatore giace in linea retta dalla parte opposta (180°) rispetto al punto di emissione del raggio laser. FSC misura lo *scattering* della luce da parte della cellula in relazione al diametro cellulare e, quindi, alle sue dimensioni. Le altre radiazioni emesse da ogni singola cellula vengono raccolte da un sistema collettore di lenti ed inviate a una serie di specchi diecrici in grado di far passare solo radiazioni di determinate lunghezze d'onda (riflettendo tutte le altre). Ciascuna radiazione emessa viene raccolta dal fotomoltiplicatore corrispondente e convertita in segnale analogico. Perpendicolarmente rispetto a FSC si trova il fotomoltiplicatore per il segnale SSC (acronimo di *Side Scatter*, perché posizionato lateralmente rispetto alla sorgente laser, a 90°), che fornisce informazioni circa la complessità interna di ogni cellula (granulosità) e il rapporto nucleo/citoplasma.

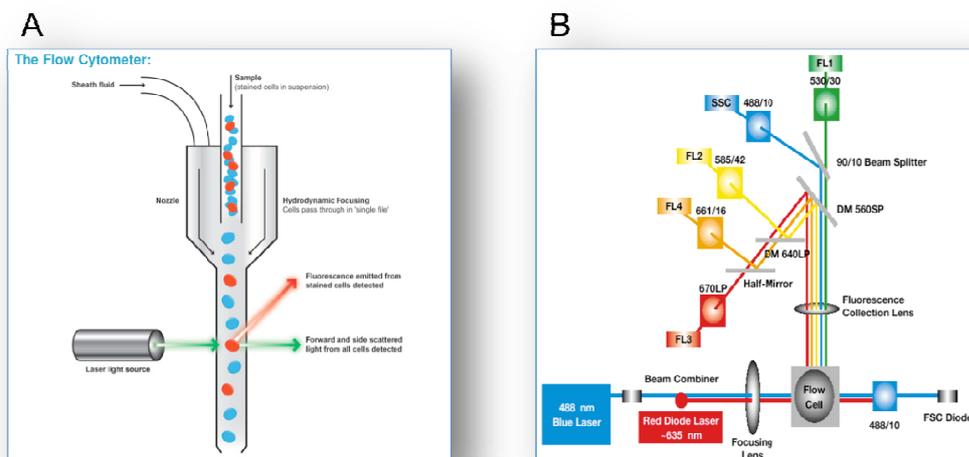


Fig. 1 Rappresentazione schematica della camera di flusso di un citofluorimetro (A) e del sistema ottico del FACS Calibur (B). Immagini adattate da www.bdbiosciences.com e www.abcam.com/tecnica.

Le sigle FL-1, FL-2, FL-3 indicano i fotomoltiplicatori o *detectors* che trasformano i segnali ottici che derivano dalle radiazioni emesse dai fluorocromi utilizzati. In particolare, FL-1 rileva radiazioni emesse che ricadono nella regione del verde dello spettro visibile (λ 500-550 nm), FL-2 rileva radiazioni comprese nella regione dell'arancione (λ 600 nm) ed FL-3 rileva radiazioni emesse nella regione del rosso (λ 600-650 nm).

Uno dei saggi condotti mediante citofluorimetria è il test biparametrico FDA/PI, utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare (Morris *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1989), che viene eseguito su un campione di sospensione di cellule non fissate (vitali) e si basa sull'abilità delle cellule vitali di escludere lo ioduro di propidio (PI), un colorante nucleare non permeabile, e di de-esterificare la fluoresceina diacetato (FDA). Quest'ultima può entrare liberamente nel compartimento citoplasmatico dove viene idrolizzata ad opera delle esterasi intracellulari, in maniera proporzionale all'attività metabolica cellulare. La reazione di de-esterificazione produce fluoresceina che emette un'intensa fluorescenza verde e che viene trattenuta all'interno delle cellule in funzione dell'integrità di membrana (Rotman & Papermaster, 1966).

Le cellule necrotiche sono incapaci di escludere il PI a causa della compromessa integrità di membrana e non possono attivare la sonda FDA essendo metabolicamente inattive. Le cellule apoptotiche, invece, conservano l'integrità di membrana fino agli stadi più avanzati della morte cellulare e, pertanto, escludono il PI (Dive et al., 1992; Darzynkiewicz et al., 1992; Morris et al., 1994; Darzynkiewicz et al., 1997) e trattengono la fluoresceina; tuttavia, la capacità di metabolizzare l'FDA è notevolmente ridotta e, quindi, esse risultano meno fluorescenti delle cellule vitali (Ormerod et al., 1993; Frey, 1997).

Grazie alle proprietà sopra descritte, l'analisi citofluorimetrica permette di distinguere le cellule vitali, caratterizzate da un'intensa emissione di fluorescenza nel canale del verde (FL1-H) e una bassa emissione nel canale del rosso (FL2-H), dalle cellule necrotiche, caratterizzate un'intensa emissione di fluorescenza nel canale del rosso (FL2-H) e una debole emissione nel canale del verde (FL1-H), dalle cellule apoptotiche che manifestano una blanda emissione di fluorescenza sia nel canale del rosso (FL2-H) che del verde (FL1). Inoltre, negli stadi più avanzati dell'apoptosi, l'integrità di membrana è comunque compromessa, pertanto, le cellule in tarda apoptosi possono essere distinte dalle cellule apoptotiche e da quelle vitali in base al grado di permeabilità al PI e dalle cellule necrotiche in base alla residua capacità di metabolizzare la sonda (Ross et al., 1989; Morris et al., 1994).

Per l'esecuzione del saggio FDA/PI, dopo gli opportuni trattamenti, le cellule sono state raccolte in tubi di polipropilene, adatti all'analisi citofluorimetrica, alla densità di 4×10^5 cellule/ml, centrifugate a 800 g (per allontanare il mezzo di coltura) e risospese in una soluzione di colorazione contenente 2 µg/ml di PI e 0,1 µM di FDA in PBS. Le sospensioni cellulari ottenute sono state analizzate al citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA) per determinare la proporzione di cellule vitali (FDA⁺/PI⁻), apoptotiche (FDA⁻/PI⁻) e necrotiche (FDA⁻/PI⁺), attraverso l'analisi dei quadranti dei *dot-plot* FL1-H/FL2-H (Bartkowiak et al., 1999). I coloranti sono stati eccitati ad una lunghezza d'onda di 488 nm con un laser a ioni di Argon. L'emissione di fluorescenza è stata rilevata da fotomoltiplicatori con filtri per le lunghezze d'onda di 582/42 (PI) e 530/30 (FDA) nm. Per evitare la sovrapposizione degli spettri di emissione è stata eseguita la compensazione dei due canali sottraendo da ciascuno la percentuale di fluorescenza aspecifica (FL2 - %FL1; FL1 - %FL2). Sono stati acquisiti 10.000 eventi per ogni campione analizzato.

4. Immunocitochimica

Per l'immunocitochimica di LC3, le cellule SH-SY5Y e RGC-5 sono state seminate in piastre da 12 pozzetti contenenti sul fondo un vetrino sterile. Dopo 24 h dalla semina, il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente il BEO o il veicolo corrispondente. Dopo il tempo di esposizione indicato, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate con Triton X-100 0,3% in PBS per 5 minuti e bloccate 30 minuti con 10% di siero d'asino (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in PBS (per bloccare i siti aspecifici di legame). La proteina LC3 è stata rilevata mediante incubazione per una notte a +4°C con un anticorpo di coniglio anti-LC3 (1:500; MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) seguita, dopo gli opportuni lavaggi, dall'incubazione per 1h con l'anticorpo secondario anti-coniglio prodotto nell'asino AlexaFluor 488 (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Per la visualizzazione di LAMP-I è stato utilizzato lo stesso protocollo sperimentale e le cellule sono state incubate con un anticorpo primario di topo anti-LAMP-I (1:200; Hibrydoma Bank, Iowa City, IA, USA) e, successivamente, con un anticorpo secondario anti-topo prodotto nell'asino AlexaFluor 594 (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tutte le soluzioni con gli anticorpi sono state preparate in PBS contenente il 5% di siero d'asino.

Dopo lo *staining*, i vetrini sono stati montati su un vetrino portaoggetto con una soluzione Vectashield contenente DAPI, per la colorazione dei nuclei (Vector Laboratories, CA, USA). In ogni esperimento è stato preparato un controllo negativo (incubazione con il solo anticorpo secondario fluorescente), per verificare l'assenza di legame dell'anticorpo secondario a siti aspecifici. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale (Leica) utilizzando un obiettivo 63x ad olio.

5. Preparazione dei lisati cellulari e analisi *Western blot*

Per la preparazione dei lisati cellulari è stato usato un tampone di lisi freddo, RIPA [tris-HCl (pH8) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1% IGEPAL, acido okadaico 1

nM , sodio deossicolato 0,5%] contenente un *cocktail* di inibitore delle proteasi (codice P8340, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) ed un *cocktail* di inibitore delle fosfatasi (codice 564225, Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Dopo 10 minuti di incubazione in ghiaccio, i lisati cellulari sono stati centrifugati a 15.000 g per 15 minuti a 4°C.

Il contenuto proteico nei surnatanti è stato determinato utilizzando il metodo DC (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia), che si basa sulla reazione delle proteine con una soluzione alcalina di tartrato di rame (reagente A) e con il reagente di Folin (reagente B), impiegando soluzioni a concentrazione nota di albumina serica bovina (BSA) per la preparazione della curva *standard*. La lettura è stata effettuata a 690 nm impiegando uno spettrofotometro per micropiastre (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia).

Per l'analisi *Western blot* quantità uguali delle proteine sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e successivamente elettrotrasferite su membrane di PVDF (Immobilion-P, Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

I siti aspecifici presenti nella membrana sono stati bloccati utilizzando latte al 5% disciolto in un tampone salino contenente Tris 10 mM (pH=8.0), NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% (TBS-T) per 1h a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari sono stati incubati per una notte a +4°C, seguiti da anticorpi secondari anti-topo o anti-coniglio coniugati a perossidasi di rafano (HRP), per 1 h a temperatura ambiente. Le bande proteiche sono state visualizzate mediante tecnica di chemiluminescenza con “*ECL Western blot Detection kit*” (ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Milano, Italia). Il principio su cui si basa tale tecnica è che, in presenza di acqua ossigenata, la perossidasi coniugata agli anticorpi secondari ossida il luminolo, un substrato chemiluminescente, con contemporanea produzione di luce. Il segnale luminoso emesso è stato rilevato esponendo la membrana ad una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Milano, Italia). Il tempo di esposizione per ottenere la densità ottimale delle immagini è variato da 5 secondi a 30 minuti. Le lastre impressionate sono state scansionate, digitalizzate a 300 dpi, e la quantificazione densitometrica delle bande è stata condotta utilizzando il programma *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, USA).

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari e diluizioni: anti-Beclin 1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 1:1000; anti-p62/SQSTM1 (MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) 1:1000; anti-LC3 (MBL International Corporation, Woburn, MA, USA) 1:2000; anti-caspasi 3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 1:1000; anti PARP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 1:1000; anticorpo di topo monoclonale anti-GAPDH (clone 6C5; Applied Biosystems, Life Technologies, Monza, Italia) 1:20000. Come anticorpi secondari sono state utilizzate IgG di capra specie-specifiche (anti-topo o anti-coniglio) coniugate alla perossidasi di rafano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) .

6. *Knockdown* dell'espressione di Beclin 1 mediante siRNA

Il silenziamento genico transiente, effettuato mediante l'uso di uno *small interfering RNA* (siRNA) è una tecnica sperimentale che permette di ridurre l'espressione di un gene mediante degradazione del suo mRNA. Questa tecnica viene molto utilizzata nel campo dell'ingegneria genetica poiché consente di identificare il ruolo di un determinato gene attraverso il suo *spegnimento*, permettendo di svolgere studi di *loss of function* (*knock-down*) senza eliminare fisicamente il gene (*knock-out*) (Shan, 2010).

Gli *short interfering RNA* (siRNA) sono una classe di piccole molecole di RNA a doppio filamento, lunghe in genere 20-25 nucleotidi, coinvolte nella *pathway* dell'RNA interference (RNAi), un meccanismo epigenetico mediante il quale essi interferiscono (e spengono) l'espressione di specifici geni con sequenza nucleotidica complementare. I siRNA e il loro ruolo nel *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) furono scoperti per la prima volta nelle piante dal gruppo di David Baulcombe (Hamilton & Baulcombe, 1999). Successivamente, Tuschl e colleghi dimostrarono che alcuni siRNA sintetici erano capaci di indurre il fenomeno dell'RNAi anche nei mammiferi (Elbashir et al., 2001).

Sebbene non siano ancora chiari tutti i dettagli del processo di RNAi (Macrae et al., 2006), sembra che la cellula, una volta individuata una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA), sia in grado di avviare il meccanismo dell'*RNA interference*, che evolve in più

fasi: inizialmente, un enzima (*Dicer*) taglia la sequenza di dsRNA in frammenti di lunghezza minore (circa 19-21 paia di basi). Il breve frammento di dsRNA generato (siRNA) si associa ad un complesso enzimatico denominato RISC (*complesso silenziatore indotto dall'RNA*). L'RNA a doppio filamento viene aperto e solo il filamento di RNA *antisense* rimane associato a RISC, mentre il filamento *sense* viene degradato. La RISC è ora attiva ed è in grado di scansionare molti mRNA presenti nel citosol fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisense associato al complesso stesso. Se avviene l'appaiamento tra il siRNA e l'mRNA, un componente della RISC (*Ago*) è in grado di operare un taglio sull'mRNA. I due frammenti di mRNA risultanti, privo di cappuccio al 5' uno e di coda di poliA al 3' l'altro, vengono così rapidamente degradati dalle RNasi della cellula stessa (fig.2).

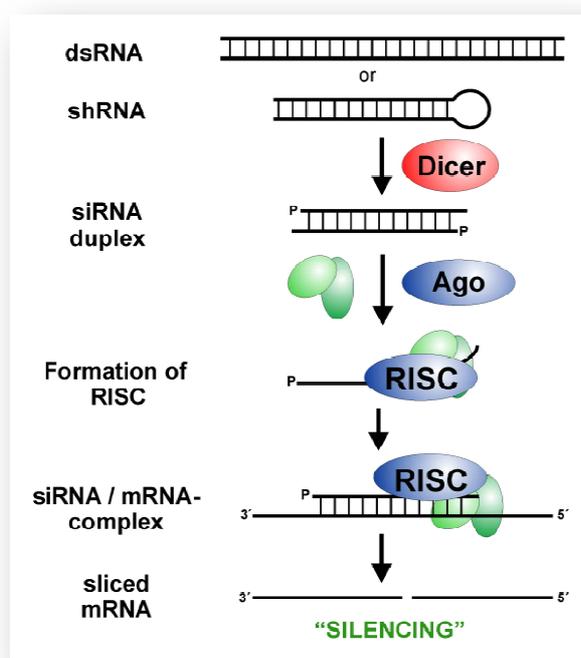


Fig. 2 Rappresentazione schematica del silenziamento genico transiente operato attraverso il metodo dell'RNA interference (<http://www.gene-quantification.de/rnai.html>).

Le SH-SY5Y sono state trasfettate, per le 72h precedenti il trattamento con il BEO, con un siRNA specifico per Beclin 1 (*coiled coil, myosin-like Bcl-2 interacting protein*,

NM053739; ON-TARGET plus SMARTpool L-099237-01) ottenuto dalla Dharmacon RNAi Technologies (Chicago, IL, USA). Il siRNA è stato ricostituito in acqua sterile priva di RNasi ad una concentrazione finale di 100 μ M (soluzione *stock*). Le cellule sono state trasfettate con una concentrazione finale di siRNA pari a 50 μ M usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in base alle istruzioni fornite dal produttore.

La lipofectamina è un comune reagente di trasfezione usato nel campo della biologia molecolare e cellulare. Esso viene utilizzato per introdurre siRNA o plasmidi di DNA *in vitro* nelle colture cellulari mediante “lipofeczione” (trafezione con liposomi) (Felgner *et al.*, 1987). Il reagente lipofectamina contiene subunità lipidiche che in ambiente acquoso possono formare liposomi i quali possono intrappolare il materiale di trasfezione, fondere con la membrana plasmatica delle cellule vitali ed essere inglobati, permettendo agli acidi nucleici di entrare nel citoplasma ed essere disponibili per la replicazione cellulare, l’espressione o il processo di RNAi.

Per la trafezione delle SH-SY5Y il protocollo utilizzato è stato il seguente: il siRNA, e separatamente la lipofectamina, sono stati opportunamente diluiti in terreno senza siero e incubati 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, alla soluzione contenente la lipofectamina è stata aggiunta quella contenente il siRNA e la miscela così ottenuta è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti, in modo da favorire l’inglobamento dell’agente di trasfezione nei liposomi di lipofectamina. Prima di aggiungere alle cellule il reattivo di trasfezione preparato, i pozzetti contenenti le cellule sono stati lavati con terreno privo di siero (per rimuovere eventuali residui di FBS che potrebbero compromettere/ridurre l’efficienza di trasfezione). La miscela preparata è stata poi addizionata alle cellule da trasfettare, che sono state incubate a 37°C per circa 4 ore. Trascorso questo periodo, il mezzo è stato sostituito con terreno completo di siero e le cellule incubate a 37°C per 72h prima del trattamento con il BEO.

7. Analisi statistica dei dati

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard del numero di esperimenti indicato. L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple. Il test “*t*” di Student è stato utilizzato per valutare la differenza tra due medie. Un valore di P minore di 0.05 è stato considerato significativo.

RISULTATI

1. Modulazione dei *marker* dell'autofagia da parte del BEO in diverse linee cellulari

In un precedente lavoro del nostro gruppo sono stati caratterizzati gli effetti citotossici *in vitro* dell'olio essenziale di bergamotto in colture cellulari umane di neuroblastoma, SH-SY5Y. I risultati ottenuti avevano dimostrato che il BEO induce, in maniera concentrazione-dipendente: disfunzione mitocondriale, riorganizzazione del citoscheletro, restringimento cellulare, frammentazione del DNA e morte cellulare caspasi-dipendente e caspasi-indipendente. Le alterazioni cellulari determinate dal BEO (0,02% e 0,03% v/v) sono visibili già dopo 1h di esposizione al fitocomplesso e le concentrazioni inferiori allo 0,02% risultano inattive (Berliocchi *et al.*, 2011).

Al fine di valutare il coinvolgimento della *pathway* autofagica negli effetti biologici prodotti dal BEO, è stata investigata l'espressione dei principali *marker* dell'autofagia in colture SH-SY5Y esposte a concentrazioni crescenti del fitocomplesso. Il *range* di concentrazioni che sono state testate comprende quello trovato dalle concentrazioni di BEO non citotossiche (0,005%) a quelle citotossiche (0,02-0,03%).

LC3, Beclin 1 e p62 sono i *marker* più utilizzati per monitorare il processo autofagico. Beclin 1 fa parte del complesso della PI3K, è essenziale nella fase iniziale di formazione delle vescicole autofagiche e gioca un ruolo importante nel reclutamento di altre proteine Atg alla struttura pre-autofagosomica (Sinha and Levine, 2008). LC3 esiste in due forme: LC3-I è la forma citosolica, che dopo coniugazione alla fosfatidiletanolammina viene reclutata sulla membrana dell'autofagosoma e ad essa resta stabilmente associata. La quantità della forma lipidata di LC3, nota come LC3-II, è strettamente correlata alla velocità di formazione degli autofagosomi e al loro numero, perciò, è possibile monitorare l'autofagia mediante l'analisi dell'espressione di LC3 e della formazione di LC3-II (Mizushima and Yoshimori, 2007). p62 (o sequestosome-1/SQSTM1) è una proteina legante l'ubiquitina e substrato autofagico, che dopo legame diretto a LC3 viene incorporata nell'autofagosoma ed efficientemente degradata dall'autofagia (Korolchuk *et al.*, 2009).

1.1 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II e riduzione dei livelli di p62 in colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.

Nelle colture SH-SY5Y esposte al BEO per 1h è stato rilevato un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, accompagnato dalla riduzione dei livelli di LC3-I. In particolare, LC3-II aumenta in seguito all'esposizione a concentrazioni di BEO comprese fra 0,01 e 0,03%, mentre le concentrazioni inferiori (0,005%) e il solo veicolo (etanolo 0,027%, veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata) non modificano il livello basale della forma lipidata di LC3. L'accumulo di LC3-II è accompagnato dalla concomitante riduzione dei livelli di p62, mentre non si osserva alcuna variazione significativa a carico della proteina Beclin 1 (fig.1).

La modulazione dei *marker* autofagici nelle SH-SY5Y si osserva anche a concentrazioni di BEO che non risultano tossiche per questa linea cellulare (0,01%).

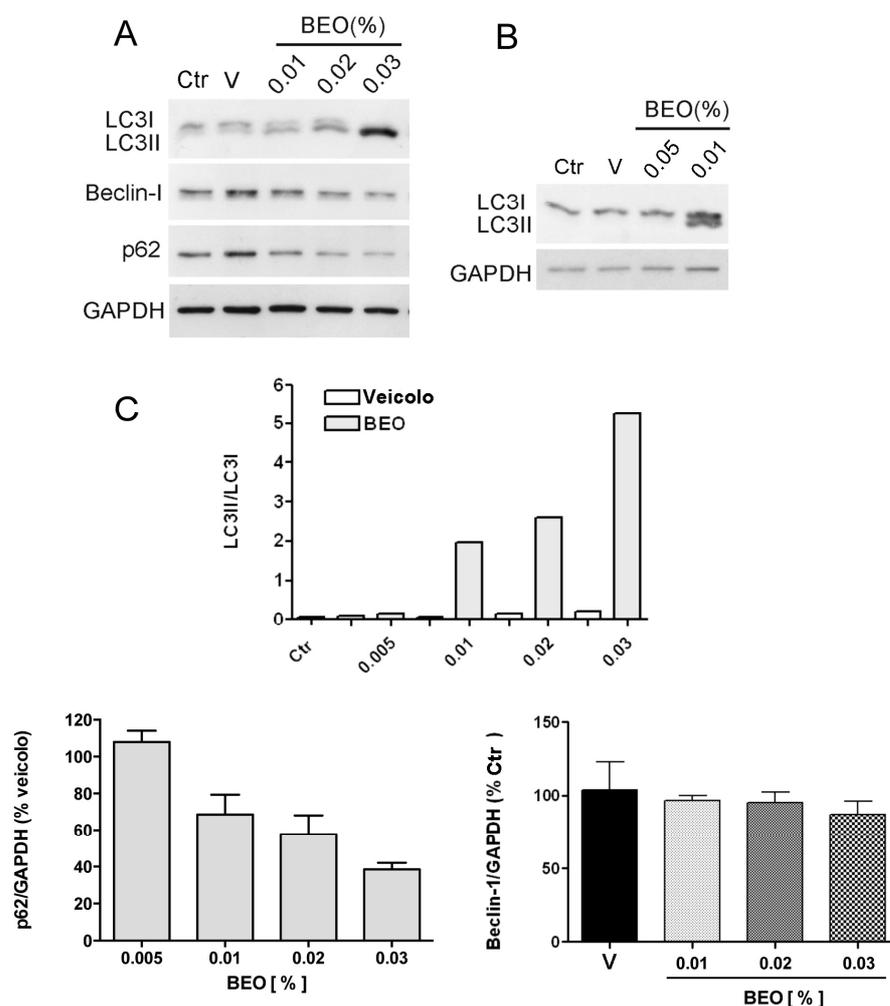


Fig. 1 Accumulo di LC3-II e riduzione di p62 in colture SH-SY5Y esposte al BEO per 1h.

(A) Colture SH-SY5Y sono state incubate con il solo mezzo di coltura (Ctr: controllo) o mezzo contenente il BEO (0.02-0.03%) o il veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (V: etanolo 0.027%). Dopo 1h di incubazione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di Beclin 1 e p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'esposizione delle SH-SY5Y al BEO (0.01-0.03%) determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II. (B) Concentrazioni di BEO inferiori allo 0,01% (0.005%) risultano inattive (V: etanolo 0.009%). (C) Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative a LC3-II (normalizzato verso LC3-I), p62 e Beclin 1 (normalizzati per i valori densitometrici delle bande del controllo interno, GAPDH). I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

1.2 L'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO è precoce e tempo-dipendente.

Al fine di comprendere quanto fosse precoce la modulazione dei *marker* autofagici in risposta al trattamento con il BEO, colture SH-SY5Y sono state esposte all'olio essenziale per 5 e 15 minuti.

L'analisi *Western blot* dei campioni ha permesso di osservare che l'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO è molto precoce e può essere apprezzato già dopo soli 5 minuti di trattamento. A questo tempo, invece, non si osserva ancora riduzione del livello di p62, che può essere però apprezzata dopo 15 minuti di esposizione all'olio essenziale (fig.2).

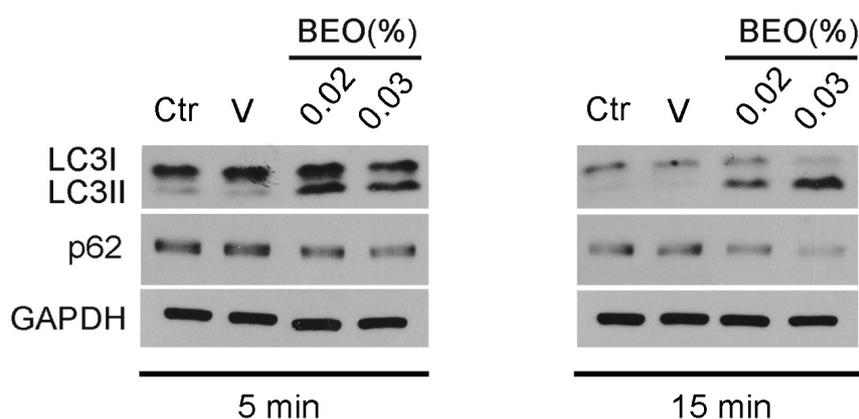


Fig.2 Cinetica della modulazione dei marker dell'autofagia nelle SH-SY5Y esposte al BEO.

Colture SH-SY5Y sono state incubate con il solo mezzo di coltura (Ctr: controllo) o mezzo contenente il BEO (0.02-0.03%) o il veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (V: etanolo 0.027%) per il periodo di tempo indicato. I lisati cellulari ottenuti dal time course sono stati analizzati mediante *Western blot* per valutare i livelli di espressione di p62 e la conversione di LC3-I in LC3-II. GAPDH è stato usato come controllo interno di caricamento. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'accumulo di LC3-II indotto dal BEO nelle colture SH-SY5Y è precoce e si osserva già dopo soli 5 minuti di trattamento, mentre la riduzione di p62 può essere apprezzata dopo 15 minuti di esposizione al fitocomplesso. L'effetto osservato è specifico e non si apprezzano variazioni dei marker dell'autofagia nelle colture esposte al solo veicolo.

1.3 Il trattamento con il BEO determina un cambiamento nella localizzazione citoplasmatica di LC3 nelle SH-SY5Y.

L'immunofluorescenza delle cellule SH-SY5Y esposte all'azione del BEO (0,01%, 1h) ha permesso di rilevare cambiamenti a carico della localizzazione intracellulare di LC3, con la comparsa di aree sferiche ad alta intensità di fluorescenza, assenti nella popolazione controllo (cellule esposte al solo veicolo: etanolo 0,009%) e verosimilmente attribuibili alla presenza di LC3-II sulle membrane autofagiche (fig. 3) e pertanto indice di un' aumentata formazione di autofagosomi.

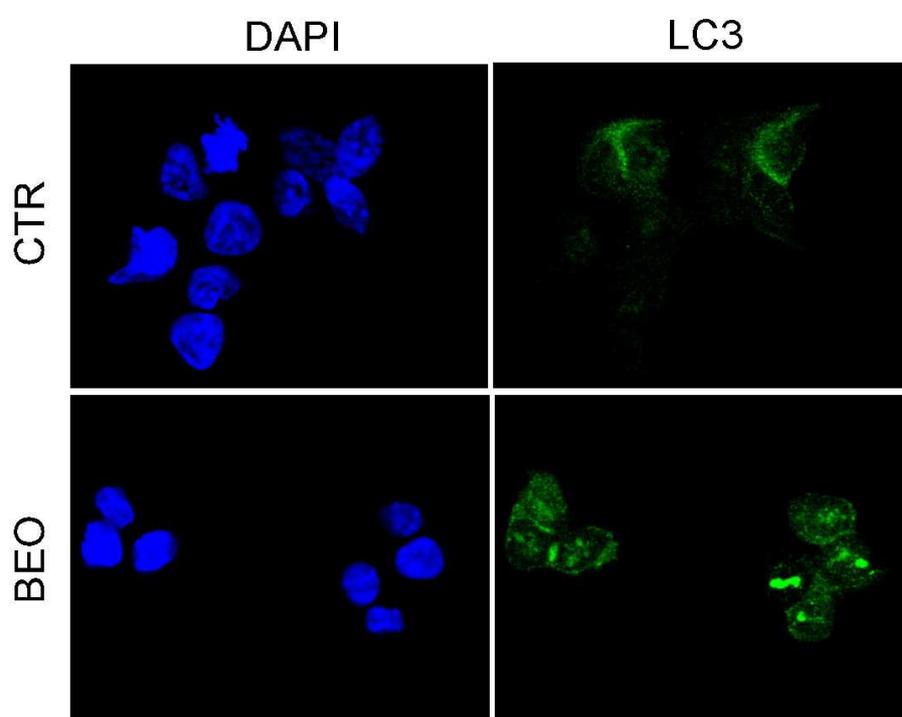


Fig.3 Ridistribuzione intracellulare di LC3 in cellule SH-SY5Y esposte al BEO.

Culture SH-SY5Y sono state trattate per 1h con il BEO (0.01%) o con il corrispondente veicolo (CTR: etanolo 0,009%) e sottoposte ad analisi in microscopia a fluorescenza della proteina LC3 (marcata in verde). Il colorante DAPI (blu) è stato utilizzato per la colorazione dei nuclei. Le immagini riportate sono rappresentative dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Nelle cellule trattate con il BEO si osserva una ridistribuzione intracellulare di LC3 e la comparsa di strutture LC3-positive, assenti nella popolazione controllo e verosimilmente attribuibili alla localizzazione di LC3-II sulla membrana degli autofagosomi.

1.4 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II e riduzione dei livelli di p62 in colture RGC-5.

Al fine di stabilire se il BEO fosse capace di modulare i *marker* dell'autofagia anche in altre linee cellulari, è stata valutata l'espressione di LC3, Beclin 1 e p62 in colture di cellule ganglionari retiniche di ratto, RGC-5.

Come nelle SH-SY5Y, anche in questa linea cellulare il BEO determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, rilevabile mediante *Western blot* a partire dalla concentrazione di BEO 0,02%. Non si apprezzano, invece, modificazioni dei livelli basali di LC3 nelle colture esposte al solo veicolo (etanolo 0,027%) o a concentrazioni inferiori del fitocomplesso (0,01%) (fig. 4 A).

In seguito ad 1h di esposizione al BEO non si osservano variazioni significative dei livelli di p62, mentre una riduzione significativa può essere apprezzata dopo 4h di trattamento con il fitocomplesso (fig. 4 B).

Per verificare se, come le colture di neuroblastoma, anche le RGC-5 fossero sensibili all'azione citotossica del BEO, è stato condotto un saggio biparametrico FDA/PI al citofluorimetro su colture RGC-5 esposte a concentrazioni crescenti dell'olio essenziale. Dai dati ottenuti è emerso che l'esposizione delle RGC-5 al BEO 0,03% per 1 h determina una riduzione della percentuale di cellule vitali, con aumento della percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche; tali variazioni sono statisticamente significative rispetto alle colture esposte al solo veicolo (etanolo 0,027%, veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata). Non si osserva invece citotossicità significativa a concentrazioni inferiori allo 0,03% (0,01-0,02%) (fig. 4 C).

Come nelle SH-SY5Y, anche nelle RGC-5 la modulazione dei *marker* autofagici si osserva anche a concentrazioni di BEO che non risultano tossiche per questa linea cellulare (0,02%).

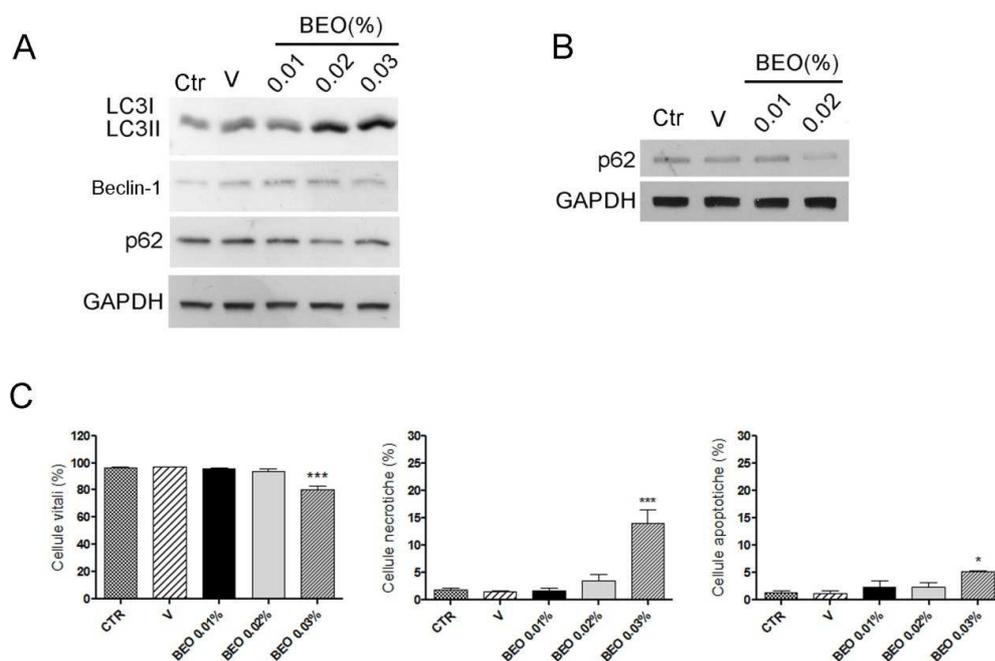


Fig. 4 Modulazione dei marker autofagici ed effetti sulla vitalità cellulare in colture RGC-5 esposte al BEO per 1h.

(A) Colture RGC-5 sono state incubate per 1h con il solo mezzo di coltura (Ctr: controllo) o mezzo contenente il BEO (0.01-0.03%) o il veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (V: etanolo 0.027%). I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di Beclin 1 e p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'esposizione delle RGC-5 al BEO determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, che può essere osservato a partire dalla concentrazione di BEO 0.02%. (B) La riduzione di p62 può essere apprezzata in colture RGC-5 esposte al fitocomplesso per 4h (V: etanolo 0.018%). (C) Analisi della vitalità cellulare delle colture RGC-5 esposte al BEO per 1h, valutata mediante saggio citofluorimetrico FDA/PI. Il programma cellQuest è stato usato per la quantificazione delle cellule vitali, necrotiche e apoptotiche. I valori riportati negli istogrammi, ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10.000 eventi/campione), corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. * indica $P < 0.05$, *** indica $P < 0.001$ rispetto al veicolo (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

1.5 Il trattamento con il BEO determina un cambiamento nella localizzazione citoplasmatica di LC3 nelle RGC-5.

Anche nelle colture RGC-5, come nelle SH-SY5Y, il trattamento per 1h con il BEO determina un cambiamento nella distribuzione intracellulare di LC3, rilevabile mediante immunofluorescenza. In particolare, le cellule esposte al solo veicolo (etanolo 0,018%) mostrano una distribuzione citoplasmatica diffusa di LC3, mentre nelle cellule esposte al BEO (0,02%) si osserva la comparsa di un *pattern* puntinato, concentrato nella zona perinucleare, verosimilmente attribuibile alla localizzazione di LC3-II sulla membrana degli autofagosomi (fig. 5).

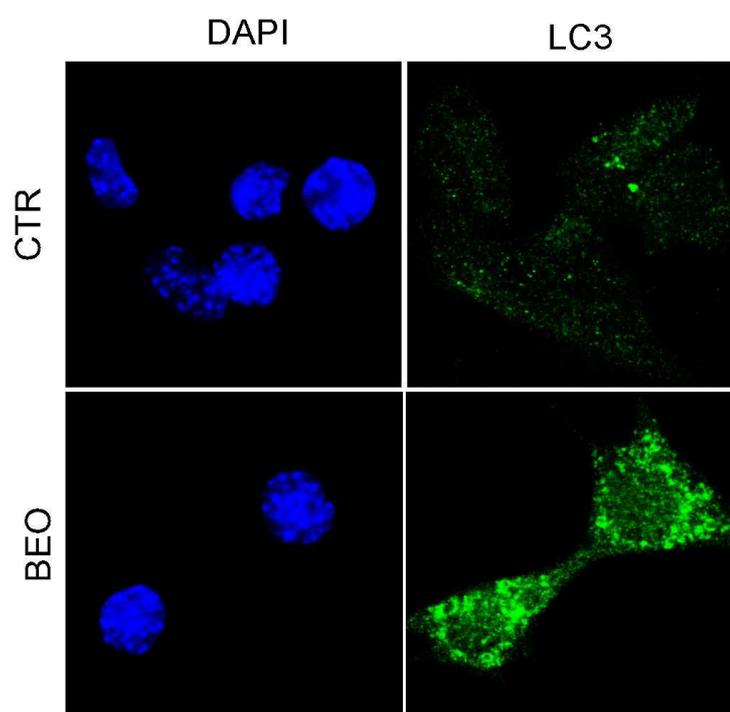


Fig. 5 Ridistribuzione intracellulare di LC3 in cellule RGC-5 esposte al BEO.

Colture RGC-5 sono state trattate per 1h con il BEO (0.02%) o con il veicolo corrispondente (CTR: etanolo 0,018%) e sottoposte ad analisi in microscopia a fluorescenza della proteina LC3 (marcata in verde). Il colorante DAPI (blu) è stato utilizzato per la colorazione dei nuclei. Le immagini riportate sono rappresentative dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Dopo il trattamento con il BEO per 1h, l'immunoreattività di LC3 mostra un *pattern* puntinato, assente nella popolazione controllo, con localizzazione prevalentemente perinucleare, verosimilmente attribuibile alla localizzazione di LC3-II sulla membrana degli autofagosomi.

1.6 Il trattamento con il BEO determina accumulo di LC3-II in colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk.

Poiché sia le colture SH-SY5Y che RGC-5 sono linee continue, al fine di stabilire se il BEO fosse capace di modulare i *marker* dell'autofagia anche in cellule con fenotipo normale, è stata valutata l'espressione di LC3 e p62 in colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk.

L'esposizione delle cellule Hs 605.Sk al BEO (0,02-0,03%) per 1h determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3, mentre a questo tempo non si osservano variazioni rilevanti di p62 (fig. 6 A).

Per valutare gli effetti del BEO sulla vitalità di questa linea cellulare, su una frazione delle cellule trattate, contestualmente al *Western blot*, è stato condotto un saggio biparametrico FDA/PI al citofluorimetro.

L'esposizione di 1h delle Hs 605.Sk all'olio essenziale (0,03%) determina una riduzione della percentuale di cellule vitali (per aumento della percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche), statisticamente significativa rispetto alle colture esposte al solo veicolo (etanolo 0,027%, veicolo corrispondente alla più alta concentrazione di BEO utilizzata) (fig. 6 B).

Anche in questa linea cellulare, come già osservato per le SH-SY5Y e le RGC-5, il BEO induce modificazioni a carico del processo autofagico basale anche a concentrazioni che non producono tossicità (0,02%).

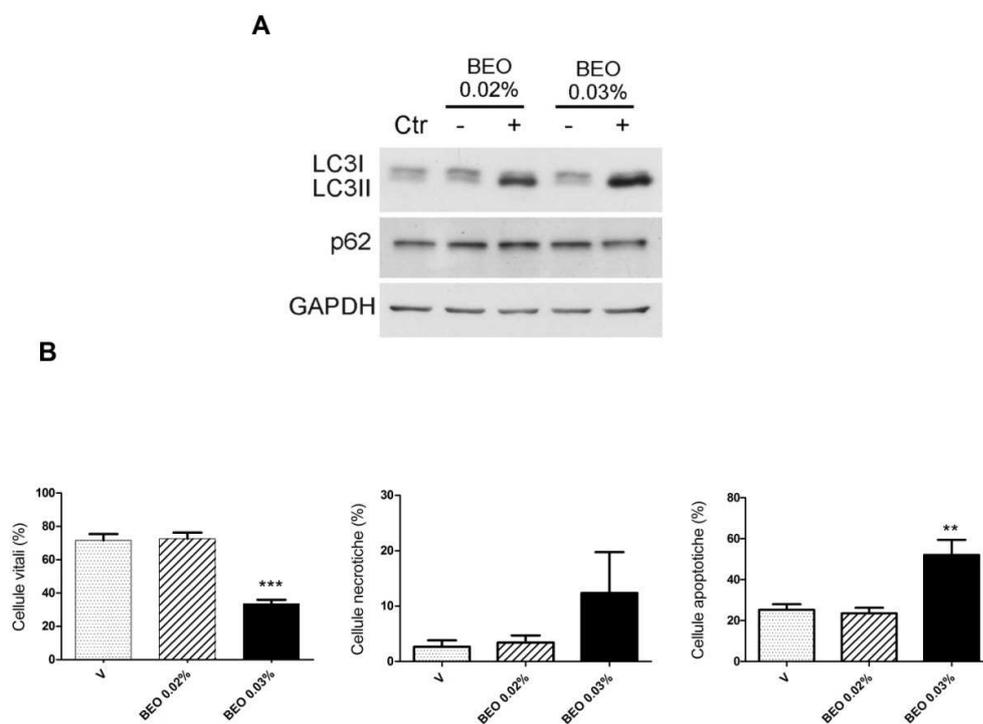


Fig. 6 Modulazione dei marker autofagici ed effetti sulla vitalità cellulare in colture *Hs 605.Sk* esposte al BEO per 1h.

(A) Colture di fibroblasti umani, *Hs 605.Sk*, sono state incubate per 1h con il solo mezzo (Ctr: controllo) o mezzo contenente il BEO (0.02-0.03%) o il corrispondente veicolo (V: etanolo 0.018-0.027%). I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di p62. GAPDH è stato usato come controllo interno di caricamento. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'esposizione dei fibroblasti al BEO determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, che può essere osservato a partire dalla concentrazione di BEO 0,02%. (B). Analisi della vitalità cellulare delle colture *Hs 605.Sk* esposte al BEO per 1h, valutata mediante saggio citofluorimetrico FDA/PI. Il programma cellQuest è stato usato per la quantificazione delle cellule vitali, necrotiche e apoptotiche. I valori riportati negli istogrammi, ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10.000 eventi/campione), corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ rispetto al veicolo (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

1.7 Effetto del trattamento con inibitori dell'autofagia sull'accumulo di LC3-II indotto dal BEO.

L'accumulo di LC3-II indotto dal BEO nelle colture cellulari analizzate potrebbe derivare sia da un'induzione sia da un blocco dell'autofagia. Per valutare quale delle due possibili condizioni fosse associata all'esposizione al BEO, colture SH-SY5Y sono state trattate con il fitocomplesso in presenza di inibitori del processo autofagico, come la Bafilomicina A1 e la Cloroquina.

La Bafilomicina A1 (Baf) inibisce la H^+ -ATPasi vacuolare, incrementando il pH lisosomiale e prevenendo la degradazione dei vacuoli autofagici (Yamamoto *et al.*, 1998; Sobota *et al.*, 2009).

Il blocco dell'autofagia indotto dal trattamento delle SH-SY5Y con la sola Baf è evidente in figura 7, dove si osserva un aumento dei livelli di LC3-II e di p62, dovuto al blocco della loro degradazione. La pre-incubazione di 2h delle colture SH-SY5Y con Baf (100 nM), seguita dal trattamento di 1h con il BEO (0,02%), produce un accumulo di LC3-II maggiore e statisticamente significativo rispetto a quello prodotto dalla sola Baf. Tale dato suggerisce che l'accumulo di LC3-II indotto dal BEO non derivi da un blocco del processo, ma piuttosto dall'induzione dello stesso mediata dal fitocomplesso.

Viceversa, sebbene il trattamento con la sola Baf inibisca la degradazione di p62 portando al suo accumulo, il trattamento con il BEO in presenza dell'inibitore reverte tale accumulo, inducendo una riduzione statisticamente significativa di p62 rispetto ai campioni trattati con la sola Baf (fig. 7).

Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti da esperimenti condotti con un differente protocollo sperimentale, in cui le colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con la Baf e successivamente co-trattate con Baf e BEO per 1h (dati non mostrati).

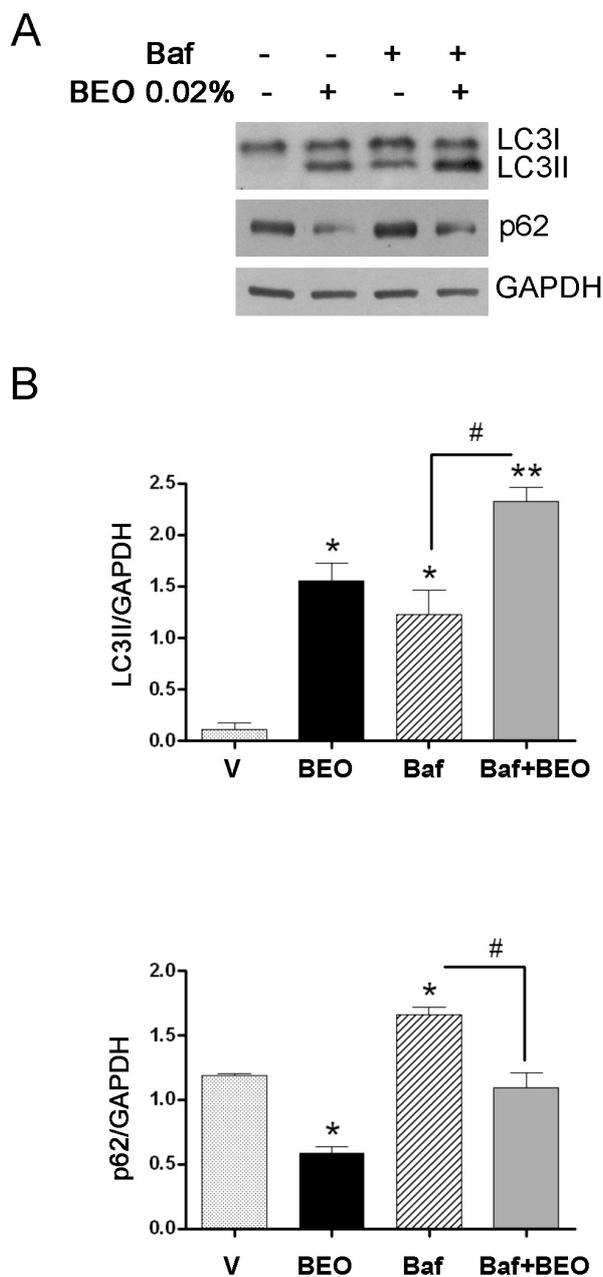


Fig. 7 Effetto del pre-trattamento con Bafilomicina A1 sui livelli di LC3-II e p62 in culture SH-SY5Y esposte al BEO.

(A) Culture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con mezzo di coltura contenente Bafilomicina A1 (Baf, 100 nM) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%). Successivamente, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0.02%) o il veicolo corrispondente (V: etanolo 0.018%). Dopo 1h di incubazione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in

*LC3-II e i livelli di espressione di p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. (B) Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative a LC3-II e p62 normalizzati per i valori densitometrici della bande del controllo interno, GAPDH. I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti. Il pre-trattamento delle cellule con Baf, seguito dal trattamento con il BEO, comporta un accumulo di LC3-II maggiore e statisticamente significativo rispetto a quello prodotto dalla Baf da sola, suggerendo che il BEO induce l'autofagia. Inoltre, il trattamento di 1h con il BEO riduce, in maniera statisticamente significativa, l'accumulo di p62 prodotto dalla Baf. * indica $P < 0.05$ rispetto al veicolo; # indica $P < 0.05$ rispetto al trattamento con la sola Bafilomicina (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).*

L'accumulo di LC3-II in presenza di Bafilomicina A1 suggerisce che il BEO sia responsabile di un'induzione del processo autofagico. Per confermare tale dato è stato valutato il *turnover* di LC3-II in presenza di un altro inibitore dell'autofagia, la Cloroquina.

La Cloroquina (CQ) è un agente lisosomotropico che previene l'acidificazione del compartimento lisosomiale, bloccando l'attività degli enzimi idrolitici in esso contenuti (De Duve, 1974; Seglen, 1983) e quindi il completamento del processo autofagico.

La pre-incubazione di 2h delle SH-SY5Y con CQ (50 μ M), seguita dal trattamento di 1h con il BEO (0,02%), comporta un accumulo di LC3-II maggiore rispetto a quello prodotto dal trattamento con la sola CQ, confermando il dato ottenuto con la Bafilomicina A1.

Anche in questo caso il trattamento con il fitocomplesso riduce l'accumulo di p62 prodotto dal trattamento col solo inibitore (fig. 8).

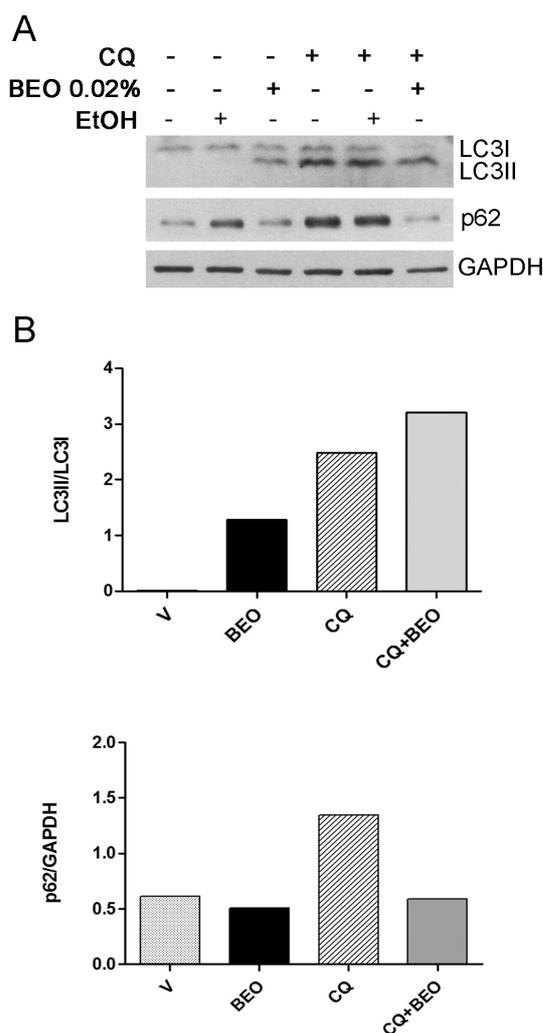


Fig. 8 Effetto del pre-trattamento con Cloroquina sui livelli di LC3-II e p62 nelle SH-SY5Y esposte al BEO.

(A) Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con il solo mezzo di coltura o con mezzo contenente Cloroquina (CQ, 50 μ M). Successivamente, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0.02%) o il veicolo corrispondente (V: etanolo 0.018%). Dopo 1h di incubazione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. (B) Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative a LC3-II e p62 normalizzati per i valori densitometrici delle bande del controllo interno, GAPDH. I dati riportati rappresentano i valori ottenuti in uno dei tre esperimenti indipendenti.

1.8 Il BEO induce la fusione dell'autofagosoma con il compartimento lisosomiale.

Per stabilire se l'autofagia indotta dal BEO fosse completa, escludendo così la presenza di un processo "abortivo" (incompleto), è stato studiato il flusso autofagico, valutando la capacità di maturazione degli autofagosomi nelle cellule esposte al fitocomplesso.

Per lo scopo, è stata valutata la capacità degli autofagosomi di fondere con i lisosomi, osservando la localizzazione intracellulare di LC3 (come *marker* delle membrane autofagiche) e LAMP-I (come *marker* degli endosomi/lisosomi tardivi) (Eskelinen, 2006; Ignoul et al., 2007), mediante microscopia a fluorescenza.

Accanto alla ridistribuzione del segnale relativo ad LC3, precedentemente osservato (fig. 3), l'esposizione delle cellule al fitocomplesso (0,03%, 1h) comporta cambiamenti anche nella distribuzione citoplasmatica dell'immunoreattività per LAMP-I. Si osserva, infatti, nelle cellule esposte al BEO (0,03%) ma non al veicolo (etanolo 0,027%) la presenza di *cluster* di strutture sferiche positive per LAMP-I. Si osserva, inoltre, colocalizzazione (*dot* in arancione), del segnale di LC3 (marcato in verde) e LAMP-I (marcato in rosso) ad indicare l'avvenuta fusione tra autofagosomi e lisosomi (fig. 9).

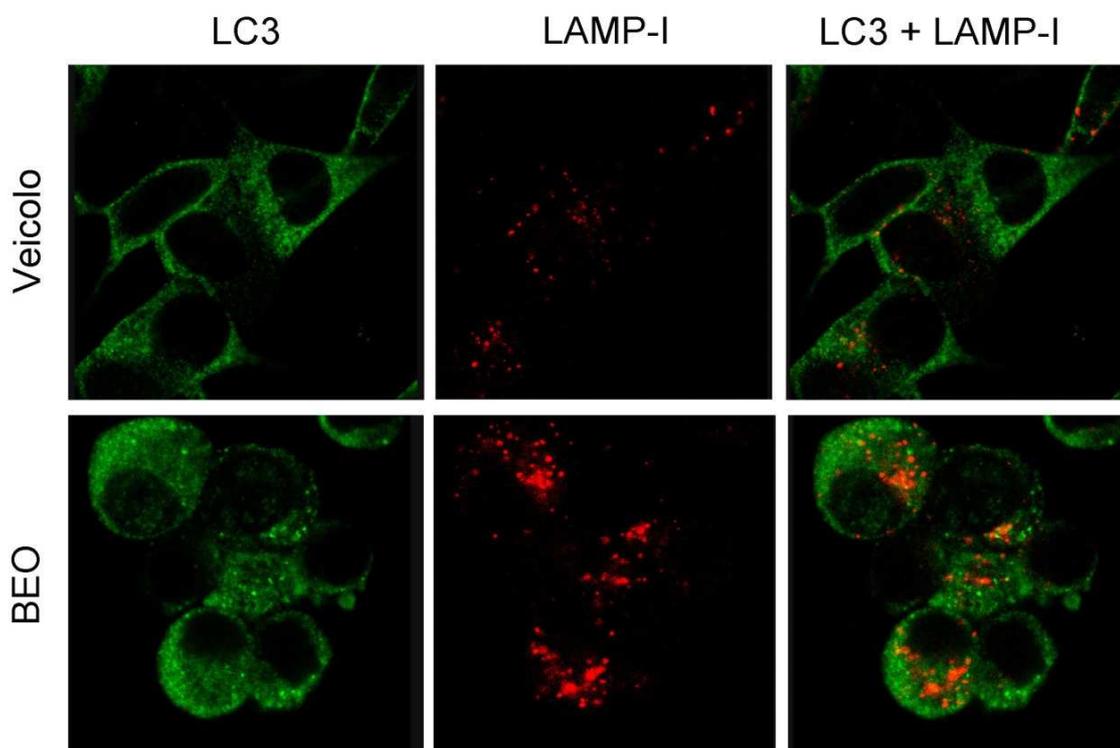


Fig. 9 Colocalizzazione di LC3 e LAMP-I nelle SH-SY5Y esposte al BEO.

Culture SH-SY5Y sono state trattate per 1h con il BEO (0,03%) o con il corrispondente veicolo (etanolo 0,027%) e sottoposte ad analisi in microscopia a fluorescenza della proteina LC3 (marcata in verde) e della proteina lisosomiale LAMP-I (marcata in rosso). Nelle cellule esposte al BEO si osserva una redistribuzione di LC3 e la comparsa di strutture sferiche LC3-positive, assenti nella popolazione controllo. Inoltre, il trattamento con il fitocomplesso comporta una redistribuzione dei lisosomi, che tendono ad associarsi in cluster, come rilevato dall'immunofluorescenza di LAMP-I. I dot fluorescenti che nel merging appaiono con una colorazione arancione, indicano la colocalizzazione di LC3 e LAMP-I, suggerendo che il processo autofagico si completa e avviene la fusione tra autofagosomi e lisosomi.

2. Effetto del BEO sulla funzionalità del sistema ubiquitina-proteosoma

La riduzione dei livelli di p62 prodotta dal BEO viene osservata anche nella condizione sperimentale in cui l'autofagia è stata bloccata (con Bafilomicina A1 o Cloroquina). Tale dato suggerisce la possibilità che p62 venga degradata attraverso altri processi degradativi attivati dal BEO, pertanto, è stato valutato l'effetto prodotto dal fitocomplesso sul sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) che, insieme all'autofagia, rappresenta un altro importante sistema di degradazione delle proteine negli eucarioti.

2.1 Il trattamento con il BEO riduce in maniera concentrazione-dipendente i livelli totali di proteine poli-ubiquitinate nelle colture SH-SY5Y e RGC-5.

Al fine di valutare l'attività del proteosoma nelle cellule esposte al BEO, è stato effettuato un *immunoblotting* anti-ubiquitina. Per lo scopo, è stato utilizzato un anticorpo capace di riconoscere l'ubiquitina (sia nella forma libera che coniugata), che dà un caratteristico segnale "strisciato" o *ladder*, per la presenza di proteine ubiquitinate dal diverso peso molecolare. Colture SH-SY5Y e RGC-5 sono state esposte per 1h a concentrazioni crescenti del fitocomplesso (0,01-0,03%) o al veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (etanolo 0.027%).

Nei campioni trattati con il BEO si osserva una riduzione dell'intensità del segnale associato alle proteine poli-ubiquitinate rispetto a quello presente negli estratti proteici delle cellule trattate con il solo veicolo. L'effetto osservato è concentrazione-dipendente e interessa principalmente le proteine ubiquitinate ad alto peso molecolare (fig. 10).

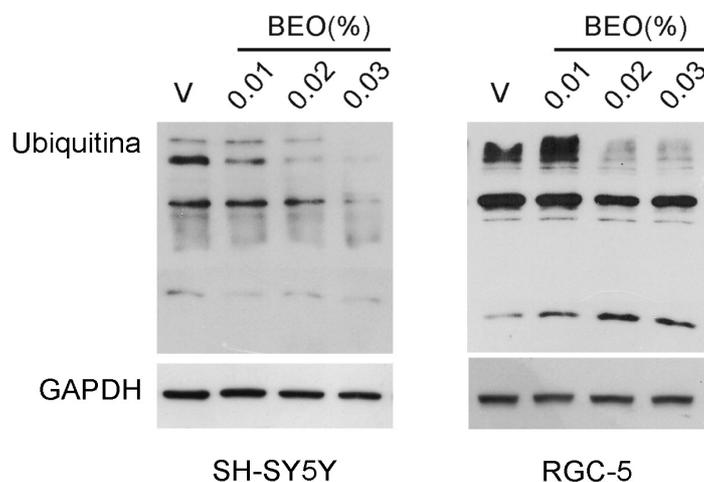


Fig. 10 Effetto del trattamento con il BEO sui livelli totali di ubiquitina in colture SH-SY5Y e RGC-5.

Colture SH-SY5Y e RGC-5 sono state esposte al BEO (0.01-0.03%) o al veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (V: etanolo 0.027%) per 1h. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare i livelli di proteine poli-ubiquitinate. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Nei campioni trattati con il BEO si osserva una riduzione dell'intensità del segnale associato alle proteine poli-ubiquitinate rispetto a quello presente negli estratti proteici delle cellule trattate solo con il veicolo. Il fenomeno osservato è concentrazione-dipendente.

2.2 Effetto della contemporanea inibizione del processo autofagico e del proteosoma in colture SH-SY5Y esposte al BEO.

La riduzione dei livelli di proteine ubiquitinate che si osserva nelle cellule esposte al BEO suggerisce un aumento dell'attività dell'UPS. Pertanto, la riduzione di p62 che si osserva nelle cellule esposte al fitocomplesso, anche nella condizione sperimentale in cui l'autofagia è stata bloccata (con Bafilomicina/Cloroquina), potrebbe essere dovuta alla degradazione di p62 da parte del sistema del proteosoma, di cui p62 può essere substrato (Korolchuk *et al.*, 2009). Al fine di validare questa ipotesi, sono stati condotti degli esperimenti con MG132, un inibitore specifico, potente e reversibile del proteosoma (Lee and Goldberg, 1998).

Il blocco della sola autofagia con Baf (100 nM, 3h) o della via del proteosoma con MG132 (10 µM, 5h) è accompagnato, nelle cellule esposte al BEO, da una riduzione dei livelli di p62 rispetto ai campioni trattati con i soli inibitori. Viceversa, in seguito al blocco contemporaneo delle due vie cataboliche ottenuto mediante il trattamento con MG132 e Baf, l'esposizione al BEO 0,02% (1h) non è associata ad una riduzione dei livelli di p62 (fig. 11).

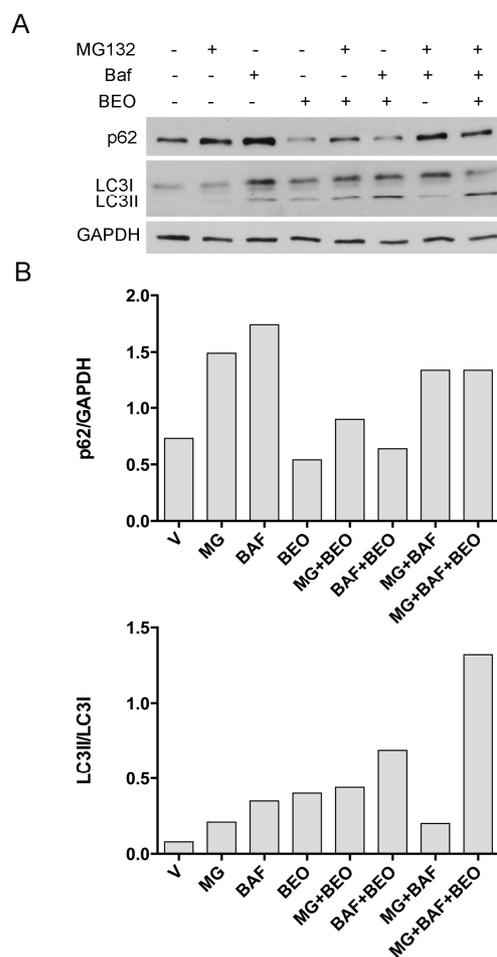


Fig. 11 Effetto del pre-trattamento con MG132 e Bafilomicina A1 sui livelli di LC3-II e p62 nelle SH-SY5Y trattate con il BEO per 1h.

(A) Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con mezzo di coltura contenente MG132 (MG, 10 μ M) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%). Successivamente il mezzo è stato addizionato di Bafilomicina A1 (Baf, 100 nM) o del corrispondente veicolo (DMSO 0.1%). Dopo altre 2h di incubazione con gli inibitori è stato aggiunto il BEO (concentrazione finale 0.02%) o il suo veicolo (V: etanolo, concentrazione finale 0.018%) direttamente nel mezzo di coltura. Dopo 1h di co-trattamento, le cellule sono state raccolte e i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. (B) Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative a LC3-II (normalizzato verso LC3-I) e p62 (normalizzato per i valori densitometrici della bande del controllo interno, GAPDH). I valori mostrati sono relativi ai risultati ottenuti in uno dei 3 esperimenti indipendenti.

3. Ruolo dell'autofagia nella citotossicità prodotta dal BEO *in vitro*

Come precedentemente documentato in letteratura dal nostro gruppo di ricerca, l'esposizione per 1h delle SH-SY5Y al BEO (0,02-0,03%) riduce in maniera concentrazione-dipendente la vitalità cellulare ed aumenta la percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche, con un effetto che è statisticamente significativo rispetto alle colture trattate con il solo veicolo (etanolo 0,018-0,027%) (Berliocchi *et al.*, 2011).

Al fine di valutare se l'autofagia indotta dal BEO esercitasse un ruolo protettivo per la cellula o, al contrario, contribuisse all'effetto citotossico prodotto dall'olio essenziale, mediante analisi citofluorimetrica FDA/PI è stata analizzata la vitalità cellulare delle colture esposte al fitocomplesso, in presenza di inibitori farmacologici dell'autofagia.

3.1 Il pre-trattamento delle SH-SY5Y con inibitori dell'autofagia riduce la vitalità cellulare nei campioni trattati con il BEO.

Nelle cellule di neuroblastoma, SH-SY5Y, l'inibizione del processo autofagico, ottenuta mediante pre-incubazione di 2h con Bafilomicina A1 (100 nM) o Cloroquina (50 µM), riduce ulteriormente la vitalità cellulare dei campioni trattati con il BEO (0,02%, 1h), per aumento del numero di cellule necrotiche.

Nei campioni pre-trattati con la Bafilomicina A1 si osserva un *trend* alla riduzione della vitalità (pari a circa il 10%). Differenze statisticamente significative sono state osservate nei campioni pre-trattati con la Cloroquina. Nessun effetto tossico viene prodotto dal trattamento con il solo inibitore (fig. 12).

Questi dati suggeriscono che la risposta autofagica indotta dal BEO nelle SH-SY5Y non contribuisce agli effetti citotossici prodotti dal fitocomplesso ma, al contrario, esercita un ruolo protettivo.

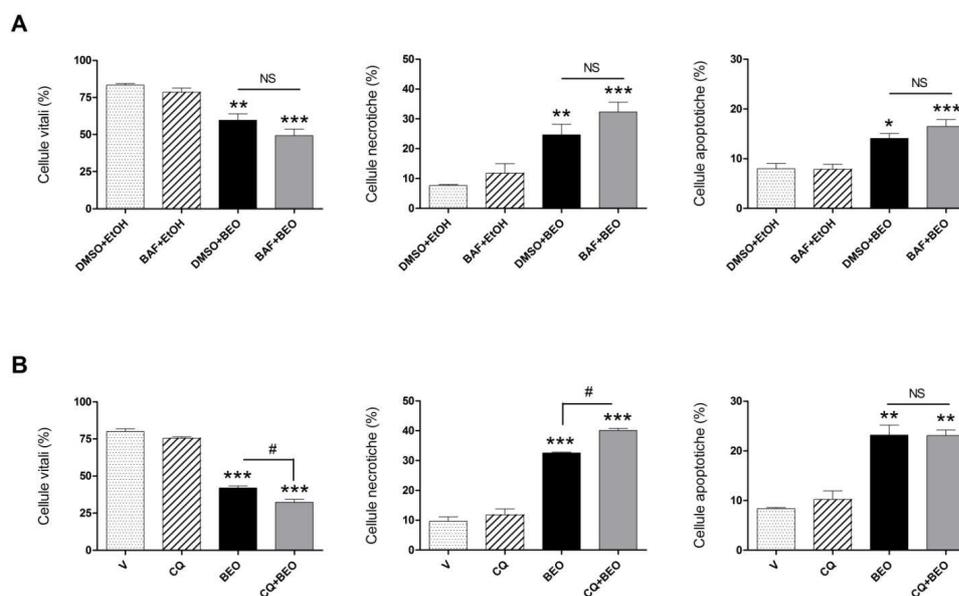


Fig. 12 Effetto dell'inibizione dell'autofagia con Clorochina e Bafilomicina A1 sulla citotossicità prodotta dal BEO nelle SH-SY5Y.

Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con mezzo di coltura contenente (A) Bafilomicina A1 (BAF, 100 nM) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%) o (B) mezzo di coltura contenente Clorochina (CQ, 50 μ M). Successivamente, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente BEO (0.02%) o il veicolo corrispondente (V: etanolo 0.018%). Dopo 1h di incubazione, sono stati valutati gli effetti sulla vitalità cellulare mediante colorazione con FDA/PI ed analisi citofluorimetrica. Il programma cellQuest è stato usato per la quantificazione delle cellule vitali, necrotiche e apoptotiche. I valori riportati negli istogrammi, ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10.000 eventi/campione), corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. L'esposizione delle SH-SY5Y al BEO (0,02%) per 1 h determina una riduzione della percentuale di cellule vitali ed un aumento della percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche, statisticamente significativi rispetto alle colture trattate con il solo veicolo. Nelle cellule pre-trattate con la BAF e successivamente esposte al BEO, si osserva un trend alla riduzione della vitalità (di circa il 10%), con aumento degli eventi apoptotici e necrotici. Queste differenze risultano statisticamente significative nelle cellule pre-incubate con la Clorochina e successivamente esposte al fitocomplesso. Nessun effetto tossico è stato osservato in seguito al trattamento col solo inibitore. * indica $P < 0.05$, ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ rispetto al veicolo; # indica $P < 0.05$ (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

4. Meccanismi molecolari alla base dell'induzione della *pathway* autofagica da parte del BEO

Al fine di comprendere meglio gli effetti prodotti dal BEO sulla *pathway* autofagica, la sua azione è stata testata in un sistema sperimentale in cui l'autofagia era già stata indotta, mediante deprivazione di nutrienti (*starvation*) o farmacologicamente (con Rapamicina).

4.1 La modulazione dei maker dell'autofagia indotta dal BEO nelle SH-SY5Y e nelle RGC-5 si osserva sia in condizioni normali che di deprivazione di siero (starvation).

Colture SH-SY5Y sono state coltivate in terreno completo (10% FBS, siero fetale bovino) o privo di siero (0% FBS). Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0,01-0,03%) o il veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (etanolo 0,027%).

L'accumulo di LC3-II e la riduzione di p62 indotti dal BEO sono stati osservati sia nelle cellule coltivate in condizioni normali che in quelle sottoposte a deprivazione di siero (fig. 13 A) e risultati analoghi sono stati ottenuti anche per colture RGC-5 (fig. 13 B).

Nelle cellule di neuroblastoma non si osservano variazioni rilevanti nell'espressione della proteina Beclin 1, mentre nelle RGC-5 l'esposizione per 1h al BEO (0,03% in condizioni normali; 0,02-0,03% in condizioni di deprivazione di siero) determina una riduzione del livello di Beclin 1, accompagnata dalla comparsa di un frammento di clivaggio, rilevabile con un maggiore tempo di esposizione della lastra fotografica rispetto alla proteina *full-length*. Tale frammento, del peso molecolare apparente di 50 KDa, è stato dimostrato essere prodotto *in vitro* (Wirawan *et al.*, 2010) e *in vivo* (Russo *et al.*, 2011) dall'attivazione delle calpaine.

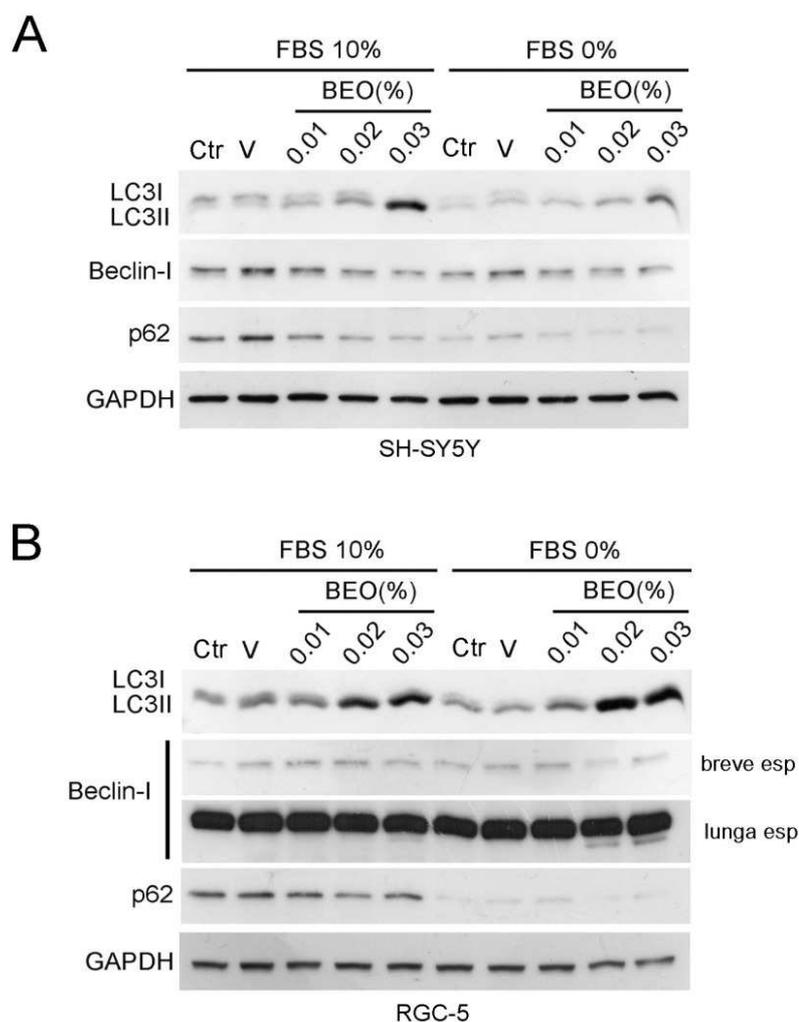


Fig. 13 Modulazione dei marker dell'autofagia indotta dal BEO nelle SH-SY5Y e nelle RGC-5 in condizioni normali e di starvation.

(A) Colture SH-SY5Y sono state coltivate in terreno completo (10% FBS, siero fetale bovino) o privo di siero (0% FBS). Dopo 24 ore il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0.01-0.03%) o il veicolo presente nella più alta concentrazione di BEO utilizzata (V: etanolo 0.027%). Dopo 1h di incubazione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di Beclin 1 e p62. GAPDH è stato usato come controllo interno di caricamento. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'esposizione delle SH-SY5Y al BEO (0.01-0.03%) determina un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, accompagnato dalla riduzione dei livelli di LC3-I e di p62, sia nelle cellule coltivate in condizioni normali che in quelle sottoposte a deprivazione di siero nelle 24 ore precedenti il trattamento con il BEO. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in colture RGC-5 (B). In

questa linea cellulare l'esposizione per 1h al BEO (0,03% in condizioni normali; 0,02-0,03% in condizioni di deprivazione di siero) determina una riduzione dei livelli di Beclin 1, accompagnata dalla comparsa di un frammento di clivaggio di 50 KDa, rilevabile con un maggiore tempo di esposizione della lastra fotografica rispetto alla proteina full-length.

4.2 Effetto del pre-trattamento con Rapamicina sulla modulazione dell'autofagia indotta dal BEO in cellule SH-SY5Y.

Per caratterizzare il coinvolgimento di mTOR nell'induzione dell'autofagia prodotta dal BEO, ne è stata studiata la capacità di modulare i *marker* dell'autofagia in presenza di Rapamicina.

La Rapamicina (anche conosciuta come Sirolimus) è un antibiotico macrolide lipofilo potente induttore dell'autofagia nei lieviti, nelle linee cellulari di mammifero e nelle colture primarie, così come *in vivo* (Fleming et al., 2011).

Nelle cellule di mammifero la Rapamicina inibisce l'attività di mTOR (*mammalian target of rapamycin*), una proteina chinasi serina/treonina intracellulare che gioca un ruolo centrale nella via autofagica (Carrera, 2004).

Nelle colture SH-SY5Y pre-incubate per 48h con Rapamicina (3 μ M) e successivamente esposte al BEO (0,02%) per 1h, si osserva un accumulo di LC3-II maggiore rispetto a quello prodotto dal trattamento con la sola Rapamicina, suggerendo che il BEO potrebbe indurre l'autofagia attraverso un meccanismo indipendente dalla via di mTOR o comunque diverso da quello della Rapamicina (fig. 14).

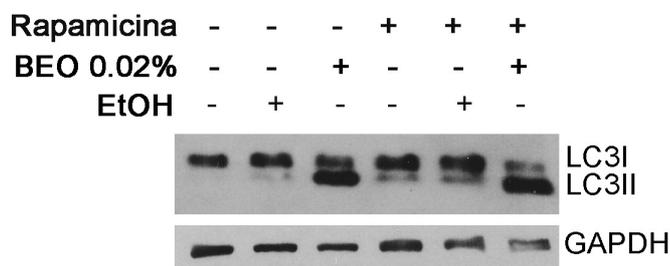


Fig. 14 Effetto del pre-trattamento con Rapamicina sui livelli di LC3-II nelle SH-SY5Y esposte al BEO.

Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 48h con mezzo di coltura contenente Rapamicina (3 μ M) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%). Successivamente, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0.02%) o il veicolo corrispondente (V: etanolo 0.018%). Dopo 1h di incubazione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Il trattamento delle SH-SY5Y con Rapamicina induce l'autofagia, a causa del blocco della via di mTOR, con aumento dei livelli di LC3-II rispetto alle condizioni basali. Nei campioni pre-trattati con la Rapamicina, e successivamente esposti al BEO, si osserva un accumulo ulteriore di LC3-II, maggiore rispetto a quello prodotto dalle due sostanze da sole, suggerendo che il BEO induca l'autofagia attraverso un meccanismo mTOR-indipendente.

4.3 Il pre-trattamento con Rapamicina non ha effetti sulla mortalità cellulare prodotta dal BEO nelle SH-SY5Y.

Al fine di valutare l'effetto del pre-trattamento con Rapamicina sulla vitalità cellulare delle colture SH-SY5Y esposte al BEO, su una frazione delle cellule trattate, contestualmente al *Western blot*, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica mediante colorazione con FDA/PI.

Dai dati ottenuti è stato osservato che il pre-trattamento delle SH-SY5Y con Rapamicina (3 μ M, 48h) non modifica l'entità della mortalità cellulare prodotta dal BEO (fig. 15).

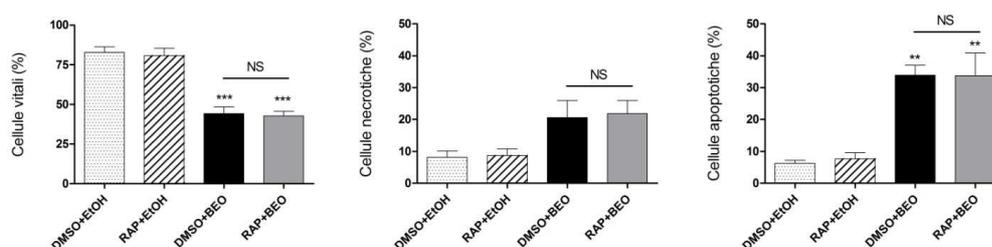


Fig. 15 Effetto del pre-trattamento con Rapamicina sulla citotossicità del BEO nelle SH-SY5Y.

Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 48h con mezzo di coltura contenente Rapamicina (RAP, 3 μ M) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%). Dopo il trattamento con l'inibitore, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente BEO (0.02%) o il suo corrispondente veicolo (etanolo 0.018%). Dopo 1h di incubazione sono stati valutati gli effetti sulla vitalità cellulare mediante doppia colorazione con FDA/PI ed analisi citofluorimetrica. Il programma cellQuest è stato usato per la quantificazione delle cellule vitali, necrotiche e apoptotiche. I valori riportati negli istogrammi, ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10.000 eventi/campione), corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. L'esposizione delle SH-SY5Y al BEO (0,02%) per 1 h determina una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule vitali, con aumento del numero di eventi necrotici e apoptotici, rispetto alle colture trattate con il solo veicolo. Il pre-trattamento delle SH-SY5Y con Rapamicina non modifica l'entità della mortalità cellulare prodotta dal BEO. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ rispetto al veicolo (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

4.4 Il silenziamento genico di Beclin 1 non modifica l'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO nelle SH-SY5Y.

Al fine di caratterizzare meglio i meccanismi molecolari con cui il BEO modula i *marker* dell'autofagia, è stato operato il silenziamento genico transiente (*knockdown*) di Beclin 1 e sono stati valutati gli effetti prodotti dal fitocomplesso nelle cellule silenziate.

Per lo scopo, colture di neuroblastoma SH-SY5Y sono state trasfettate con uno *small interfering RNA* (siRNA) diretto contro Beclin 1 o con la sequenza *scramble non targeting*, ad una concentrazione finale di 50 nM per le 72h precedenti il trattamento con il BEO (0,02%, 1h). Nelle cellule trasfettate con il siRNA l'espressione di Beclin 1 si è ridotta di circa il 75%, rispetto al livello basale della proteina (fig. 16).

Dai dati ottenuti è emerso che il *knockdown* di Beclin 1 non modifica l'accumulo di LC3-II prodotto dal BEO nelle cellule di neuroblastoma, suggerendo che l'induzione dell'autofagia prodotta dal fitocomplesso potrebbe seguire una via Beclin1-indipendente.

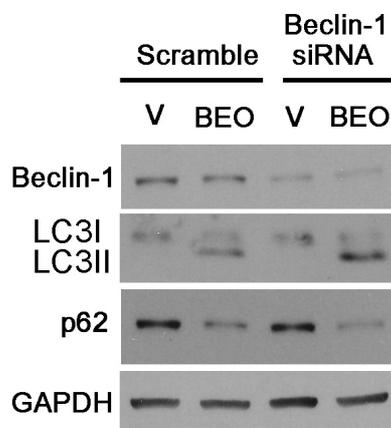


Fig. 16 Effetto del silenziamento genico di Beclin 1 nelle SH-SY5Y esposte al BEO per 1h.

Colture SH-SY5Y sono state trasfettate con uno small interfering RNA (siRNA) specifico per Beclin 1 o con la sequenza scramble non targeting, ad una concentrazione finale di 50 nM, per 72h. Successivamente, le cellule sono state esposte per 1h al BEO (0.02%) o alla concentrazione di veicolo corrispondente (V: etanolo 0.018%). I lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di Beclin 1 e p62. GAPDH è stato usato come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Il knockdown di Beclin 1 non modifica l'accumulo di LC3-II e la riduzione di p62 prodotte dal BEO nelle colture di neuroblastoma.

5. Identificazione dei componenti responsabili della modulazione del processo autofagico da parte del BEO

Al fine di identificare i componenti responsabili della modulazione della *pathway* autofagica prodotta dal BEO, i principali costituenti del fitocomplesso sono stati testati su colture cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y.

Per ogni composto sono state utilizzate le concentrazioni con cui esso è presente nelle diluizioni di BEO che modulano i *marker* autofagici in questa linea cellulare.

L'idrocarburo monoterpenco limonene e l'estere monoterpenco linalil acetato costituiscono insieme circa il 70% della frazione volatile del BEO (Mondello *et al.*, 1995; Verzera *et al.*, 1996, 2003).

Essendo il BEO un fitocomplesso, è possibile ipotizzare che gli effetti biologici da esso prodotti siano imputabili all'azione sinergica di più principi attivi, pertanto, i composti più abbondanti nell'olio essenziale sono stati testati sia singolarmente che in combinazione.

5.1 Il limonene e il linalil acetato, da soli e in associazione, modulano in maniera concentrazione-dipendente i marker dell'autofagia nelle SH-SY5Y.

Nelle colture SH-SY5Y esposte per 1h al limonene (0,008-0,012%) o al linalil acetato (0,0057-0,0086%), dati singolarmente, è stato riscontrato un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, accompagnato dalla riduzione dei livelli di LC3-I e p62. L'effetto prodotto dal limonene è più marcato di quello prodotto dal linalil acetato. Inoltre, l'esposizione combinata al limonene e al linalil acetato produce un effetto additivo sull'accumulo di LC3-II e sulla riduzione di p62 rispetto all'effetto prodotto dal trattamento con le due sostanze date singolarmente (fig. 17).

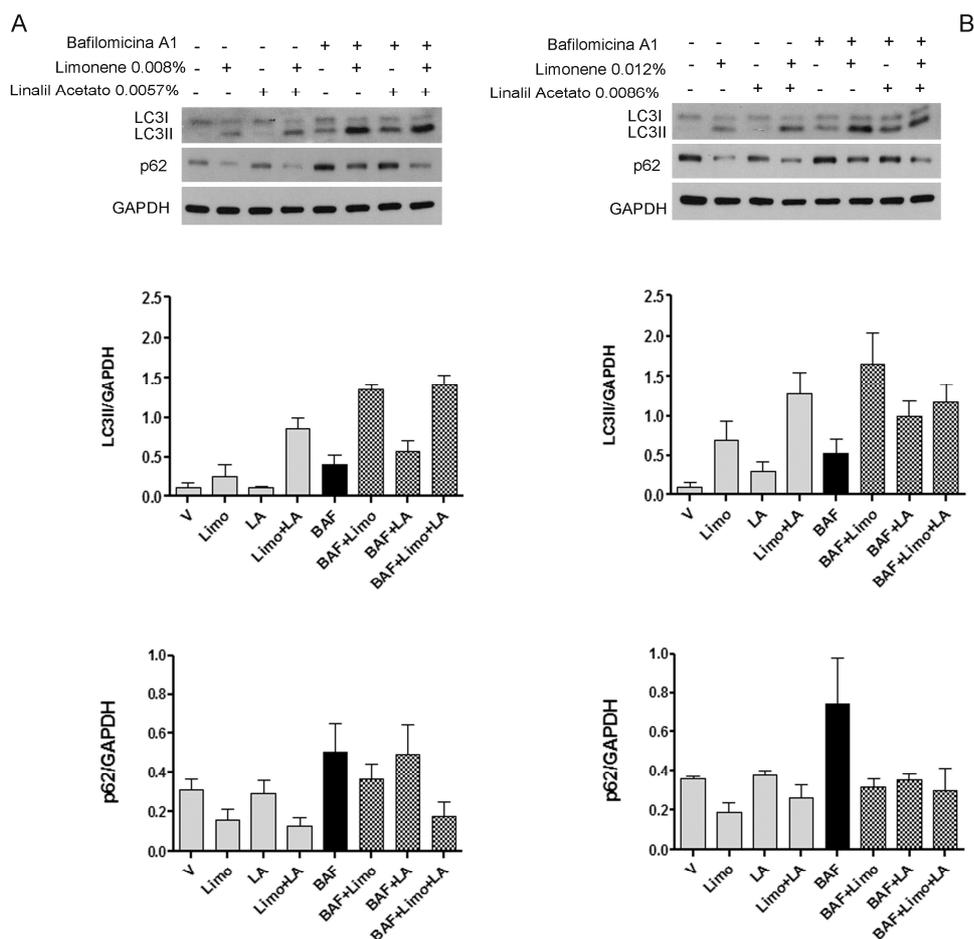


Fig. 17 Effetto del pre-trattamento con Bafilomicina A1 sui livelli di LC3-II e p62 nelle SH-SY5Y esposte a limonene e/o linalil acetato.

(A) Colture SH-SY5Y sono state pre-incubate per 2h con mezzo di coltura contenente Bafilomicina A1 (BAF, 100 nM) o con la corrispondente concentrazione di veicolo (DMSO 0.1%). Successivamente, il mezzo è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco contenente limonene (0.008-0.012%) o linalil acetato (0.0057-0.0086%), singolarmente o in combinazione, alle concentrazioni corrispondenti a quelle trovate del BEO 0.02% (A) e 0.03% (B). Le colture controllo sono state incubate con una miscela dei veicoli corrispondenti (rispettivamente, DMSO 0.072-0.108% ed etanolo 0.046-0.066%). Dopo 1h di esposizione, i lisati cellulari sono stati analizzati mediante Western blot per valutare la conversione di LC3-I in LC3-II e i livelli di espressione di p62. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche relative a LC3-II e p62 normalizzati per i valori densitometrici delle bande del controllo interno, GAPDH. I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard dei

valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti. Il limonene e il linalil acetato, singolarmente, inducono un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II, accompagnato da una riduzione dei livelli di LC3-I e p62. L'esposizione alla miscela limonene e linalil acetato produce un accumulo maggiore di LC3-II e una maggiore riduzione di p62, rispetto all'effetto prodotto dal trattamento con le due sostanze usate singolarmente. Il pre-trattamento con BAF aumenta ulteriormente l'accumulo di LC3-II prodotto dal limonene e dal linalil acetato, confermando che anche i singoli principi attivi, come il BEO, agiscono da induttori dell'autofagia. Inoltre, come il BEO, anche il trattamento con limonene e/o linalil acetato riduce l'accumulo di p62 prodotto dal pre-trattamento con l'inibitore.

Al fine di valutare l'effetto sulla vitalità cellulare del trattamento con limonene e linalil acetato, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica mediante colorazione con FDA/PI.

Dai dati ottenuti è risultato che l'esposizione di 1h al limonene o al linalil acetato, dati singolarmente e alle concentrazioni corrispondenti a quelle trovate nel BEO 0,02-0,03%, non ha effetti sulla vitalità cellulare delle SH-SY5Y. Solo l'esposizione combinata alle due sostanze determina una riduzione della vitalità, per aumento del numero di cellule necrotiche e apoptotiche.

L'effetto citotossico della miscela [limonene + linalil acetato] è concentrazione-dipendente e inizia ad essere osservato a partire dalle concentrazioni dei due costituenti corrispondenti a quelle trovate nel BEO 0,03% (limonene 750 μ M, linalil acetato 375 μ M). Nessuna tossicità è stata osservata nelle colture esposte al solo veicolo (0,066% etanolo + 0,108% DMSO; concentrazioni presenti nelle più alte concentrazioni di limonene e linalil acetato utilizzate) (fig. 18).

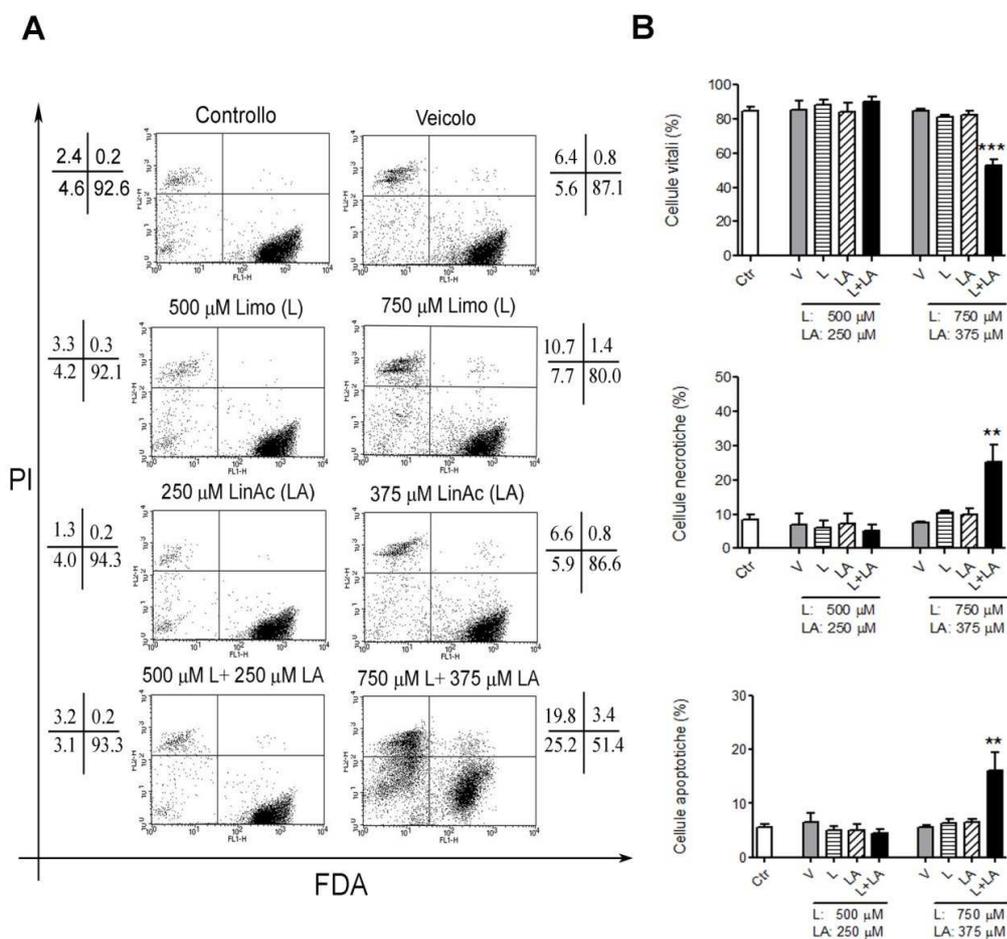


Fig. 18 Analisi della vitalità cellulare di colture SH-SY5Y esposte per 1h a limonene e linalil acetato, dati da soli o in combinazione.

Colture SH-SY5Y sono state incubate per 1h con il solo mezzo di coltura (Ctr: controllo) o con mezzo contenente limonene e/o linalil acetato o i corrispondenti veicoli. Le cellule sono state poi colorate con FDA/PI e la proporzione di cellule vitali, necrotiche e apoptotiche è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. In (A) vengono mostrati i dot-plot rappresentativi di FDA versus PI dell'analisi al citofluorimetro (Veicolo: 0.108% DMSO + 0.066% etanolo; limonene: Limo, L; linalil acetato: LinAc, LA). La percentuale di cellule vitali (quadrante inferiore destro), necrotiche (quadrante superiore sinistro) e apoptotiche (quadrante inferiore sinistro) in 10.000 eventi/campione acquisiti è stata determinata usando il programma CellQuest. Gli istogrammi in (B) mostrano il risultato di 4 esperimenti indipendenti (media \pm errore standard). Il limonene e il linalil acetato, dati singolarmente e alle concentrazioni corrispondenti a quelle trovate nel BEO 0,02-0,03%, non hanno effetti sulla vitalità cellulare delle SH-SY5Y. Solo l'esposizione combinata alle due sostanze, alle concentrazioni

*corrispondenti a quelle trovate nel BEO 0,03%, determina una riduzione della vitalità cellulare, per aumento del numero di cellule necrotiche e apoptotiche. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ verso tutti gli altri trattamenti (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per le comparazioni multiple).*

Per le concentrazioni tossiche di BEO (0,02-0,03%) era stata documentata la capacità del fitocomplesso di indurre attivazione della caspasi 3 e la comparsa di frammenti di clivaggio di PARP di 89 KDa e 72-35 KDa (Berliocchi et al., 2011). Pertanto, mediante *Western blot* è stata valutata la modulazione dei *marker* apoptotici in colture SH-SY5Y esposte al limonene e/o al linalil acetato, al fine di confermare l'assenza di tossicità del trattamento.

Dai risultati ottenuti è stato possibile osservare che il trattamento di 1h delle cellule con limonene (0,012%) o linalil acetato (0,0086%), dati singolarmente e alle concentrazioni con cui essi sono presenti nel BEO 0,03%, non determina attivazione della caspasi 3, mentre l'esposizione combinata alle due sostanze produce la comparsa dei frammenti attivi di 19 e 17 KDa, derivanti dal clivaggio dello zimogeno inattivo del peso molecolare di 35 KDa.

L'attivazione della caspasi 3 prodotta dalla miscela è confermata anche dall'aumento dell'immunoreattività del frammento di clivaggio di 89 KDa della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP), uno dei substrati canonici della caspasi 3 (Lazebnik et al., 1994). Inoltre, analogamente a quanto già documentato per il BEO (Berliocchi et al., 2011), in seguito al co-trattamento con limonene e linalil acetato (alle concentrazioni corrispondenti a quelle del BEO 0,03%), si osserva la presenza di altri frammenti di clivaggio della proteina PARP, compresi in un *range* di 72-35 kDa, intervallo in cui ricadono i frammenti di PARP associati alla morte cellulare per necrosi (Aikin et al., 2004; Gobeil et al., 2001; Shah et al., 1996) (Fig. 19).

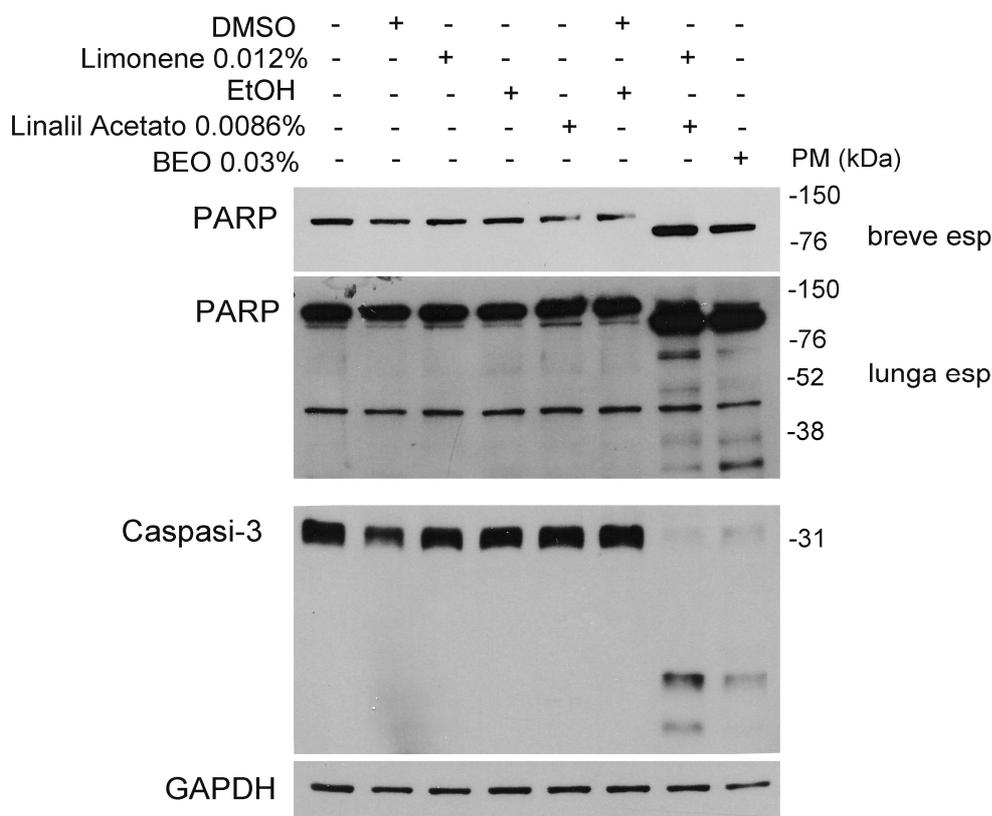


Fig. 19 Modulazione dei marker apoptotici in colture SH-SY5Y trattate per 1h con limonene e linalil acetato, dati da soli o in combinazione.

Le cellule sono state incubate con il solo mezzo di coltura oppure con mezzo contenente limonene e/o al linalil acetato (alle concentrazioni con cui essi sono presenti nel BEO 0,03%), oppure con mezzo contenente i veicoli corrispondenti. Dopo 1h di incubazione, gli estratti proteici sono stati analizzati mediante Western blot per la presenza di frammenti attivi della caspasi 3 di 19 e 17 KDa, PARP (116 KDa) e del suo prodotto di clivaggio di 89 KDa. GAPDH è stato usato come controllo interno. PM, peso molecolare. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. L'esposizione combinata, ma non singola, al limonene e al linalil acetato attiva la caspasi-3 nelle cellule SH-SY5Y, come confermato dalla presenza del frammento di clivaggio di PARP di 89 KDa. Incrementando il tempo di esposizione della lastra fotografica, nelle cellule trattate con la miscela dei due componenti vengono osservati anche una serie di frammenti addizionali derivanti dal clivaggio di PARP.

5.2 Il limonene e il linalil acetato, da soli e in associazione, agiscono da induttori dell'autofagia, riproducendo gli effetti prodotti dal BEO.

Una volta stabilita la capacità del limonene e del linalil acetato di modulare i *marker* dell'autofagia, al fine di valutare se, come per il fitocomplesso, l'accumulo di LC3-II prodotto dalle due sostanze fosse dovuto ad un'induzione piuttosto che ad un blocco dell'autofagia, è stato studiato il *turnover* di LC3 in presenza di Bafilomicina A1.

Il pre-trattamento di 2h delle SH-SY5Y con Bafilomicina A1 (100 nM), seguito dal trattamento di 1h con limonene e linalil acetato, usati da soli o in associazione, produce un accumulo di LC3-II maggiore rispetto a quello prodotto dal trattamento con la sola Bafilomicina, suggerendo che sia il limonene che il linalil acetato agiscono, come il BEO, da induttori dell'autofagia, indicando che si tratta dei componenti responsabili dell'effetto del fitocomplesso sul processo autofagico.

Inoltre, come per il BEO, il trattamento delle SH-SY5Y con limonene e/o linalil acetato riduce l'accumulo di p62 prodotto dal trattamento con la sola Bafilomicina (fig. 17).

DISCUSSIONE

1. Discussione

Nel corso del presente studio è stato valutato il coinvolgimento della *pathway* autofagica negli effetti biologici prodotti dall'olio essenziale di bergamotto (BEO), un fitocomplesso dalle documentate proprietà farmacologiche, largamente impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica, cosmetica e in aromaterapia (si veda: *Bagetta et al., 2010*).

I dati ottenuti hanno permesso di documentare che il BEO, *in vitro*, induce modificazioni a carico del processo autofagico basale.

In colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, in seguito all'esposizione al BEO si osserva un accumulo concentrazione-dipendente di LC3-II e la sua redistribuzione in strutture sferiche perinucleari, verosimilmente autofagosomi. Questo effetto prodotto dal fitocomplesso è molto precoce e l'accumulo della forma lipidata di LC3 può essere osservato già dopo soli 5 minuti di esposizione.

Lo studio del *turnover* di LC3 in presenza/assenza di degradazione lisosomiale ha permesso di dimostrare che l'accumulo di LC3-II indotto dal BEO non deriva da un blocco del processo autofagico, ma piuttosto dall'induzione dello stesso mediata dal fitocomplesso. Infatti, un maggiore accumulo di LC3-II è stato osservato nelle colture cellulari esposte al BEO in seguito al pre-trattamento con Bafilomicina A1 o Cloroquina, due inibitori dell'autofagia che agiscono incrementando il pH lisosomiale, il primo inibendo la H⁺-ATPasi vacuolare (*Yamamoto et al., 1998*), il secondo agendo come sostanza lisosomotropica (*De Duve, 1974; Seglen, 1983*).

Quella indotta dal BEO è un'autofagia funzionale per la cellula, non abortiva, in quanto il processo autofagico si completa e avviene la fusione tra autofagosomi e lisosomi, come

indicato dalla colocalizzazione di LC3 con LAMP-I, un *maker* degli endosomi/lisosomi tardivi (Eskelinen, 2006; Ignoul et al., 2007). Quest'aspetto è di cruciale importanza, perché un'autofagia incompleta potrebbe portare all'accumulo di autofagosomi e contribuire a varie disfunzioni, al contrario, un processo autofagico completo eserciterà generalmente effetti citoprotettivi (Klionsky et al., 2007).

L'accumulo di LC3-II nelle cellule esposte al BEO è accompagnato dalla concomitante riduzione dei livelli di p62. Anche questo dato conferma che il processo autofagico è capace di andare a compimento. Infatti, com'è noto, la proteina p62 può legare LC3, essere inglobata negli autofagosomi ed essere degradata insieme al resto del carico nei lisosomi (Ichimura & Komatsu, 2010). Pertanto, il trattamento con il BEO riduce i livelli di p62 poiché, inducendo l'autofagia, incrementa la sua degradazione attraverso questa via catabolica. Bisogna comunque osservare che, sebbene l'accumulo di LC3-II nelle colture di neuroblastoma sia molto precoce, la riduzione di p62 inizia ad essere apprezzata in una fase più tardiva. Questo probabilmente perché, in un primo momento, il flusso autofagico non si è ancora completato e non è avvenuta la fusione degli autofagosomi con i lisosomi, necessaria per la degradazione della proteina p62 in essi sequestrata. A tal proposito, sono stati documentati in letteratura altri casi in cui non si osservano cambiamenti rilevanti nei livelli di p62 dopo 30 minuti dall'induzione dell'autofagia, sebbene un significativo aumento dei livelli di LC3-II possa essere rilevato allo stesso tempo (Mizushima et al., 2007).

L'induzione dell'autofagia nelle colture esposte al BEO è stata riscontrata in diverse linee cellulari, suggerendo che l'effetto del fitocomplesso non è strettamente dipendente dal tipo di cellula. Infatti, oltre che nelle SH-SY5Y, l'accumulo di LC3-II è stato osservato anche in colture di cellule ganglionari retiniche di ratto, RGC-5, e di fibroblasti umani non tumorali,

Hs 605.Sk. In queste linee cellulari, i livelli di p62 si riducono più lentamente rispetto a quanto avviene nelle cellule di neuroblastoma, ma questo potrebbe dipendere da una più lenta cinetica del processo autofagico che, come è documentato, può variare dipendentemente dal tipo di cellula (si veda: *Klionsky et al., 2008*).

La modulazione dei *marker* autofagici nelle colture esposte al BEO viene osservata sia nelle cellule coltivate in condizioni normali che in quelle in cui l'autofagia è indotta mediante deprivazione di nutrienti. In particolare, nelle colture RGC-5 sottoposte a *starvation* si osserva un accumulo di LC3-II maggiore rispetto a quello osservato in condizioni normali, a causa di un effetto additivo tra l'azione del BEO e l'induzione dell'autofagia prodotta dalla deprivazione di nutrienti. Questo effetto viene apprezzato meno nelle SH-SY5Y esposte al BEO 0,03%, probabilmente poiché in questa linea cellulare, che è più sensibile delle RGC-5 all'azione del BEO, questa concentrazione del fitocomplesso, unitamente alla condizione di *starvation*, potrebbe determinare un'induzione dell'autofagia talmente marcata da "esaurire" il *pool* di LC3 presente all'interno della cellula (e quindi coniugabile con la fosfatidiletanolamina per generare la forma LC3-II).

I dati ottenuti suggeriscono che il BEO induce l'autofagia attraverso un meccanismo indipendente dalla via di mTOR. Infatti, gli effetti del fitocomplesso sul processo autofagico continuano ad essere osservati anche quando mTOR viene inibito farmacologicamente con Rapamicina, un potente induttore dell'autofagia che agisce impedendo l'assemblaggio del complesso proteico mTORC1 (*Bové et al., 2011*).

Dagli esperimenti di silenziamento genico è risultato che l'induzione dell'autofagia prodotta dal BEO è indipendente anche da Beclin 1, dato che la modulazione dei *marker* autofagici nelle cellule esposte al fitocomplesso continua ad essere osservata in seguito al

knockdown di questa proteina. In letteratura sono stati documentati diversi esempi di autofagia Beclin1-indipendente, infatti, sebbene Beclin 1 giochi un ruolo importante nella fase iniziale del processo autofagico, il complesso Beclin 1/Vps34 non è sempre richiesto per la nucleazione delle vescicole (Arsov *et al.*, 2011; Kovacs *et al.*, 2011). In particolare, anche per le colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y è già stato documentato un caso di autofagia indipendente dalla *pathway* PI3K/Beclin1 e indotta dall'MPP⁺ (ione 1-metil-4-fenilpiridonio) (Chu *et al.*, 2007).

Interessante è stato valutare il coinvolgimento della modulazione dell'autofagia negli effetti tossici prodotti dal BEO *in vitro*. In particolare, l'analisi della vitalità cellulare delle colture SH-SY5Y ha confermato gli effetti citotossici esercitati dal BEO in questa linea cellulare, precedentemente documentati in letteratura (Berliocchi *et al.*, 2011). Inoltre, è stato riscontrato un effetto tossico del BEO anche nelle colture RGC-5 e Hs 605.Sk. Tuttavia, la modulazione dei *marker* dell'autofagia nelle cellule esposte al BEO viene osservata in una fase più precoce rispetto agli effetti citotossici del fitocomplesso, che iniziano ad essere visibili solo dopo 1h di trattamento, suggerendo che la vacuolizzazione autofagica precede temporalmente la morte cellulare indotta dal BEO e non ne è, invece, una mera conseguenza. Inoltre, è stato particolarmente interessante osservare che, in tutte le linee cellulari esaminate, il BEO induce l'autofagia anche a concentrazioni che non producono tossicità.

Nel complesso, i dati ottenuti permettono di dimostrare che l'autofagia indotta dal BEO non contribuisce alla citotossicità del fitocomplesso, ma piuttosto sembra essere una risposta adattativa di sopravvivenza. Infatti, il blocco farmacologico della via autofagica con Bafilomicina A1 o Cloroquina incrementa la sensibilità delle cellule all'azione tossica

del BEO e, in questa condizione sperimentale, si osserva un'ulteriore riduzione della vitalità cellulare per aumento del numero di cellule necrotiche. Quest'ultimo dato potrebbe essere spiegato sulla base del fatto che, bloccando la *pathway* autofagica, viene ridotta la capacità della cellula di produrre ATP, che nelle cellule esposte al BEO potrebbe essere già intaccata, alla luce della capacità del fitocomplesso di causare danno a carico dei mitocondri. Infatti, come riportato in precedenza, nelle colture SH-SY5Y le concentrazioni tossiche di BEO causano alterazioni della morfologia mitocondriale e caduta del potenziale transmembrana ($\Delta\Psi_m$) (Berliocchi et al., 2011).

L'attivazione di processi necrotici nelle cellule esposte al BEO potrebbe anche spiegare il clivaggio di Beclin 1 che si osserva nelle colture RGC-5 esposte a concentrazioni tossiche del fitocomplesso. Infatti, come documentato sia *in vitro* (Wirawan et al., 2010) che *in vivo* (Russo et al., 2011), la comparsa del frammento di Beclin 1 del peso molecolare apparente di 50 KDa è stata associata all'attivazione delle calpaine, enzimi attivati da un aumento del Ca^{2+} intracellulare e durante la necrosi (Wang, 2000). Nelle colture sottoposte a deprivazione di nutrienti, il clivaggio di Beclin 1 è più marcato e si osserva anche a concentrazioni inferiori, suggerendo che la *starvation* aumenta la sensibilità delle cellule agli effetti tossici del BEO. Questo fenomeno potrebbe dipendere da un effetto additivo tra l'induzione dell'autofagia prodotta dal BEO e l'induzione prodotta dalla deprivazione di nutrienti, tale da determinare un'attivazione eccessiva della via autofagica che, com'è noto, può essere deleteria per la cellula (Kuma et al., 2004; Komatsu et al., 2007a). Inoltre, l'esposizione a concentrazioni tossiche di BEO aumenta in maniera significativa anche il numero di cellule apoptotiche, pertanto, non è da escludere che il clivaggio di Beclin 1 possa dipendere anche dal *cross-talk* esistente tra autofagia e apoptosi (Maiuri et al., 2007; Gordy & He, 2012) e per il

quale è stato documentato il clivaggio caspasi- e calpaine-mediato di proteine autofagiche (Gordy and He, 2012).

Un dato inatteso riscontrato durante lo studio degli effetti prodotti dal BEO sulla *patwhay* autofagica è stato osservare riduzione dei livelli di p62 anche nella condizione sperimentale in cui l'autofagia è stata bloccata. Questa evidenza suggerisce che nelle cellule esposte al fitocomplesso siano attivi anche altri processi degradativi. Infatti, dai dati ottenuti è emerso che il BEO, oltre ad indurre l'autofagia, aumenta anche l'attività del sistema ubiquitina-proteosoma. Bloccando contemporaneamente sia l'autofagia che l'attività dell'UPS, l'esposizione al BEO non è più associata ad una riduzione dei livelli di p62, suggerendo che p62 viene degradata in parte attraverso l'autofagia, in parte attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma. Come è noto, infatti, p62, oltre che essere un substrato autofagico, può anche legare l'ubiquitina ed essere degradata nell'UPS (Bardag-Gorce et al., 2005). L'attività del proteosoma è anche evidente dalla riduzione concentrazione-dipendente dei livelli totali di proteine poli-ubiquitinate che si osserva nelle colture esposte al BEO.

Non sorprende, tuttavia, che il trattamento con il BEO possa indurre alterazioni sia a carico del sistema autofagico che dell'UPS, soprattutto alla luce delle recenti evidenze sperimentali circa l'esistenza di un'interrelazione tra queste due vie degradative (Korolchuk et al., 2010). In alcune condizioni, infatti, i substrati ubiquitinati, normalmente degradati dal proteosoma, possono essere digeriti anche mediante autofagia, e viceversa (Fuertes et al., 2003a; Fuertes et al., 2003 b; Wooten et al., 2008). In aggiunta, il danneggiamento dell'attività del proteosoma porta ad un incremento dell'attività dell'autofagia, che può essere considerata un meccanismo compensatorio che permette alla cellula di ridurre i livelli dei substrati dell'UPS (Ding et al., 2007).

Tutti i dati fin qui raccolti permettono di supporre che, in quanto potente induttore dell'autofagia, il BEO potrebbe rivelarsi un utile *tool* farmacologico per il controllo e lo studio del processo autofagico, anche in virtù della sua rapidità d'azione. Ad oggi, infatti, la nostra conoscenza non documenta altre sostanze naturali o di sintesi capaci di indurre l'autofagia in tempi così brevi, così come osservato per il BEO. Inoltre, poiché il BEO agisce attraverso un meccanismo mTOR-indipendente, il suo uso permetterebbe di ridurre i problemi sperimentali legati all'inibizione farmacologica di mTOR. Infatti, oltre ad avere un ruolo centrale nell'autofagia, mTOR interviene in molte altre vie di trasduzione del segnale (Zoncu et al., 2011; Magnuson et al., 2012) e bloccarlo significa alterare profondamente gli equilibri omeostatici della cellula, rendendo artificioso e difficile lo studio biochimico della via autofagica. La disponibilità, invece, di *tool* farmacologici capaci di agire a valle di mTOR consentirebbe una modulazione più selettiva della *pathway*, facilitando la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nel processo autofagico.

Poiché quella indotta dal BEO è un'autofagia completa, funzionale, questo fitocomplesso potrebbe rivelarsi utile anche per la manipolazione farmacologica dell'autofagia a scopo terapeutico. Ad esempio, il BEO potrebbe trovare applicazione per la cura di patologie neurodegenerative associate all'accumulo intracellulare di proteine (come la malattia di Huntington, di Parkinson, di Alzheimer), in cui l'induzione dell'autofagia esercita generalmente un ruolo protettivo, grazie alla sua funzione degradativa che consente la *clearance* delle forme potenzialmente tossiche delle proteine patogene e dei loro aggregati (si veda: Harris & Rubinsztein, 2012). Inoltre, poiché nelle malattie neurodegenerative la via autofagica è spesso compromessa, l'utilità del BEO nella cura di queste patologie potrebbe essere avvalorata dall'abilità del fitocomplesso di aumentare anche l'attività dell'UPS e

quindi di incrementare le capacità degradative globali della cellula. In aggiunta, l'uso del BEO per la cura di disordini neurodegenerativi potrebbe beneficiare anche delle proprietà neuroprotettive del fitocomplesso, documentate sia *in vivo* (Amantea et al., 2005; Amantea et al., 2009) che *in vitro* (Corasaniti et al., 2007), per le stesse concentrazioni con cui esso modula la *pathway* autofagica.

Il BEO potrebbe rivelarsi un utile strumento terapeutico anche in campo oncologico, dato che diversi studi preclinici confermano l'utilità di induttori dell'autofagia per la terapia dei tumori (Yang et al., 2011a, 2011b). È interessante, inoltre, la recente scoperta secondo la quale alcuni fitocomposti della dieta, inclusi quercetina, apigenina, genisteina, hesperetina e luteolina, sono capaci di indurre l'autofagia sia nelle cellule normali che in vari tipi di cellule tumorali (Singletary and Milner, 2008; Hanningan and Gorski, 2009) e a questo loro meccanismo d'azione potrebbe essere ascritta la loro efficacia nella prevenzione/terapia del cancro (Choi, 2012). Un indubbio vantaggio nell'applicazione del BEO in ambito oncologico potrebbe derivare dal suo meccanismo d'azione Beclin1-indipendente, poiché Beclin 1 è stato trovato monoallelicamente deletato nel 40-74% delle forme sporadiche di cancro umano alla mammella, alle ovaie e alla prostata (Liang et al., 1999); pertanto, in queste forme tumorali, la modulazione del processo autofagico a scopo terapeutico non potrebbe avvenire attraverso la canonica via PI3K/Beclin 1, ma richiederebbe l'utilizzo di composti con un meccanismo d'azione alternativo.

Tuttavia, l'intervallo tra le concentrazioni citotossiche di BEO e quelle non tossiche è estremamente ristretto, evidenza che potrebbe essere attribuita all'elevato numero di costituenti presenti nel fitocomplesso, i cui *target* cellulari non sono ad oggi completamente noti. Questo aspetto dell'olio essenziale, comportando un basso indice terapeutico,

limiterebbe notevolmente il suo utilizzo in ambito clinico, ma tale problema può essere superato dall'uso dei singoli costituenti del fitocomplesso che sono responsabili dell'induzione dell'autofagia nelle cellule esposte al BEO.

Dagli esperimenti condotti con i singoli principi attivi è stato possibile identificare nel limonene e nel linalil acetato i due componenti principalmente responsabili dell'effetto del BEO sulla modulazione della *pathway* autofagica. Infatti, sia il limonene che il linalil acetato modulano in maniera concentrazione-dipendente i *marker* dell'autofagia nelle colture SH-SY5Y, inducendo accumulo di LC3-II e riduzione di p62, con effetto additivo quando vengono usati in combinazione.

In aggiunta, come il BEO, anche limonene e linalil acetato, sia da soli che in associazione, inducono modificazioni a carico del processo autofagico basale anche a concentrazioni che non producono tossicità, come confermato anche dalla mancata attivazione della caspasi 3.

Sia il limonene che il linalil acetato sono due composti chimici ritenuti sicuri per l'uomo, con una bassa tossicità, come dimostrato da numerosi studi clinici (si veda: *Letizia, 2003; Sun, 2007*). Inoltre, entrambi questi composti sono stati approvati dall'FDA come GRAS (*Generally Recognized As Safe*), per il loro uso come agenti aromatizzanti.

Bisogna aggiungere che, nel corso degli anni, sia per il limonene che per il linalil acetato è stata documentata un'attività chemiopreventiva nei confronti di vari tipi di cancro (*Elson et al., 1988; Maltzman et al., 1989; Haag et al., 1992; Itani, 2008*). In particolare, nel 1998 venne pubblicato uno studio clinico farmacocinetico e di fase I riguardante il trattamento con d-limonene di 32 pazienti affetti da cancro in stadio avanzato. I risultati ottenuti documentarono in molti casi una risposta benefica del paziente, con stabilizzazione e arresto della progressione della malattia, mantenuta anche per diversi mesi (*Vigushin et al.,*

1998). Al limonene è stata attribuita, inoltre, la capacità di modulare la risposta immunitaria (Del Toro Arreola et al., 2005).

Queste conoscenze, alla luce della nuova scoperta del limonene e del linalil acetato quali induttori dell'autofagia, e data la stretta interrelazione tra autofagia e cancro/risposta immune, in futuro potrebbero portare ad una reinterpretazione dei meccanismi attraverso cui questi due fitocomposti esercitano la loro azione biologica.

Ulteriori studi potranno caratterizzare meglio i meccanismi molecolari alla base dell'induzione dell'autofagia nelle cellule esposte al BEO o ai suoi principi attivi, ma alla luce delle evidenze sperimentali raccolte è possibile ipotizzare che il BEO agisca più a valle di Beclin 1 e di mTOR nella *pathway* autofagica. A tal proposito, recentemente è stata identificata una nuova via autofagica “non canonica”, indipendente sia da Atg5 che da Atg7 (Nishida et al., 2009), e non è da escludere che il BEO possa agire anch'esso a questo livello. Inoltre, data la rapidità dell'effetto osservato, potrebbe essere plausibile un'azione diretta su un canale ionico. È noto, infatti, che i flussi ionici possono indurre modificazioni a carico del processo autofagico, come è stato ampiamente documentato, ad esempio, per lo ione Ca^{2+} (Decuypere et al., 2011). E ancora, data la lipofilia dei componenti del BEO, è possibile ipotizzare anche un'eventuale azione del fitocomplesso e dei suoi principi attivi sulle membrane biologiche.

Questi ultimi ipotetici meccanismi d'azione proposti potrebbero essere coerenti anche con la capacità del BEO di modulare la trasmissione sinaptica (Morrone et al., 2007) e di esplicitare un'azione antinocicettiva in modelli animali di dolore (si veda: Bagetta et al., 2010).

In un recente *screening* della *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense sono stati identificati 14 induttori dell'autofagia che agiscono attraverso *pathway* indipendenti da

mTOR (*Williams et al., 2008*). Questi composti sembrano agire su una varietà di *target* farmacologici, includendo agonisti dei recettori imidazolinici, antagonisti dei canali al calcio di tipo L e calpaine. Tuttavia, è stato dimostrato che queste sostanze sono collegate in una potenziale via ciclica tramite le *pathway* cAMP-Epac-PLC- ϵ -IP₃ e Ca²⁺-calpaina-G_{sa}. L'inibizione di varie componenti di queste vie determina induzione dell'autofagia, sebbene il meccanismo preciso attraverso cui i livelli di cAMP, calpaine, inositolo o IP3 controllino l'autofagia non sia stato ancora elucidato (*Fleming et al., 2011*). Anche il BEO, agendo con un meccanismo mTOR-indipendente, potrebbe interferire con una di queste vie per indurre il processo autofagico.

2. Conclusioni

Il presente lavoro ha permesso di documentare che il BEO induce l'autofagia in diverse linee cellulari, tumorali e non, con un meccanismo d'azione che sembra essere indipendente sia da Beclin 1 che dalla via di mTOR.

Oltre all'attivazione della *pathway* autofagica, il BEO induce anche un aumento dell'attività del proteosoma e, quindi, della capacità degradativa globale della cellula.

Come documentato, quella indotta dal BEO è un'autofagia funzionale, non abortiva, che si conclude con la degradazione degli autofagosomi e che non contribuisce alla citotossicità del fitocomplesso, ma esercita un ruolo citoprotettivo.

Lo studio condotto ha permesso, inoltre, di identificare nel limonene e nel linalil acetato i due principali responsabili della modulazione della *pathway* autofagica nelle cellule esposte al BEO.

Alla luce dei dati raccolti, le prospettive future in questo ambito di ricerca sembrano essere promettenti. Altri esperimenti potranno approfondire e caratterizzare meglio il profilo farmacologico del limonene e del linalil acetato, che potrebbero rivelarsi degli utili strumenti di ricerca, sia come *tool* farmacologici per lo studio del processo autofagico, sia come potenziali agenti terapeutici per il trattamento di tutte quelle condizioni patologiche (inclusi malattie neurodegenerative e cancro) in cui l'induzione dell'autofagia può risultare benefica.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- AIKIN R, ROSENBERG L, PARASKEVAS S, AND MAYSINGER D. (2004) Inhibition of caspase-mediated PARP-1 cleavage results in increased necrosis in isolated islets of Langerhans. *J Mol Med*; **82**: 389-397.
- AMANTEA D, FRATTO V, MAIDA S, ROTIROTI D, RAGUSA S, NAPPI G, BAGETTA G, CORASANITI M.T. (2009) Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol*; **85**:389–405.
- AMANTEA D, RUSSO R, BAGETTA G, CORASANITI MT. (2005) From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*; **52**:119–32.
- ARICO S, PETIOT A, BAUVY C, DUBBELHUIS PF, MEIJER AJ, CODOGNO P, OGIER-DENIS E. (2001) The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*; **276**:35243–35246.
- ARSOV I, ADEBAYO A, KUCEROVA-LEVISOHN M, HAYE J, MACNEIL M, PAPAVALIIOU FN, YUE Z, ORTIZ BD. (2011). A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development. *J Immunol*; **186**, 2201–2209.
- ASHFORD TP, PORTER KR. (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol*; **12**: 198–202.
- ATLASHKIN V, KREYKENBOHM V, ESKELINEN EL, WENZEL D, FAYYAZI A, FISCHER VON MOLLARD G. (2003) Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol*; **23**:5198–5207.
- ATTWELL D, BARBOUR B, SZATKOWSKI M. (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*; **11**:401–7.
- BAGETTA G, MORRONE LA, ROMBOLÀ L, AMANTEA D, RUSSO R, BERLIOCCHI L, SAKURADA S, SAKURADA T, ROTIROTI D, CORASANITI MT. (2010) Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*. **81**:453-61. Review.
- BAILEY DAVID G, MALCOLM J, ARNOLD O, SPENCE J DAVID (1998). "Grapefruit juice–drug interactions". *Br J Clin Pharmacol*; **46 (2)**: 101–110.
- BARDAG-GORCE F, FRANCIS T, NAN L, LI J, HE LUE Y, FRENCH BA, FRENCH SW. (2005) Modifications in p62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci*; **77**:2594-602.

- BARTKOWIAK D, HOGNER S, BAUST H, NOTHDURFT W, AND ROTTINGER E M. (1999) Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. *Cytometry*; **37**: 191-196.
- BERG TO, FENGSRUUD M, STROMHAUG PE, BERG T, SEGLEN PO. (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*; **273**:21883–21892.
- BERLIOCCHI L, RUSSO R, LEVATO A, FRATTO V, BAGETTA G, SAKURADA S., SAKURADA T, MERCURI NB, CORASANITI MT. (2009) (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in C57/BL6 mice. *Int Rev Neurobiol*; **85**:221–35.
- BERLIOCCHI L, CIOCIARO A, RUSSO R, CASSIANO MG, BLANDINI F, ROTIROTI D, MORRONE LA, CORASANITI MT. (2011) Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Food Chem Toxicol*; **49(11)**:2780-92.
- BIEDLER JL, HELSON L, SPENGLER BA. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*; **33**:2643-52.
- BISIGNANO G, MARINO A, REALE H, FURNERI M P, DUGO P. (2003). Attività antimicoplasmatica in vitro dell'essenza del bergamotto. In: "BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive". Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria; pp. 183-184.
- BOVÉ J, MARTÍNEZ-VICENTE M, VILA M. (2011) Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*; **12(8)**:437-52.
- BRAZIL DP, HEMMINGS BA. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*; **26**:657–64.
- BROOKER DJ, SNAPE M, JOHNSON E, WARD D, PAYNE M. (1997) Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. *Br J Clin Psychol*; **36**:287-96.
- BRUM LF, ELISABETSKY E, SOUZA D. (2001) Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother Res*; **15**:422-5.
- BUCHBAUER G, JIROVETZ L, JAGER W, DIETRICH H, PLANK C. (1991) Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch*; **46**:1067-1072.
- BUDOVSKAYA YV, STEPHAN JS, DEMINOFF SJ, HERMAN PK. (2005) An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*; **102**:13933–38.

- BUDOVSKAYA YV, STEPHAN JS, REGGIORI F, KLIONSKY DJ, HERMAN PK. (2004) The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; **279**:20663–20671.
- BYFIELD MP, MURRAY JT, BACKER JM. (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*; **280**:33076–82.
- CAPASSO F, DE PASQUALE R, GRANDOLINI G, MASCOLO N. (2000) Farmacognosia. Farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. Springer-Verlag, Milano.
- CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, SALVESEN GS, FRANKE TF, STANBRIDGE E, FRISCH S, REED JC. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*; **282**:1318–21.
- CARRERA AC. (2004) TOR signaling in mammals. *J Cell Sci*; **117**:4615–4616.
- CECCONI F, DI BARTOLOMEO S, NARDACCI R, FUOCO C, CORAZZARI M, GIUNTA L, ROMAGNOLI A, STOYKOVA A, CHOWDHURY K, FIMIA GM, PIACENTINI M (2007) A novel role for autophagy in neurodevelopment. *Autophagy*; **3(5)**:506-8.
- CHANDER SK, LANSDOWN AG, LUQMANI YA, GOMM JJ, COOPE RC, GOULD N, COOMBES RC. (1994) Effectiveness of combined limonene and 4-hydroxyandrostenedione in the treatment of NMU-induced rat mammary tumours. *Br J Cancer*; **69(5)**:879-82.
- CHEN N, KARANTZA-WADSWORTH V. (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta*; **1793**:1516-23.
- CHENG HC, KIM SR, OO TF, KAREVA T, YARYGINA O, RZHETSKAYA M, WANG C, DURING M, TALLOCZY Z, TANAKA K, KOMATSU M, KOBAYASHI K, OKANO H, KHOLODILOV N, BURKE RE. (2011) Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *J Neurosci*; **31(6)**:2125-35.
- CHERNG JM, SHIEH DE, CHIANG W, CHANG MY, CHIANG LC. (2007) Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*; **71(6)**:1500-4.
- CHOI KS. (2012) Autophagy and cancer. *Exp Mol Med*; **44(2)**:109-20.
- CHU CT, ZHU J, DAGDA R. (2007) Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy*; **3(6)**:663-6.
- CLARK SL JR. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol*; **3**: 349–362.
- CORASANITI MT, MAIUOLO J, MAIDA S, FRATTO V, NAVARRA M, RUSSO R, AMANTEA D, MORRONE LA, BAGETTA G. (2007) Cell signaling pathways in the

- mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br J Pharmacol*; **151**:518–29.
- CRISPO F, DUGO G. (2003) Il bergamotto: coltivazione, tecnologie di estrazione, aspetti storici, economici, e legislativi. In: “BERGAMOTTO 98-Stato dell’arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria; pp.163-178.
- CROWELL PL, CHANG RR, REN ZB, ELSON CE, GOULD MN. (1991) Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chem*; **266**(26):17679-85.
- CROWELL PL, REN Z, LIN S, VEDEJS E, GOULD MN. (1994) Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol*; **47**:1405-15.
- CUERVO AM, PALMER A, RIVETT AJ, KNECHT E. (1995) Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur J Biochem*; **227**(3):792-800.
- CUERVO AM. (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*; 14:70-7.
- DARSOW T, RIEDER SE, EMR SD. (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J Cell Biol*; **138**:517–529.
- DARZYNKIEWICZ Z, BRUNO S, DEL BINO G, GORCZYCA W, HOTZ M A, LASSOTA P, TRAGANOS F. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*; **13**:795-808.
- DARZYNKIEWICZ Z, JUAN G, LI X, GORCZYCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F.(1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*; **27**:1-20.
- DE DUVE C, DE BARSY T, POOLE B, TROUET A, TULKENS P, VAN HOOFF F. (1974) Commentary: Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol*; **23**:2495-531.
- DE MASI A. (2003) Riscoperta di un manufatto: dal bergamotto una tabacchiera. In “BERGAMOTTO 98-Stato dell’arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria; pp. 239-240.
- DECUYPERE JP, BULTYNCK G, PARYS JB. (2011) A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation. *Cell Calcium*; **50**(3):242-50.
- DEL TORO-ARREOLA S, FLORES-TORALES E, TORRES-LOZANO C, DEL TORO-ARREOLA A, TOSTADO-PELAYO K, GUADALUPE RAMIREZ-DUEÑAS M, DANERI-

- NAVARRO A. (2005) Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int Immunopharmacol*; **5**:829-838.
- DI BARTOLOMEO S, CORAZZARI M, NAZIO F, OLIVERIO S, LISI G, ANTONIOLI M, PAGLIARINI V, MATTEONI S, FUOCO C, GIUNTA L, D'AMELIO M, NARDACCI R, ROMAGNOLI A, PIACENTINI M, CECCONI F, FIMIA GM. (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*; **191**(1):155-68.
- DING WX, NI HM, GAO W, YOSHIMORI T, STOLZ DB, RON D, YIN XM (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*; **171**:513-524.
- DIVE C, GREGORY CD, PHIPPS DJ, EVANS DL, MILNER AE, WYLLIE AH, (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*; **1133**: 275-285.
- DUGO P, MONDELLO L, DUGO L, STANCANELLI R, DUGO G. (2000) LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J Pharm Biomed Anal*. **24**:147-54.
- DUNN WA JR, CREGG JM, KIEL JA, VAN DER KLEI IJ, OKU M, SAKAI Y, SIBIRNY AA, STASYK OV, VEENHUIS M. (2005) Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy*; **1**(2):75-83.
- DURING T, GERST F, HANSEL W, WULFF H, KOPPENHOFER E. (2000) Effects of three alkoxy-psoralens on voltage gated ion channels in Ranvier nodes. *Gen. Physiol. Biophys.* **19**: 345-364.
- EISENBERG-LERNER A, BIALIK S, SIMON HU, KIMCHI A. (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*; **16**:966-75.
- ELBASHIR S, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*; **411**(6836): 494-988.
- ELISABETSKY E., BRUM L.F., SOUZA D.O. (1999) Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*; **6**:107-13.
- ELSON CE, MALTZMANN TH, BOSTON JL, TANNER MA, GOULD MN. (1988). Anticarcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DAMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*; **9**:331-332.
- EPPLE UD, SURIAPRANATA I, ESKELINEN EL, THUMM M. (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol*; **183**:5942-5955.

- ESKELIN EL. (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*; **27(5-6)**: 495-502. Review.
- FASS E, SHVETS E, DEGANI I, HIRSCHBERG K, ELAZAR Z. (2006) Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem*; **281**: 36303–36316.
- FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84(21)**:7413-7.
- FENGSRUD M, LUNDE SNEVE M, ØVERBYE A, SEGLEN PO. (2004) In *Autophagy* (ed. Klionsky, D. J.). Landes Bioscience, Texas; 11–25.
- FERRELL-TORRY AT, GLICK OJ. (1993) The use of therapeutic massage as a nursing intervention to modify anxiety and the perception of cancer pain. *Cancer Nurs*; **16**:93–101.
- FIMIA GM, STOYKOVA A, ROMAGNOLI A, GIUNTA L, DI BARTOLOMEO S, NARDACCI R, CORAZZARI M, FUOCO C, UCAR A, SCHWARTZ P, GRUSS P, PIACENTINI M, CHOWDHURY K,CECCONI F. (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*; **447(7148)**:1121-5.
- FINSTERER J. (2002) Earl Grey tea intoxication. *Lancet*; 359-1484.
- FISCHER VON MOLLARD G, STEVENS TH. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol Biol Cell*; **10**:1719–1732.
- FISHER K, PHILIPS CA. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*; **101**:1232-1240.
- FISHER K, ROWE C, PHILLIPS CA. (2007) The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. *Lett Appl Microbiol*; **44(5)**:495-9.
- FLEMING A, NODA T, YOSHIMORI T, RUBINSZTEIN DC. (2011) Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol*; **7(1)**:9-17. Review.
- FREY T. (1997) Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry* **28**:253-263.
- FUERTES G, MARTIN DE LLANO JJ, VILLARROYA A, RIVETT AJ, KNECHT E. (2003a) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts

- produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J*; **375**:75–86.
- FUERTES G, VILLARROYA A, KNECHT E. (2003b) Role of proteasomes in the Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol*; **35**:651–664.
- FUJITA N, HAYASHI-NISHINO M, FUKUMOTO H, OMORI H, YAMAMOTO A, NODA T, YOSHIMORI T (2008a) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell*; **19**:4651-4659.
- FUJITA N, ITOH T, OMORI H, FUKUDA M, NODA T, YOSHIMORI T (2008b) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*; **19**:2092-2100.
- FUKUNAGA K., KAWANO T. (2003) Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult. *J Pharmacol Sci*; **92**:317–27.
- FURNERI PM, MONDELLO L, MANDALARI G, PAOLINO D, DUGO P, GAROZZO A, BISIGNANO G. (2012) In vitro antimycoplasmal activity of Citrus bergamia essential oil and its major components. *Eur J Med Chem*; **52**:66-9.
- FURUTA S, HIDAKA E, OGATA A, YOKOTA S, KAMATA T. (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene*; **23**:3898–904.
- GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, DAWSON TM, DAWSON VL, EL-DEIRY WS, FULDA S, GOTTLIEB E, GREEN DR, HENGARTNER MO, KEPP O, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, LU X, MADEO F, MALORNI W, MEHLEN P, NUÑEZ G, PETER ME, PIACENTINI M, RUBINSZTEIN DC, SHI Y, SIMON HU, VANDENABEELE P, WHITE E, YUAN J, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G, KROEMER G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*; **19**(1):107-20.
- GANLEY IG, LAM DU H, WANG J, DING X, CHEN S, JIANG X (2009) ULK1_ATG13_FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*; **284**:12297-12305.
- GHELARDINI C, GALEOTTI N, SALVATORE G, MAZZANTI G. (1999) Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Med*; **65**:700-3.
- GIRI RK, PARIJA T, DAS BR. (1999) D-limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. *Oncol Rep*; **6**:1123-1127.

- GOBEIL S, BOUCHER CC, NADEAU D, POIRIER GG. (2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ*; **8**: 588-594.
- GOLDBERG AL. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*; **426(6968)**:895-9.
- GORDY C, HE YW. (2012) The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*; **3(1)**:17-27.
- GOZUACIK D, KIMCHI A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*; **23**:2891-906.
- GRIMES CA, JOPE RS. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*; **65**:391-426.
- GUTIERREZ MG, MUNAFO DB, BERON W, COLOMBO MI. (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*; **117 (13)**: 2687-2697.
- HAAG JD, LINDSTROM MJ, GOULD MN. (1992) Limonene-induced Regression of Mammary Carcinomas. *Cancer Research*; **52**: 4021-4026.
- HAMILTON A, BAULCOMBE D (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*; **286 (5441)**: 950-2.
- HANADA T, NODA NN, SATOMI Y, ICHIMURA Y, FUJIOKA Y, TAKAO T, INAGAKI F, OHSUMI Y (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*; **282**:37298-37302.
- HANNIGAN AM, GORSKI SM. (2009) Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet? *Autophagy*; **5**:140-51.
- HARA T, TAKAMURA A, KISHI C, IEMURA S-I, NATSUME T, GUAN J-L, MIZUSHIMA N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*; **181**:497-510.
- HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, YAMAMOTO A, NAKAHARA Y, SUZUKI-MIGISHIMA R, YOKOYAMA M, MISHIMA K, SAITO I, OKANO H, MIZUSHIMA N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*; **441(7095)**:885-9.
- HARDING TM, MORANO KA, SCOTT SV, KLIONSKY DJ (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*; **131**:591-602.

- HARRIS H, RUBINSZTEIN DC. (2011) Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*; **8(2)**:108-17.
- HE C, KLIONSKY DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*; **43**:67-93. Review.
- HEMELAAR J, LELYVELD VS, KESSLER BM, PLOEGH HL. (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*; **278**:51841–51850.
- HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, KISHI C, TAKAMURA A, MIURA Y, IEMURA S, NATSUME T, TAKEHANA K, YAMADA N, GUAN JL, OSHIRO N, MIZUSHIMA N. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*; **20**:1981-1991.
- HUANG J, KLIONSKY DJ. (2007) Autophagy and human disease. *Cell Cycle*; **6(15)**:1837-49.
- HUANG Q, WU YT, TAN HL, ONG CN, SHEN HM. (2009) A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress. *Cell Death Differ*; **16**:264–77.
- HUTCHINS MU, KLIONSKY DJ (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; **276**:20491-20498.
- HUTCHINS MU, VEENHUIS M, KLIONSKY DJ (1999) Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci*; **112 (22)**:4079-4087.
- ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, SATOMI Y, SHIMONISHI Y, ISHIHARA N, MIZUSHIMA N, TANIDA I, KOMINAMI E, OHSUMI M, NODA T, OHSUMI Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*; **408**:488–492.
- ICHIMURA Y, KOMATSU M (2010) Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*; **32(4)**:431-6. Review.
- IGIMI H, TAMURA R, TORAISHI K, YAMAMOTO F, KATAOKA A, IKEJIRI Y, HISATSUGU T, SHIMURA H. (1991) Medical dissolution of gallstones. Clinical experience of d-limonene as a simple, safe, and effective solvent; *Dig Dis Sci*; **36(2)**:200-8.
- IGNOUL S, SIMAELS J, HERMANS D, ANNAERT W, EGGERMONT J. (2007) Human CIC-6 is a late endosomal glycoprotein that associates with detergent-resistant lipid domains. *PLoS One*; **2(5)**:e474.
- ISHIHARA N, HAMASAKI M, YOKOTA S, SUZUKI K, KAMADA Y, KIHARA A, YOSHIMORI T, NODA T, OHSUMI Y. (2001) Autophagosome requires specific early

- Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol Biol Cell*; **12**:3690–3702.
- ITANI WS, EL-BANNA SH, HASSAN SB, LARSSON RL, BAZARBACHI A, GALIMUHTASIB HU.(2008).Anti colon cancer components from lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. *Cancer Biol Ther*; **7(11)**:1765-73.
- IWATA A, CHRISTIANSON JC, BUCCI M, ELLERBY LM, NUKINA N, FORNO LS, KOPITO RR. (2005) Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*; **102(37)**:13135-40.
- JACINTO E, HALL MN. (2003) Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **4**:117–126.
- JACINTO E, LOEWITH R, SCHMIDT A, LIN S, RÜEGG MA, HALL A, HALL MN. (2011) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*; **6(11)**:1122-8.
- JAGER S, BUCCI C, TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E, SAFTIG P, ESKELINEN EL. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*; **117**:4837–4848.
- JEFFRIES TR, DOVE SK, MICHELL RH, PARKER PJ. (2004) PtdIns-specific MPR pathway association of a novel WD40 repeat protein, WIPI49. *Mol Biol Cell*; **15**:2652–2663.
- JUNG CH, JUN CB, RO SH, KIM YM, OTTO NM, CAO J, KUNDU M, KIM DH (2009) ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*; **20**:1992-2003.
- KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*; **19**:5720–5728.
- KABEYA Y, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, OSHITANI-OKAMOTO S, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*; **117**:2805–2812.
- KAJI I, TATSUTA M, IISHI H, BABA M, INOUE A, KASUGAI H. (2001) Inhibition by d-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21(ras) plasma membrane association. *Int J Cancer*; **93**:441-444.
- KARLBERG A.-T., MAGNUSSON K., NILSSON U., (1992). Air oxidation of D-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. *Contact Dermatitis*; **26**: 332–340.
- KAWATA S, NAGASE T, YAMASAKI E, ISHIGURO H, MATSUZAWA Y. (1994) Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer*; **69**:1015-20.

- KEANE, T.E., PETROS, J.A., VELIMIROVICH, B., YUE, K.T. AND GRAHAM, S.D. (1994) Methoxypsoralen phototherapy of transitional cell carcinoma. *Urology*; **44**:842-846.
- KEGEL KB, KIM M, SAPP E, MCINTYRE C, CASTANO JG, ARONIN N, DIFIGLIA M. (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*; **20**:7268-78.
- KIJANSKA M, DOHNAL I, REITER W, KASPAR S, STOFFEL I, AMMERER G, KRAFT C, PETER M (2010) Activation of Atg1 kinase in autophagy by regulated phosphorylation. *Autophagy*; **6**:1168-1178.
- KIM E, GORAKSHA-HICKS P, LI L, NEUFELD TP, GUAN K-L. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*; **10**:935-45.
- KIM J, KLIONSKY DJ. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*; **69**:303-42.
- KIMURA S, NODA T, YOSHIMORI T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*; **33**:109-122.
- KIRISAKO T, BABA M, ISHIHARA N, MIYAZAWA K, OHSUMI M, YOSHIMORI T, NODA T, OHSUMI Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*; **147**:435-446.
- KIRISAKO T, ICHIMURA Y, OKADA H, KABEYA Y, MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI M, TAKAO T, NODA T, OHSUMI Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*; **151**:263-276.
- KIRKIN V, MCEWAN DG, NOVAK I, DIKIC I. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*; **34**(3):259-69.
- KLIONSKY DJ, ABELIOVICH H, AGOSTINIS P, AGRAWAL DK, ALIEV G, ASKEW DS, BABA M, BAEHRECKE EH, BAHR BA, BALLABIO A, BAMBER BA, BASSHAM DC, BERGAMINI E, BI X, BIARD-PIECHACZYK M, BLUM JS, BREDESEN DE, BRODSKY JL, BRUMELL JH, BRUNK UT, BURSCH W, CAMOUGRAND N, CEBOLLERO E, CECCONI F ET AL. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*; **4**(2):151-75.
- KLIONSKY DJ, CUERVO AM, SEGLEN PO. (2007) Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy*; **3**(3):181-206.
- KLIONSKY DJ, MEIJER AJ, CODOGNO P. (2005) Autophagy and p70S6 kinase. *Autophagy*; **1**:59-61.

- KLIONSKY DJ, CREGG JM, DUNN WA JR, EMR SD, SAKAI Y, SANDOVAL IV, SIBIRNY A, SUBRAMANI S, THUMM M, VEENHUIS M, OHSUMI Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*; **5**:539–545.
- KLIONSKY DJ. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*; **118**:7–18.
- KLIONSKY DJ. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **8**(11):931-7.
- KLIONSKY DJ, ABDALLA FC, ABELIOVICH H, ABRAHAM RT, ACEVEDO-ARZENA A, ADELI K, AGHOLME L, AGNELLO M, AGOSTINIS P, AGUIRRE-GHISO JA, AHN HJ, AIT-MOHAMED O, AIT-SI-ALI S, AKEMATSU T, AKIRA S, AL-YOUNES HM, AL-ZEER MA, ALBERT ML, ALBIN RL, ALEGRE-ABARRATEGUI J, ALEO MF, ALIREZAEI M, ALMASAN A, ALMONTE-BECERRIL M, AMANO A, AMARAVADI R, AMARNATH S, AMER AO, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*; **8**(4):445-544.
- KOMATSU M, UENO T, WAGURI S, UCHIYAMA Y, KOMINAMI E, TANAKA K. (2007a) Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ*; **14**:887–894.
- KOMATSU M, WAGURI S, CHIBA T, MURATA S, IWATA J, TANIDA I, UENO T, KOIKE M, UCHIYAMA Y, KOMINAMI E, TANAKA K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*; **441**(7095):880-4.
- KOROLCHUK VI, MENZIES FM, RUBINSZTEIN DC (2009) A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy*; **5**:862-863.
- KOROLCHUK VI, MENZIES FM, RUBINSZTEIN DC. (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett*; **584**(7):1393-8.
- KOTO R, IMAMURA M, WATANABE C, OBAYASHI S, SHIRAISHI M, SASAKI Y, AZUMA H. (2006) Linalyl acetate as a major ingredient of lavender essential oil relaxes the rabbit vascular smooth muscle through dephosphorylation of myosin light chain. *J Cardiovasc Pharmacol*, **48**:850-6.
- KOVACS JR, LI C, YANG Q, LI G, GARCIA IG, JU S, ROODMAN DG, WINDLE JJ, ZHANG X, LU B. (2011). Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell death and differentiation*; **19**(1):144-52.
- KRAFT C, DEPLAZES A, SOHRMANN M, PETER M (2008) Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol*; **10**:602-610.

- KRAFT C, MARTENS S. (2012) Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr Opin Cell Biol*; **24(4)**:496-501.
- KRISHNAMOORTHY RR, AGARWAL P, PRASANNA G, VOPAT K, LAMBERT W, SHEEDLO HJ, PANG IH, SHADE D, WORDINGER RJ, YORIO T, CLARK AF, AGARWAL N (2001) Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res*; **86**: 1–12.
- KROEMER G, LEVINE B. (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **9(12)**:1004-10.
- KUBOTA C, TORII S, HOU N, SAITO N, YOSHIMOTO Y, IMAI H, TAKEUCHI T. (2010) Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J Biol Chem*; **285(1)**:667-74.
- KUMA A, HATANO M, MATSUI M, YAMAMOTO A, NAKAYA H, YOSHIMORI T, OHSUMI Y, TOKUHISA T, MIZUSHIMA N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*; **432**:1032–1036.
- KUMA A, MIZUSHIMA N, ISHIHARA N, OHSUMI Y. (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem*; **277(21)**:18619-25.
- KUNDU M, LINDSTEN T, YANG CY, WU J, ZHAO F, ZHANG J, SELAK MA, NEY PA, THOMPSON CB (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*; **112**:1493-1502.
- KUZNETSOV SA, GELFAND VI. (1987) 18 kDa microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). *FEBS Lett*; **212**:145–148.
- LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*; **371**: 346-347.
- LEE DH, GOLDBERG AL. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*; **8(10)**:397-403.
- LEE JH, YU WH, KUMAR A, LEE S, MOHAN PS, PETERHOFF CM, WOLFE DM, MARTINEZ-VICENTE M, MASSEY AC, SOVAK G, UCHIYAMA Y, WESTAWAY D, CUERVO AM, NIXON RA. (2010a) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*; **141(7)**:1146-58.
- LEE JY, KOGA H, KAWAGUCHI Y, TANG W, WONG E, GAO YS, PANDEY UB, KAUSHIK S, TRESSE E, LU J, TAYLOR JP, CUERVO AM, YAO TP. (2010b) HDAC6 controls

- autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*; **29(5)**:969-80.
- LEE YM, WU TH, CHEN SF, CHUNG JC. (2003) Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line. *Toxicol In vitro*; **17**:279-87.
- LEVI G, RAITERI M. (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci*; **16**:415-9.
- LEVINE B, KLIONSKY DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*; **6(4)**:463-77. Review.
- LEVINE B, DERETIC V. (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; **7(10)**:767-77.
- LEVINE B, YUAN J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*; **15(10)**:2679-88.
- LIANG C, LEE JS, INN KS, GACK MU, LI Q, ROBERTS EA, VERGNE I, DERETIC V, FENG P, AKAZAWA C, JUNG JU. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol*; **10**:776-787.
- LIANG J, SHAO SH, XU ZX, HENNESSY B, DING Z, LARREA M, KONDO S, DUMONT DJ, GUTTERMAN JU, WALKER CL, SLINGERLAND JM, MILLS GB. (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*; **9**:218-24.
- LIANG XH, JACKSON S, SEAMAN M, BROWN K, KEMPES B, HIBSHOOSH H, LEVINE B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*; **402**:672-676.
- LIM J, KIM HW, YODIM MB, RHYU IJ, CHOE KM, OH YJ (2011) Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy*; **7(1)**:51-60.
- LIU C, GAO Y, BARRETT J, HU B. (2010) Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem*; **115(1)**:68-78.
- LOEWITH R, JACINTO E, WULLSCHLEGER S, LORBERG A, CRESPO JL, BONENFANT D, OPPLIGER W, JENOE P, HALL MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*; **10**:457-468.
- LONG X, LIN Y, ORTIZ-VEGA S, YONEZAWA K, AVRUCH J. (2005a) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*; **15**:702-13.

- LONG X, ORTIZ-VEGA S, LIN Y, AVRUCH J. (2005b) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem*; **280**:23433–36.
- LU XG, FENG BA, ZHAN LB, YU ZH.(2003) D-limonene induces apoptosis of gastric cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. Chin J Oncol*; **25**:325-327.
- LU XG, ZHAN LB, FENG BA, QU MY, YU LH, XIE JH.(2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol*; **10**: 2140-2144.
- LUM JJ, BAUER DE, KONG M, HARRIS MH, LI C, LINDSTEN T, THOMPSON CB. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*; **120(2)**:237-48.
- MACRAE I, ZHOU K, LI F, REPIC A, BROOKS A, CANDE W, ADAMS P, DOUDNA J (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer. *Science*; **311(5758)**: 195–8.
- MAGNUSON B, EKIM B, FINGAR DC. (2012) Regulation of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signaling networks. *Biochem J*; **441(1)**:1-21.
- MAIURI C, ZALCKVAR E, KIMCHI A, KROEMER G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biol*; **8**:741–752.
- MALTZMANN, T.H., HURT, L.M., ELSON, C.E., TANNER, M.A. AND GOULD, M.N. (1989) The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis*; **10**:781-783.
- MANDALARI G, BENNETT RN, BISIGNANO G, TROMBETTA D, SAIJA A, FAULDS CB, GASSON MJ, NARBAD A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J Appl Microbiol*; **103**: 2056-2064.
- MAO J, PRICE DD, MAYER DJ. (1995) Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: Implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain*; **61**:353–64.
- MARIÑO G, SALVADOR-MONTOLIU N, FUEYO A, KNECHT E, MIZUSHIMA N, LÓPEZ-OTÍN C. (2007) Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*; **282(25)**:18573-83.
- MARTINEZ-VICENTE M, TALLOCY Z, WONG E, TANG G, KOGA H, KAUSHIK S, DE VRIES R, ARIAS E, HARRIS S, SULZER D, CUERVO AM. (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*; **13(5)**:567-76.

- MASSEY A, KIFFIN R, CUERVO AM. (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*; **36**:2420–2434.
- MAUVIARD F, RAYNAUD F, GEOFFRIAU M, CLAUSTRAT B, PEVET P. (1995) 5-Methoxypsoralen inhibits 6-hydroxylation of melatonin in the rat. *Biol Signals*; **4**:32-41.
- MEIJER AJ, CODOGNO P (2006) Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med*; **27(5-6)**:411-25. Review.
- MENGEAUD V, ORTONNE JP.(1996) PUVA (5-methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes. *J Invest Dermatol*; **107**:57-62.
- MENGEAUD V, ORTONNE JP. (1994) Regulation of melanogenesis induced by 5-methoxypsoralen without ultraviolet light in murine melanoma cells. *Pigment Cell Res*; **7**:245-254.
- MERCER CA, KALIAPPAN A, DENNIS PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*; **5**:649-662.
- MIDORIKAWA R, YAMAMOTO-HINO M, AWANO W, HINOHARA Y, SUZUKI E, UEDA R, GOTO S. (2010) Autophagy-dependent rhodopsin degradation prevents retinal degeneration in *Drosophila*. *J Neurosci*; **30(32)**:10703-19.
- MIZUSHIMA N, KUMA A, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO A, MATSUBAE M, TAKAO T, NATSUME T, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*; **116**:1679–88.
- MIZUSHIMA N, SUGITA H, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. (1998a) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem*; **273**:33889–33892.
- MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell*; **140**:313-326.
- MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. (2002) Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett*; **532**:450–454.
- MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*; **3(6)**:542-5.
- MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO AM, KLIONSKY DJ. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*; **451(7182)**:1069-75.

- MIZUSHIMA N, NODA T, YOSHIMORI T, TANAKA Y, ISHII T, GEORGE MD, KLIONSKY DJ, OHSUMI M, OHSUMI Y. (1998b) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*; **395(6700)**:395-8.
- MIZUSHIMA N. (2004) Methods for monitoring autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; **36**:2491–2502.
- MOLLACE V, RAGUSA S, SACCO I, MUSCOLI C, SCULCO F, VISALLI V, PALMA E, MUSCOLI S, MONDELLO L, DUGO P, ROTIROTI D, ROMEO F. (2008). The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxyLDL receptor-1 expression in balloon injuryrelated neointima formation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*; **13**:120-9.
- MONDELLO L, DUGO P, BARTLE KD, DUGO G, COTRONEO A. (1995). Automated HPLCHRGC: a powerful method for essential oils analysis. Part V. Identification of terpene hydrocarbons of bergamot, lemon, mandarin, sweet orange, bitter orange, grapefruit, clementine and mexican lime oils by coupled HPLC-HRGCMS(ITD). *Flavour Frag J*; **10**:33–42.
- MONDELLO L, STAGNO D'ALCONTRES I, DEL DUCE R, CRISPO F. (1993) On the genuineness of Citrus essential oil. Part XL. The composition of the coumarins and psoralens of calabrian bergamot essential oil (Citrus bergamia, Risso). *Flavour and fragrance Journal*; **8**:17-24.
- MONDELLO L, VERZERA A, PREVITI P, CRISPO F, DUGO G. (1998) Multidimensional capillary GC-GC for the analysis of complex samples. Enantiomeric distribution of monoterpene hydrocarbons, monoterpene alcohols, and linalyl acetate of Bergamot oils. *J Agric Food Chem*; **46**:4275-4282.
- MORRIS SM, MCGARRITY LJ, DOMON OE, CHEN JJ, HINSON WG, BUCCI T.J., WARBRITTON A.R., AND CASCIANO, D.A. (1994) The role of programmed cell death in the toxicity of the mutagens, ethyl methanesulfonate and N-ethyl-N'-nitrosourea, in AHH-1 human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*; **306**:19-34.
- MORRONE LA, ROMBOLA L, CORASANITI MT, ZAPPETTINI S, PAUDICE P, BONANNO G, BAGETTA G. (2007) The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacol Res*; **55**:255–62.
- NAKAGAWA I, AMANO A, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, YAMAGUCHI H, KAMIMOTO T, NARA A, FUNAO J, NAKATA M, TSUDA K, HAMADA S, YOSHIMORI T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*; **306(5698)**:1037-40.
- NAKATOGAWA H, ICHIMURA Y, OHSUMI Y. (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*; **130**:165–178.

- NAKATOGAWA H, SUZUKI K, KAMADA Y, OHSUMI Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **10**(7):458-67.
- NEUENSCHWANDER U., GUIGNARD F., HERMANS I. (2010) Mechanism of the aerobic oxidation of alpha-pinene. *ChemSusChem*; **3**:75-84.
- NISHIDA Y, ARAKAWA S, FUJITANI K, YAMAGUCHI H, MIZUTA T, KANASEKI T, KOMATSU M, OTSU K, TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S.(2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*; **461**(7264):654-8.
- NIXON RA. (2006) Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci*; **29**:528-35.
- NOBUKUNI T, JOAQUIN M, ROCCIO M, DANN SG, KIM SY, GULATI P, BYFIELD MP, BACKER JM, NATT F, BOS JL, ZWARTKRUIS FJ, THOMAS G. (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102**(40):14238-43.
- NODA T, FUJITA N, YOSHIMORI T (2009) The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ*; **16**(7):984-90.
- NODA T, KIM J, HUANG WP, BABA M, TOKUNAGA C, OHSUMI Y, KLIONSKY DJ. (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol*; **148**:465-480.
- NODA T, OHSUMI Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*; **273**:3963-66.
- NORMAN JM, COHEN GM, BAMPTON ET. (2010) The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*; **6**:1042-56.
- ORMEROD MG, SUN XM, BROWN D, SNOWDEN RT, COHEN GM. (1993) Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol*; **32**:417-424.
- OSSIPOV MH, LOPEZ Y, NICHOLS ML, BIAN D, PORRECA F. (1995) The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. *Neurosci Lett*; **199**:87-90.
- OSTROWICZ CW, MEIRINGER CT, UNGERMANN C. (2008) Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics. *Autophagy*; **4**:5-19.
- PANARETOU C, DOMIN J, COCKCROFT S, WATERFIELD MD. (1997) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150·PtdIns 3-kinase complex. *J Biol Chem*; **272**:2477-2485.

- PARRISH JA, FITZPATRICK TB, TANENBAUM L, PATHAK MA. (1974) Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *C Engl J Med*; **291**:1207-1211.
- PATHAK MA, FITZPATRICK TB. (1992) The evolution of photochemistry with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J Photochem Photobiol B*; **14**:3-22.
- PATTINGRE S, TASSA A, QU X, GARUTI R, LIANG XH, MIZUSHIMA N, PACKER M, SCHNEIDER MD, LEVINE B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*; **122(6)**:927-39.
- PEANA AT, DE MONTISM G, NIEDDU E, SPANO TM, SECHI S, D'AQUILA PS, PIPPIA P. (2004) Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol*; **485**:165-74.
- PEANA AT, D'AQUILA PS, CHESSA ML, MORETTI MDL, SERRA G, PIPPIA P. (2003) (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol*; **460**:37-41.
- PEANA AT, D'AQUILA PS, PANIN F, SERRA G, PIPPIA P, MORETTI MDL. (2002) Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*; **9**:721-6.
- PEANA AT, DE MONTIS MG, NIEDDU E, SPANO TM, SECHI S, D'AQUILA PS. (2004) Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol*; **485**:165-74.
- PERRY N, PERRY E. (2006) Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: clinical and neuropharmacological perspectives. *CNS Drugs*; **20**:257-80.
- PEYRON J L. (2003) L'uso dell'essenza di bergamotto in profumeria oggi e nella storia. In "BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive". Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp.31-44.
- PIRAS A, GIANETTO D, CONTE D, BOSONE A, VERCELLI A. (2011) Activation of autophagy in a rat model of retinal ischemia following high intraocular pressure. *PLoS One*; **6(7)**:e22514.
- PRASHAR A., LOCKE I.C. AND EVANS C.S.(2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif*; **37**:221-229.
- PRIAULT M, SALIN B, SCHAEFFER J, VALLETTE FM, DI RAGO JP, MARTINOU JC (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ*; **12**:1613-1621.

- PUISSANT A, ROBERT G, FENOUILLE N, LUCIANO F, CASSUTO JP, RAYNAUD S, AUBERGER P. (2010) Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res*; **70**:1042-52.
- QU X, YU J, BHAGAT G, FURUYA N, HIBSHOOSH H, TROXEL A, ROSEN J, ESKELINEN EL, MIZUSHIMA N, OHSUMI Y, CATTORETTI G, LEVINE B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*; **112**(12):1809-20.
- RABINOWITZ JD, WHITE E. (2010) Autophagy and metabolism. *Science*; **330**:1344-8.
- RAVIKUMAR B, DUDEN R, RUBINSZTEIN DC. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Mol Genet*; **11**:1107-1117.
- RAVIKUMAR B, ACEVEDO-ARZENA A, IMARISIO S, BERGER Z, VACHER C, O'KANE CJ, BROWN SD, RUBINSZTEIN DC. (2005) Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet*; **37**(7):771-6.
- RAVIKUMAR B, VACHER C, BERGER Z, DAVIES JE, LUO S, OROZ LG, SCARAVILLI F, EASTON DF, DUDEN R, O'KANE CJ, RUBINSZTEIN DC. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*; **36**(6):585-95.
- RAVIZZA R, GARIBOLDI MB, MOLteni R, MONTI E. (2008) Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*; **20**:625-30.
- REGGIORI F, KLIONSKY DJ. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell*; **1**(1):11-21.
- RISSO JA, A POIEAU. 1818-22. Histoire naturelle des oranges. Audot, Paris; pp280.
- RODRÍGUEZ-MUELA N, GERMAIN F, MARIÑO G, FITZE PS, BOYA P. (2012) Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death Differ*; **19**(1):162-9.
- ROMANO L, BATTAGLIA F, MASUCCI L, SANGUINETTI M, POSTERARO B, PLOTTI G, ZANETTI S, FADDA G. (2005) In vitro activity of bergamot natural essence and furocoumarin-free and distilled extracts, and their associations with boric acid, against clinical yeast isolates. *J Antimicrob Chemother*; **55**(1):110-4..
- ROMBOLÁ L, CORASANITI MT, ROTIROTI D, TASSORELLI C, SAKURADA S, BAGETTA G, MORRONE LA. (2009) Effects of systemic administration of the essential oil of bergamot

- (BEO) on gross behaviour and EEG power spectra recorded from the rat hippocampus and cerebral cortex. *Funct Neurol*; **24**:107–12.
- ROSS DD, JONECKIS CC, ORDONEZ JV, SISK AM, WU RK, HAMBURGER AW, NORA RE. (1989) Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Re*; **49**:3776-3782.
- ROTMAN B, PAPERMASTER BW. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **55**:134-141.
- RUBINSZTEIN DC, DIFIGLIA M, HEINTZ N, NIXON RA, QIN ZH, RAVIKUMAR B, STEFANIS L, TOLKOVSKY A. (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*; **1**:11-22.
- RUBINSZTEIN DC, GESTWICKI JE, MURPHY LO, KLIONSKY DJ. (2007) Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*; **6(4)**:304-12.
- RUBINSZTEIN DC, SHPILKA T, ELAZAR Z. (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol*; **22(1)**:R29-34.
- RUSSNAK R, KONCZAL D, MCINTIRE SL. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J Biol Chem*; **276**:23849–23857.
- RUSSO R, BERLIOCCCHI L, ADORNETTO A, VARANO GP, CAVALIERE F, NUCCI C, ROTIROTI D, MORRONE LA, BAGETTA G, CORASANITI MT (2011) Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. *Cell Death Dis*; **14(2)**:e144.
- SAFTIG P, BEERTSEN W, ESKELINEN EL. (2008) LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*; **4**:510–512.
- SAGNE C, AGULHON C, RAVASSARD P, DARMON M, HAMON M, EL MESTIKAWY S, GASNIER B, GIROS B. (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*; **98**:7206–7211.
- SAIYUDTHONG S., MARSDEN C.A. (2011) Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. *Phytother Res*; **25**:858-62.
- SAKURADA T, KUWAHATA H, KATSUYAMA S, KOMATSU T, MORRONE LA, CORASANITI MT, BAGETTA G, SAKURADA S. (1998) Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. *Int Rev Neurobiol*; **85**:237-48. Review.
- SAKURADA T, KATSUMATA K, TAN-NO K, SAKURADA S, KISARA K. (1992) The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*; **31**:1279–85.

- SAKURADA T, KUWAHATA H, KATSUYAMA H, KATSUYAMA S, KOMATSU T, MORRONE LA. (2009) Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. *Int Rev Neurobiol*; **85**:235–46.
- SAKURADA T, MIZOGUCHI H, KUWAHATA H, KATSUYAMA S, KOMATSU T, MORRONE LA, CORASANITI MT, BAGETTA G, SAKURADA S. (2011) Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. *Pharmacol Biochem Behav*; **97**:436-43.
- SANCAK Y, PETERSON TR, SHAUL YD, LINDQUIST RA, THOREEN CC, BAR-PELED L, SABATINI DM. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*; **320(5882)**:1496-501.
- SANGUINETTI M, POSTERARO B, ROMANO L, BATTAGLIA F, LOPIZZO T, DE CAROLIS E, FADDA G. (2007) In vitro activity of Citrus bergamia (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. *J Antimicrob Chemother*; **59(2)**:305-8.
- SCHAFER WR AND RINE J. (1992) Protein prenylation: genes, enzymes, targets and functions. *Ann Rev Genetics*; **30**:209-237.
- SCHMELZLE T, BECK T, MARTIN DE, HALL MN. (2004). Activation of the RAS/cyclicAMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol*; **24**:338–51.
- SCOTT RC, JUHASZ G, NEUFELD TP. (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*; **17**:1–11.
- SEGLIN PO. (1983) Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol*; **96**:737-64.
- SETTEMBRE C, FRALDI A, JAHREISS L, SPAMPANATO C, VENTURI C, MEDINA D, DE PABLO R, TACCHETTI C, RUBINSZTEIN DC, BALLABIO A. (2008). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet*; **17(1)**:119-29.
- SHAH GM, SHAH RG, POIRIER GG. (1996) Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **229**:838-844.
- SHAN G. (2010) RNA interference as a gene knockdown technique. *Int J Biochem Cell Biol*; **42(8)**:1243-51.
- SHEN HM, CODOGNO P. (2011) Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*; **7**:457-65.
- SHIMIZU S, KANASEKI T, MIZUSHIMA N, MIZUTA T, ARAKAWA-KOBAYASHI S, THOMPSON CB, TSUJIMOTO Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*; **6**:1221-8.

- SHINTANI T, MIZUSHIMA N, OGAWA Y, MATSUURA A, NODA T, OHSUMI Y. (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J*; **18(19)**:5234-41.
- SINGH R, CUERVO AM. (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metabolism*; **13**:495–504.
- SINGH R, XIANG Y, WANG Y, BAIKATI K, CUERVO AM, LUU YK, TANG Y, PESSIN JE, SCHWARTZ GJ, CZAJA MJ (2009) Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest*; **119(11)**:3329-39.
- SINGLETERY K, MILNER J. (2008) Diet, autophagy, and cancer: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; **17**:1596-610.
- SINHA S, LEVINE B. (2008) The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*; **27(1)**: S137–S148.
- SOBOTA JA, BÄCK N, EIPPER BA, MAINS RE (2009) Inhibitors of the V0 subunit of the vacuolar H⁺-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. *J Cell Sci*; **122(19)**:3542-53.
- SOU YS, WAGURI S, IWATA J, UENO T, FUJIMURA T, HARA T, SAWADA N, YAMADA A, MIZUSHIMA N, UCHIYAMA Y, KOMINAMI E, TANAKA K, KOMATSU M. (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell*; **19**:4762-4775.
- SOUETRE E, SALVATI E, BELUGOU JL, DE GALEANI B, KREBS B, ORTONNE, JP, DARCOURT G. (1987) 5-Methoxypsoralen increases the plasma melatonin levels in humans. *J Invest Dermatol*; **89**:152-155.
- SOUETRE E, SALVATI E, BELUGOU JL, ROBERT P, BRUNET G, DARCOURT G. (1988) Antidepressant effect of 5-methoxypsoralen: a preliminary report. *Psychopharmacol*; **95**:430-431.
- SPINELLI R. (2003) Il bergamotto in gastronomia. In “ BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp. 233-238.
- SRIDHAR S, BOTBOL Y, MACIAN F, CUERVO AM. (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol*; **226(2)**:255-73.
- STATTI GA, CONFORTI F, SACCHETTI G, MUZZOLI M, AGRIMONTI C, MENICHINI F. (2004) Chemical and biological diversity of Bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. *Fitoterapia*; **75**:212-6.

- STOKOE D, STEPHENS LR, COPELAND T, GAFFNEY PR, REESE CB, PAINTER GF, HOLMES AB, MCCORMICK F, HAWKINS PT. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*; **277**:567–70.
- SUH Y, AFAQ F, KHAN N, JOHNSON JJ, KHUSRO FH, MUKHTAR H. (2010) Fisetin induces autophagic cell death through suppression of mTOR signaling pathway in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*; **31**:1424-33.
- SUN J. (2007) D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev*; **12(3)**:259-64.
- SUZUKI K, KIRISAKO T, KAMADA Y, MIZUSHIMA N, NODA T, OHSUMI Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*; **20**:5971–5981.
- SUZUKI K, KUBOTA Y, SEKITO T, OHSUMI Y. (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*; **12**:209–218.
- TAKAHASHI Y, COPPOLA D, MATSUSHITA N, CUALING HD, SUN M, SATO Y, LIANG C, JUNG JU, CHENG JQ, MULÉ JJ, PLEDGER WJ, WANG HG. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*; **9(10)**:1142-51.
- TAKANO-OHMURO H, MUKAIDA M, KOMINAMI E, MORIOKA K. (2000) Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol*; **79(10)**:759-64.
- TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*; **119**:301–311.
- TALLOCY Z, VIRGIN HWT, LEVINE B (2006) PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*; **2**:24-29.
- TAN AC, KONCZAK I, SZE DM, RAMZAN I. (2011) Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutr Cancer*; **63**:495-505.
- TANEW A, ORTEL B, RAPPERSBERG K, HONIGSMANN H. (1988) 5-Methoxypsoralen (bergapten) for photochemotherapy. *J Am Acad Dermatol*; **18**:333-338.
- TANIDA I, KOMATSU M, UENO T, KOMINAMI E. (2003) GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun*; **300**:637–644.
- TANIDA I, SOU YS, MINEMATSU-IKEGUCHI N, UENO T, KOMINAMI E. (2002a) Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated Kim J, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Convergence of multiple autophagy and

- cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem*; **277**:763–773.
- TANIDA I, TANIDA-MIYAKE E, KOMATSU M, UENO T, KOMINAMI E. (2002b) Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem*; **277**:13739–13744.
- TANIDA I, MIZUSHIMA N, KIYOOKA M, OHSUMI M, UENO T, OHSUMI Y, KOMINAMI E. (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*; **10**(5):1367-79.
- THEVELEIN JM, DE WINDE JH. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*; **33**:904–918.
- TREFFEL P, HUMBERT P, MAKKI B, FAIRRE B, AGACHE P. (1991) Use of a surface recovery technique to evaluate percutaneous absorption of 5-methoxypsoralen in humans. *Arch Dermatol Res*; **283**:487-489.
- TSUKAMOTO S, KUMA A, MURAKAMI M, KISHI C, YAMAMOTO A, MIZUSHIMA N. (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*; **321**:117–120.
- TWIG G, ELORZA A, MOLINA AJ, MOHAMED H, WIKSTROM JD, WALZER G, STILES L, HAIGH SE, KATZ S, LAS G, ALROY J, WU M, PY BF, YUAN J, DEENEY JT, CORKEY BE, SHIRIHAI OS. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*; **27**:433–46.
- UEDO N, TATSUTA M, IISHI H, BABA M, SAKAI N, YANO H, OTANI T. (1999) Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett*; **137**:131-6.
- USTA J, KREYDIYYEH S, KNIO K, BARNABE P, BOU-MOUGHLABAY Y, DAGHER S. (2009) Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem Biol Interact*; **180**:39-46.
- VADDI HK, HO PC, CHAN SY. (2002). Terpenes in propylene glycol as skinpenetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci*; **91**:1639-1651.
- VAN DER LOGT EM, ROELOFS HM, VAN LIESHOUT EM, NAGENGAST FM, PETERS WH. (2004) Effects of dietary anticarcinogens and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferases. *Anticancer Res*; **24**:843-849.

- VERZERA A, LACONICA G, MONDELLO L, TROZZI A, DUGO G. (1996) The composition of bergamot oil. *Perfum Flav*; **21**:19-35.
- VERZERA A, TROZZI A, GAZEA F, RICCIARELLO G, COTRONEO A. (2003) Effects of rootstock on the composition of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil. *J Agric Food Chem*; **51**:206-210.
- VIGUSHIN DM, POON GK, BODDY A, ENGLISH J, HALBERT GW, PAGONIS C, JARMAN M, COOMBES RC. (1998) Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol*; **42(2)**:111-7.
- VLAHOS CJ, MATTER WF, HUI KY, BROWN RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*; **269**:5241-8.
- WANG CW, KLIONSKY DJ. (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*; **9**:65-76.
- WANG CW, STROMHAUG PE, SHIMA J, KLIONSKY DJ. (2002) The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *J Biol Chem*; **277**:47917-47927.
- WANG KK. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci*; **23(2)**:59.
- WATTENBERG LW, COCCIA JB. (1991) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by d-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis*; **12**:115-117.
- WATTENBERG LW, SPARNINS VL, BARANY G. (1989) Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res*; **49**:2689-2692.
- WEBB JL, RAVIKUMAR B, ATKINS J, SKEPPER JN, RUBINSZTEIN DC. (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*; **278(27)**:25009-13.
- WILKINSON SM, LOVE SB, WESTCOMBE AM, GAMBLES MA, BURGESS CC, CARGILL A. (2007) Effectiveness of aromatherapy massage in the management of anxiety and depression in patients with cancer. A multi center randomized controlled trial. *J Clin Oncol*; **25**:532-9.
- WILLIAMS A, SARKAR S, CUDDON P, TFOFI EK, SAIKI S, SIDDIQI FH, JAHREISS L, FLEMING A, PASK D, GOLDSMITH P, O'KANE CJ, FLOTO RA, RUBINSZTEIN DC. (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*; **4(5)**:295-305.

- WIRAWAN E, VANDE WALLE L, KERSSE K, CORNELIS S, CLAERHOUT S, VANOVERBERGHE I, ROELANDT R, DE RYCKE R, VERSPURTEN J, DECLERCQ W, AGOSTINIS P, VANDEN BERGHE T, LIPPENS S, VANDENABEELE P. (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death*; **1**:e18.
- WONG E, CUERVO AM. (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*; **13**:805–811.
- WONG ES, TAN JM, SOONG WE, HUSSEIN K, NUKINA N, DAWSON VL, DAWSON TM, CUERVO AM, LIM KL. (2008) Autophagy-mediated clearance of aggregates is not a universal phenomenon. *Hum Mol Genet*; **17(16)**:2570-82.
- WOOTEN MW, GEETHA T, BABU JR, SEIBENHENER ML., PENG J, COX N, DIAZ-MECO MT, MOSCAT J. (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*; **283**:6783–6789.
- XIE Z, NAIR U, KLIONSKY DJ. (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*; **19**:3290–3298.
- YAMAMOTO A, SIMONSEN A. (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*; **43**:17–28.
- YAMAMOTO A, TAGAWA Y, YOSHIMORI T, MORIYAMA Y, MASAKI R, TASHIRO Y. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*; **23**:33–42.
- YANG Z, HUANG J, GENG J, NAIR U, KLIONSKY DJ. (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*; **17**:5094–5104.
- YANG Z, KLIONSKY DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*; **335**:1-32.
- YANG Z, KLIONSKY DJ. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*; **22(2)**:124-31.
- YANG ZJ, CHEE CE, HUANG S, SINICROPE F. (2011a) Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*; **11(2)**:169-76.
- YANG ZJ, CHEE CE, HUANG S, SINICROPE FA. (2011b) The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*; **10**:1533-41.

- YANO H, TATSUTA M, IISHI H, BABA M, SAKAI N, UEDO N. (1999) Attenuation by d-limonene of sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Int J Cancer*; **82**:665-668.
- YOUNG ARJ, NARITA M, FERREIRAM, KIRSCHNER K, SADAIE M, DAROT JF, TAVARE S, ARAKAWA S, SHIMIZU S, WATT FM (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes*; **23**:798-803.
- YU WH, CUERVO AM, KUMAR A, PETERHOFF CM, SCHMIDT SD, LEE JH, MOHAN PS, MERCKEN M, FARMERY MR, TJERNBERG LO, JIANG Y, DUFF K, UCHIYAMA Y, NÄSLUND J, MATHEWS PM, CATALDO AM, NIXON RA. (2005) Macroautophagy - a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*; **171**(1):87-98.
- YUE Z, JIN S, YANG C, LEVINE AJ, HEINTZ N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**(25):15077-82.
- YUGA M, GOMI K, KLIONSKY DJ, SHINTANI T (2011) Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*; **286**:13704-13713.
- ZAYNOUN ST, JOHNSON BE, FRAIN-BELL W. (1977) A study of oil of bergamot and its importance as a phototoxic agent. I. Characterization and quantification of the photoactive component. *Br J Dermatol*; **96**: 475-482.
- ZHAO H, SHIMOHATA T, WANG JQ, SUN G, SCHAAL DW, SAPOLSKY RM, STEINBERG GK. (2005) Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*; **25**:9794-806.
- ZHU JH, HORBINSKI C, GUO F, WATKINS S, UCHIYAMA Y, CHU CT. (2007) Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol*; **170**:75-86.
- ZONCU R, EFEYAN A, SABATINI DM. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Rev Mol Cell Biol*; **12**:21-35.

PARTE SPECIALE

Attività di ricerca svolta durante lo *stage* formativo all'estero

Nella parte finale del corso di dottorato di ricerca è stato svolto uno *stage* formativo di sei mesi presso il *Medical Research Council* (MRC) di Leicester (UK), che ha consentito l'acquisizione di nuovi metodi sperimentali di indagine.

Durante tale periodo, è stata investigata la correlazione tra il fattore trascrizionale p73 e l'espressione di selezionati geni *target* mediante qRT-PCR (*Real Time* quantitativa della Reazione di Polimerizzazione a Catena).

Per la scelta dei geni *target* sono stati presi in considerazione i risultati ottenuti da *ChIP-on-Chip* pubblicate in letteratura o da *microarray* prodotte nello stesso laboratorio ospitante. Alcuni dei geni testati sono stati scelti sulla base della *ChIP-on-Chip* di Rosenbluth e collaboratori (*Rosenbluth et al., 2011*). In particolare, sono stati studiati i seguenti geni: SLC2A1 (GLUT-1; trasportatore del glucosio di tipo 1), GSR (glutazione reduttasi), PC (piruvato carbossilasi), SDHA (complesso della succinato deidrogenasi, subunità A), ALDH1A3 (aldeide deidrogenasi famiglia 1 membro A3), NDUFA2 (NADH deidrogenasi 1 *alpha* sub complesso 2), correlati al metabolismo cellulare. Tra questi, solo l'espressione di GLUT-1 è risultata essere indotta da p73 e sono in corso altri esperimenti per verificare se tale regolazione avviene mediante legame diretto di p73 al promotore del gene GLUT-1, oppure tramite meccanismo indiretto.

1. Introduzione

p73 è un gene appartenente alla famiglia di p53, che include p53 stesso e p63. Questi tre geni codificano fattori di trascrizione che giocano un ruolo chiave come regolatori della proliferazione, del differenziamento, della morte cellulare e del rinnovo delle cellule staminali (*Killick et al., 2011; Rufini et al., 2011*).

Il gene umano di p73 (Trp73) è stato clonato più di 10 anni fa dal gruppo di McKeon e collaboratori, che identificò il suo *locus* cromosomico in 1p36, una regione frequentemente

deleta in tumori umani quali il neuroblastoma e altre forme di cancro in stadio avanzato, correlando immediatamente p73 al cancro (Brosh & Rotter, 2009).

La biologia di p73 è molto complessa dato che il suo gene può essere trascritto in una varietà di isoforme differenti, le cui proteine risultanti hanno spesso proprietà antagoniste. Infatti, per la presenza di promotori alternativi e di *splicing* alternativo al C-terminale, tutti i membri della famiglia di p53 sono espressi in più forme isomeriche. I geni appartenenti a questa famiglia presentano la stessa struttura modulare, includendo un dominio di transattivazione ammino-terminale (TA), un dominio di legame al DNA e un dominio di oligomerizzazione carbossi-terminale. Il gene p73 contiene 15 esoni e la trascrizione può essere iniziata da due diversi promotori N-terminali. La trascrizione dall'ATG più a monte (promotore 1) genera le forme transattivanti (TA), mentre dal secondo promotore, situato sull'introne 3, si ottengono proteine troncate all'amminotermine (isoforme ΔN) (fig. 1).

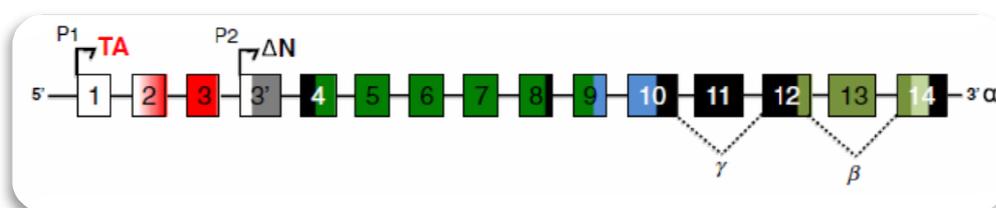


Fig. 1 Struttura del gene p73.

Organizzazione genomica di p73 e rappresentazione delle varianti di *splicing* da cui si ottengono diverse isoforme della proteina p73. Il promotore P1 genera le isoforme TA, il promotore P2 genera le isoforme ΔN (Killick et al., 2011).

Generalmente, le isoforme TA e ΔN presentano attività biologiche distinte. Le forme TA inducono arresto del ciclo cellulare e apoptosi e sono perciò candidati oncosoppressori (Muller et al., 2005; Wang et al., 2007), mentre le isoforme troncate ΔN sono (generalmente) *pro survival* e favoriscono la trasformazione oncogenetica (Wang et al., 2007). Inoltre, è comunemente accettato che le isoforme ΔN agiscono per lo più come inibitori negativi

dell'attività delle isoforme TA, sia competendo per gli elementi consenso sul promotore di DNA, sia per dimerizzazione (Pozniak et al., 2000; Grob et al., 2001).

Negli ultimi 30 anni, una quantità considerevole di ricerca clinica e di base si è focalizzata sulla proteina oncosoppressore p53, principalmente perché il suo gene è mutato in oltre il 50% di tutti i tipi di cancro (Brosh & Rotter, 2009).

Diverse evidenze hanno dimostrato che p53 funziona come “guardiano del genoma”, con un ruolo nodale nella *pathway* del segnale che previene l'insorgenza e lo sviluppo del cancro, mediante la sua capacità di “sentire” una serie di segnali oncogeni stressogeni, genotossici e citotossici, traslandoli in risposte cellulari oncosoppressive, come l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi (Vousden & Prives, 2009; Murray-Zmijewski et al., 2008).

Anche gli altri due membri della famiglia di p53, ovvero p63 e p73, sono coinvolti nella soppressione dei tumori, perciò, l'intera famiglia di p53 può essere considerata un “*network*” del segnale che controlla la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare (Collavin et al., 2010).

A differenza di p53, che risulta mutato nel 50% dei tumori esistenti, p73 è raramente mutato nel cancro (<1%), per cui l'attivazione farmacologica della sua attività oncosoppressiva (es. pro-apoptotica) rappresenta un'attraente strategia alternativa per il trattamento dei tumori, in particolare in quelle cellule in cui p53 è stato perso o è mutato (Bisso et al., 2011).

La tumorigenesi è associata ad un incremento dell'*uptake* cellulare del glucosio e ad un aumento del metabolismo, che è richiesto per una rapida proliferazione (Hatanaka, 1974). Questo fenomeno, per cui la glicolisi diventa la principale sorgente per la produzione di energia (ATP), è stato per decenni indicato come *Warburg effect* ed è spesso associato all'overespressione di geni come GLUT-1 (trasportatore del glucosio1) e HK (esochinasi) (Smith 2000; Warburg 1956; Younes et al., 1997).

Poiché i trasportatori del glucosio transmembrana (GLUT) mediano l'*uptake* del glucosio nelle cellule tumorali e sono coinvolti nel primo *step* della cascata di utilizzazione di questo

zucchero, essi rappresentano potenziali *target* regolatori per geni oncogeni e oncosoppressori (Flier et al., 1987).

GLUT1 è la principale isoforma di trasportatore del glucosio trovata in molte cellule, sebbene esistano anche altre isoforme che esibiscono un *pattern* di distribuzione tessuto-specifico (Kahn, 1992). Un'alta espressione delle varie isoforme di GLUT può rappresentare per la cellula cancerosa un vantaggio metabolico. Infatti, sia GLUT-1 che GLUT-4 sono espressi in maniera aberrante in molti tumori. Ad esempio, l'overespressione di GLUT-1 è stata trovata in tumori della mammella, della tiroide, del pancreas, del polmone e dello stomaco (si veda: Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004). In alcuni casi, l'overespressione di GLUT-1 è correlata ad una prognosi negativa (Mediana & Owen, 2002).

Durante lo *stage* all'estero abbiamo dimostrato che GLUT-1 è indotto, almeno *in vitro*, da alcuni membri della famiglia di p53 (TAp73 α e TAp73 β , ma non da Δ Np73 α).

Gli esperimenti sono stati condotti su linee cellulari di osteosarcoma umano, Saos2 (ATCC, HTB-85), che perdono entrambi gli alleli di p53 (Fogh et al., 1977). In particolare, sono stati usati cloni di Saos2 stabilmente trasfettate con un plasmide regolatore pTet-On. In questo modo sono state ottenute tre linee cellulari inducibili tetraciclina-responsive (Tet-On) per le tre differenti isoforme umane di p73: TAp73 α , TAp73 β , Δ Np73 α , precedentemente caratterizzate (Nakano et al., 2000). In seguito al trattamento con un analogo della tetraciclina, la doxiciclina (Dox), ognuna di queste linee cellulari va incontro ad una marcata induzione del transgene.

L'utilizzo del sistema Tet-On (Clontech, Palo Alto, CA, USA) basato sulle cellule Saos-2 offre il grande vantaggio di permettere l'induzione di un'espressione regolata delle diverse isoforme di p73, in assenza di interferenze dovute a p53 endogeno.

I risultati ottenuti mediante qRT-PCR hanno evidenziato che i livelli dell'mRNA di GLUT-1 sono significativamente aumentati nelle cellule in cui è stato indotto il gene p73, rispetto alle cellule controllo non indotte. Inoltre, i livelli di mRNA sono stati trovati aumentati solo nelle linee esprimenti le due isoforme trascrizionalmente attive (TA) di p73, mentre le linee cellulari in cui è stata indotta l'espressione dell'isoforma tronca del gene (Δ N), priva del

dominio di transattivazione, presentano la stessa quantità di mRNA di GLUT-1 riscontrato nella popolazione controllo.

Per confermare in un altro sistema sperimentale l'induzione di GLUT-1 da parte dei membri della famiglia di p53, sono stati condotti esperimenti di qRT-PCR sulla linea cellulare H1299, transientemente transfettata con le varie isoforme del gene p53. Infine, mediante *Western blot*, immunofluorescenza e citofluorimetria, è stato dimostrato l'aumento dei livelli di espressione della proteina GLUT-1 nelle cellule indotte per TAp73 α e TAp73 β .

2. Nuovo metodo sperimentale di indagine appreso durante lo stage formativo all'estero: qRT-PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. Tale metodica fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis che, per questo, ottenne il premio Nobel per la chimica (1993) (Saiki *et al.*, 1988).

La PCR ricostruisce *in vitro* uno specifico passaggio della duplicazione cellulare: la ricostituzione (sintesi) di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato.

Questo processo viene svolto da enzimi chiamati DNA-polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA nelle seguenti condizioni:

- devono essere disponibili i nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP);

- il DNA deve essere denaturato, ovvero le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate;
- il segmento da ricostruire può essere soltanto prolungato, ovvero non è possibile sintetizzare un nuovo filamento a partire da zero, ma deve esserci un innesco o *primer*;
- devono inoltre essere rispettate opportune condizioni di temperatura, pH, ecc.

È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione: una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre, una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti, opportuni *primer*, costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre, una DNA polimerasi termo-resistente, un buffer che permette di mantenere il pH stabile e necessario per costituire l'ambiente adatto alla reazione, altri elementi di supporto (ad es. ioni magnesio) indispensabili per il corretto funzionamento della DNA polimerasi e acqua per portare a volume la soluzione.

Per avviare la reazione della polimerasi (fase di prolungamento del filamento a partire dal primer 5') è prima necessario provvedere alla separazione dei filamenti del DNA (fase di denaturazione), quindi alla creazione del legame tra i *primer* e le regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*). Questo processo risulta però incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99 °C). Per ovviare a questo inconveniente si fa ricorso alle polimerasi appartenenti a organismi termofili che non sono inattivate dalle alte temperature, ad esempio la Taq polimerasi proveniente dal batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*. Ciò consente di realizzare più cicli di PCR in sequenza, in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti, ottenendo una reazione a catena (da cui il nome "PCR") in cui i filamenti neosintetizzati fungono da stampo per i successivi cicli di amplificazione. Il processo che ne risulta è di tipo esponenziale e porta in poco tempo alla produzione di molte copie di DNA.

Un classico ciclo di PCR prevede le seguenti fasi:

la soluzione di DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, *primer* e TAQ polimerasi viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99 °C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui la doppia elica del DNA viene completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi (fase di denaturazione). Successivamente, la temperatura viene abbassata fino a 40-55 °C al fine di permettere il legame dei *primer* alle loro regioni complementari sui filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*). Infine, la temperatura è alzata fino a 65-72 °C al fine di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di prolungamento). Il ciclo descritto viene ripetuto per circa 30-40 volte e in genere non si superano i 50 cicli, poiché la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTP. Bisogna, inoltre, considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale genomico contaminante.

La PCR *real-time*, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR), è un metodo di amplificazione (PCR) e quantificazione simultanea del DNA (Heid et al., 1996). Essa rappresenta il principale sviluppo della tecnologia PCR che permette di realizzare il rilevamento e la quantificazione di prodotti generati durante ogni ciclo del processo di amplificazione, mediante l'utilizzo di una sonda (*probe*) del DNA, generalmente fluorescente.

Spesso la PCR *Real-Time* è combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA (*complementary DNA*) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, ad esempio, quantificare differenze nell'espressione dell'RNA messaggero di un gene a un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. Dai dati ottenuti si può effettuare una quantificazione assoluta delle concentrazioni di specifici RNA, producendo una curva *standard* di calibrazione; in alternativa, si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la

loro quantità rispetto a quella di un gene controllo (*housekeeping gene*) usato per normalizzare l'espressione del gene studiato.

Durante lo *stage* formativo all'estero è stata appresa questa tecnica di qRT-PCR ed è stata applicata alla valutazione dei livelli di RNA messaggero di GLUT-1 nelle linee cellulari indotte per il fattore di trascrizione p73.

3. Induzione di p73 nelle linee cellulari Saos2 Tet-On-p73

Le 3 linee cellulari Saos2, contenenti ciascuna un gene Tet-On inducibile per una delle specifiche isoforme di p73 (TAp73 α , TAp73 β , Δ Np73 α), sono state mantenute in coltura in RPMI 1640 supplementato con il 10% di FBS (*tetraciclina-free*), 5% Pen-Strep e 5% GlutaMax. Per indurre l'espressione del transgene le cellule sono state trattate con doxiciclina alla concentrazione finale di 2 μ g/ml per 4, 8, 12 o 24 ore.

L'induzione del transgene è stata verificata mediante *Western blot*. Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e sono stati preparati gli estratti proteici mediante l'utilizzo di un *buffer* di lisi (RIPA), completato al momento dell'uso con un *cocktail* di inibitori delle proteasi (*Protease Inhibitor cocktail tablets*; Roche).

La quantità di proteine presenti nell'estratto è stata dosata tramite il metodo *Bradford* con il "*Bio-Rad Protein Assay*" (BioRad). Questo saggio analitico prevede l'aggiunta di un colorante acido ad un'aliquota della soluzione proteica, seguita da una misurazione spettrofotometrica a 595 nm. La comparazione con una curva *standard* (es. di BSA, albumina bovina sierica), a concentrazione nota, permette di misurare la quantità relativa di proteina nel campione. Il principio su cui si basa questa metodica è che l'assorbanza massima di una soluzione acida del colorante *comassie brilliant blue G-250* passa da 465 a 595 nm quando avviene il suo legame con la proteina (prevalentemente agli amminoacidi aromatici). Differenti cambiamenti del colore si verificano in risposta a varie concentrazioni di proteine (in particolare, l'intensità del colore blu osservato è direttamente proporzionale alla quantità di proteine presenti nel campione dosato).

20 microgrammi di proteine sono state caricate in un gel di SDS-poliacrilammide, sottoposte a corsa elettroforetica ed elettrotrasferite su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state poi bloccate e successivamente incubate tutta la notte a 4°C con anticorpi primari in grado di riconoscere p73 (HRP-coniugato HA, Roche), p21 (Santa Cruz) e GAPDH. L'attività trascrizionale di p73 nelle Saos2 indotte per il transgene è stata verificata valutando i livelli di espressione del gene p21, che è un *target* diretto delle proteine appartenenti alla famiglia di p53. I livelli di espressione di p21, infatti, sono risultati aumentati in maniera tempo-dipendente nelle cellule trattate con doxiciclina, confermando l'avvenuta induzione (Fig. 2).

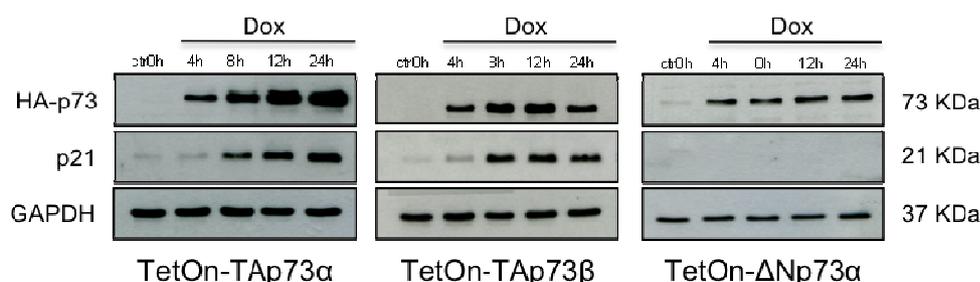


Fig. 2 Induzione del transgene nelle linee cellulari Saos2.

Le linee cellulari Saos2, stabilmente transfettate con un vettore doxiciclina-inducibile contenente il gene *TAp73α* o *TAp73β* o $\Delta Np73\alpha$, sono state indotte con doxiciclina (Dox, 2µg/ml) per i tempi indicati. L'induzione del transgene è stata verificata mediante Western blot e l'overexpression dei membri della famiglia di p53 è stata confermata valutando i livelli di espressione di p21.

4. Quantificazione del livello dell'RNA messaggero di GLUT-1 nelle Saos2 Tet-On-p73 indotte con doxiciclina

I livelli di mRNA di GLUT-1 nelle linee cellulari indotte per le varie isoforme di p73 sono stati determinati mediante qRT-PCR. Per lo scopo, è stato estratto l'RNA totale dalle linee cellulari trattate con doxiciclina e dalle linee controllo (non trattate), l'RNA è stato

retrotrascritto in cDNA e, infine, mediante *Real-Time* PCR, con l'utilizzo di una coppia di *primer* (*forward* e *reverse*) specifici per il gene GLUT-1 è stata valutata la quantità dell'amplificato genico.

4.1 Estrazione dell'RNA totale

Le cellule sono state raccolte ed è stato estratto l'RNA totale mediante l'utilizzo di TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), un reagente designato per isolare grandi quantità di RNA (così come di DNA e proteine) da cellule o campioni di tessuto. Si tratta di una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inibire irreversibilmente le ribonucleasi mantenendo l'integrità dell'RNA durante la lisi della cellula (*Chomczynski, 1993*).

Il protocollo di estrazione di RNA prevede 5 passaggi chiave:

- a) lisi cellulare ed estrazione: il *pellet* cellulare viene risospeso in 1ml di TRIzol, spipettando fino alla sua completa dissoluzione;
- b) separazione: il campione viene incubato per 5 minuti a temperatura ambiente in modo da far dissociare completamente i complessi nucleoproteici. Si aggiungono 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRIzol utilizzato e si agitano i tubi vigorosamente per 15 secondi, incubandoli successivamente a temperatura ambiente per 2-3 minuti. I campioni vengono a questo punto centrifugati ad un massimo di 12000 g per 15 minuti a 4°C, per permette la separazione della miscela in tre fasi: una fase inferiore di colore rosso con il fenolo-cloroformio contenente il DNA e le proteine, un'interfase ed una fase superiore acquosa che contiene l'RNA;
- c) precipitazione dell'RNA: la fase acquosa ottenuta dalla centrifugazione precedente viene trasferita in un nuovo tubo mentre la fase organica è conservata per una eventuale estrazione di DNA o di proteine. Si aggiungono, alla fase acquosa, 500 µl di alcool isopropilico per ogni mL di TRIzol utilizzato e la soluzione finale viene incubata a

temperatura ambiente per 10 minuti. Si centrifuga ad un massimo di 12000 g per 10 minuti a 4°C: l'RNA precipita sotto forma di *pellet* gelatinoso sul fondo del tubo;

d) lavaggio dell'RNA: il surnatante ottenuto con tale centrifugazione viene eliminato e si lava il *pellet* di RNA con 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di TRIzol usato. Si centrifuga la miscela a 12000 g per 5 minuti a 4°C;

e) risolubilizzazione dell'RNA: dopo aver rimosso l'etanolo, il precipitato viene fatto asciugare all'aria finché non diventa trasparente; di norma è utile non fare asciugare l'RNA sotto vuoto e completamente altrimenti se ne riduce la solubilità. Infine, si risospende il *pellet* in acqua RNasi-free trattata con DEPC (dietilpirocarbonato) o 0,5% SDS.

4.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA totale

Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o fenolo (introdotto con la purificazione), l'RNA viene analizzato mediante il NanoDrop® ND-1000 (Celbio). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1 µl) con accuratezza e riproducibilità elevate, consentendo un notevole risparmio di materiale. Il sistema brevettato di ritenzione del campione, che sfrutta unicamente la tensione superficiale dei liquidi, permette di eliminare l'uso di cuvette e capillari, riducendo così il tempo necessario per la misura. Inoltre, il cammino ottico molto ridotto (1 mm) permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale, eliminando in questo modo la necessità di diluire i campioni. All'estremità di un cavo a fibre ottiche viene caricato 1 µl di RNA estratto; un secondo cavo viene posto in contatto con la soluzione in modo che il liquido funga da ponte tra le due estremità (Fig. 3).

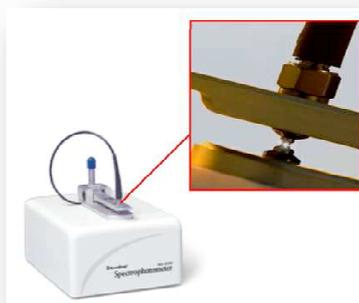


Fig. 3 NanoDrop® ND-1000 (immagine adattata da <http://www.nanodrop.com>).

La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che ha attraversato il campione viene analizzata da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un *software* la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/μl.

Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici. Inoltre, l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 230$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;
- $\lambda = 280$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;
- $\lambda = 320$ nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile determinare la concentrazione di RNA (o DNA) mediante la seguente formula:

$$\text{concentrazione [ng/ } \mu\text{l]} = (A_{260} - A_{320}) \times f_c \times f_d$$

dove f_d è il fattore di diluizione e f_c è il coefficiente di estinzione molare medio, che dipende dalla natura dell'acido nucleico. Acido nucleico f_c [ng/μl]: DNA ds 50, DNA ss 33, RNA ss 40.

Per stimare il grado di purezza dell'RNA (o DNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine si valutano i rapporti tra le assorbanze A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . In buone preparazioni di RNA questi rapporti oscillano generalmente tra 1.8 e 2.0. Inoltre, i campioni possono essere fatti correre su un gel di agarosio allo 0,8% per valutarne l'integrità. I campioni sono infine conservati a -80°C .

4.3 Gel di agarosio per RNA

Per osservare l'integrità dell'RNA dopo la sua estrazione da campioni biologici quali tessuti o cellule, i campioni di RNA sono fatti correre su un gel di agarosio allo 0,08%, immerso in un tampone elettroforetico 1x MOPS (acido N-morpholino propansulfonico). Il gel viene preparato mediante polimerizzazione dello zucchero agarosio a cui viene aggiunto del bromuro di etidio, un intercalante degli acidi nucleici, che quando irradiato con luce ultravioletta emette fluorescenza.

I campioni (generalmente 1 μg) sono quindi caricati sul gel, sottoposti a corsa elettroforetica e visualizzati ai raggi UV di un transilluminatore. Se l'RNA è integro e non si è degradato, si osservano sul gel tre bande: le prime due bande rappresentano le componenti di RNA maggioritarie e ad alto peso molecolare, cioè gli rRNA 28S e 18S, l'ultima banda è costituita da molecole più piccole ma abbondanti come gli rRNA 5,8S e 5S o il tRNA. Gli RNA messaggeri non sono visibili perché nella cellula sono presenti ciascuno in piccole quantità (Fig. 4).

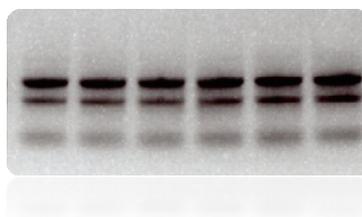


Fig. 4 Gel di agarosio di alcuni campioni di RNA estratti durante lo stage formativo all'estero. Sono ben visibili le tre bande corrispondenti agli rRNA 28S, 18S e 5S.

Normalmente le bande 18S e 28S dell'RNA ribosomiale sono ben visibili nel campione intatto, mentre l'RNA degradato appare come uno *smear* a basso peso molecolare.

4.4 Trattamento con DNasi dell'RNA cellulare estratto

Per le applicazioni di RT-PCR, l'RNA deve essere libero da contaminazioni di DNA genomico, pertanto, prima della retrotrascrizione, è stato effettuato un trattamento con DNasi RNasi-free, usando il kit “*DNasi I, Amplification Grade*” (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), secondo quanto indicato dalla ditta produttrice.

4.5 Retrotrascrizione dell'RNA e amplificazione del cDNA risultante mediante “Reverse Transcription Chain Reaction” (RT-PCR)

L'RNA estratto dalle cellule è stato utilizzato per effettuare una RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), una tecnica di laboratorio in cui un filamento di RNA viene retrotrascritto nel suo DNA complementare (cDNA) usando l'enzima trascrittasi inversa e il risultante cDNA viene amplificato mediante PCR (reazione di polimerizzazione a catena).

Per la sintesi del cDNA a singolo strato è stato utilizzato il kit “*Revert Aid H Minus, First Strand cDNA synthesis kit*” (Fermentas, Life Sciences). In particolare, sono stati retrotrascritti per ogni campione 3 µg dell'RNA totale, a cui è stata aggiunta una soluzione di *random primer*. La miscela è stata posta nella macchina *Peltier Thermal Cycler* (Thermo Scientific) e riscaldata 5 minuti a 70°C e successivamente raffreddata a 25°C per permettere l'*annealing* dei *primer* con le sequenze omologhe di RNA. Successivamente, sono stati aggiunti gli altri reagenti della reazione di retrotrascrizione (Tampone di reazione, Inibitore delle RNasi, miscela di oligonucleotidi dNTP e l'enzima trascrittasi inversa). Infine, è stata avviata la seconda parte del programma di PCR che prevede, nel complesso: 5 minuti a 70°C, 5 minuti a 25°C, 1h a 42°C, 10 minuti a 70°C.

Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20° C e successivamente utilizzato per la *Real-Time PCR*.

4.6 Real-Time PCR

Per amplificare il gene *target* GLUT-1 abbiamo utilizzato il kit “*Power SYBR Green PCR Master Mix, 2x*” (Applied Biosystem), basato sull’utilizzo del colorante *SYBR Green*. Questa sonda è capace di legare il DNA a doppio strato (dsDNA), dando un segnale fluorescente che riflette la quantità di dsDNA generata durante la PCR (Zipper et al., 2004). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488$ nm ed emette luce verde $\lambda_{max} = 522$ nm. Altri picchi di assorbimento, sebbene più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto ($\lambda = 284$ nm e 382 nm). Per valutare i livelli di amplificato di GLUT-1 sono stati usati i seguenti *primer* specifici, appositamente disegnati:

forward: GCCCTTCGTGGGGCCCTG

reverse: AGGGGCCACAGGTCCTTG

Per la reazione è stato adottato il seguente programma di amplificazione: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 cicli di 45 secondi a 95°C e 1 min a 60°C. L’espressione relativa dell’ mRNA è stata calcolata utilizzando L32 (subunità della proteina ribosomiale 60S) come normalizzatore (*housekeeping gene*) e il metodo dei $\Delta\Delta C_t$.

I risultati ottenuti dalla qRT-PCR hanno evidenziato che i livelli dell’ mRNA di GLUT-1 sono significativamente aumentati nelle cellule in cui è stato indotto il gene p73, rispetto alle cellule controllo non indotte (Fig. 5). Inoltre, i livelli di mRNA sono stati trovati aumentati solo nelle linee esprimenti le due isoforme trascrizionalmente attive (TA) di p73, mentre le linee cellulari in cui è stata indotta l’espressione dell’ isoforma tronca del gene (ΔN), priva del dominio di transattivazione, non hanno presentato una variazione dei livelli di mRNA rispetto alla popolazione controllo.

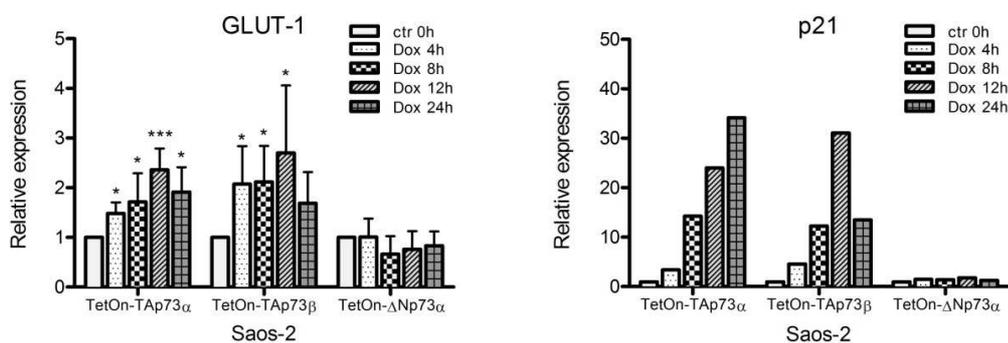


Fig. 5 Analisi quantitativa Real-Time PCR dell'espressione di GLUT-1 e p21 in seguito all'induzione delle varie isoforme di p73 nelle linee cellulari Saos2.

I livelli dell'mRNA di GLUT-1 sono aumentati nelle TAp73 α e Tap73 β (ma non nelle ANp73) dopo 4h di induzione, con un picco a 12h (a questo tempo l'espressione dell'mRNA raggiunge un plateau). Le cellule non indotte (Ctr 0h) sono state usate come controllo e L32 è stato usato come standard interno per il calcolo del $2^{A\Delta C}$. I livelli dell'mRNA di p21 sono stati quantificati al fine di confermare l'avvenuta induzione del transgene. Il grafico rappresenta la media \pm SEM di 4 esperimenti indipendenti analizzati in triplicato. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ verso il controllo (test "t" di Student).

I livelli di RNA messaggero di GLUT-1 aumentano nelle cellule indotte per TAp73 α e TAp73 β già dopo 4 ore di induzione, fino a raggiungere un picco dopo 12 ore di trattamento con la doxyciclina. L'effetto è più marcato per le Saos2 Tap73 β , in accordo con il maggiore potere trascrizionale dell'isoforma *beta* rispetto a quella *alpha*. La cinetica della modulazione è analoga a quella di p21, suggerendo che GLUT-1 potrebbe essere un *target* diretto di TAp73 α e TAp73 β .

5. Trasfezione della linea cellulare H1299 per l'overespressione di p73

Per confermare i dati ottenuti mediante *Real-Time* PCR, è stata effettuata una trasfezione transiente della linea cellulare H1299, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Le H1299 sono cellule di origine linfonodale derivanti da un carcinoma del polomone, a cellule non piccole, di un uomo maschio caucasico di 43 anni e presentano una parziale deplezione omozigote del gene p53 (perdendo completamente l'espressione della proteina p53). Le H1299 sono state trasfettate con i plasmidi HA-coniugati TAp73 α , TAp73 β , Δ Np63 α , p53 (*wild type*) e p53 R175H (mutato). Mediante l'analisi *western blot* degli estratti proteici è stata verificare l'efficienza della trasfezione, ibridando le membrane con un anticorpo anti-HA e anti-p21 (Fig. 6).

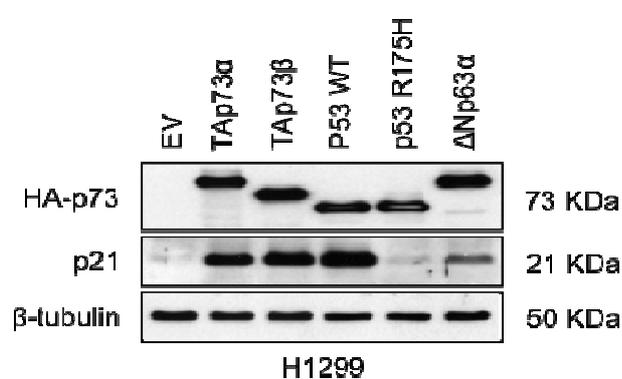


Fig. 6 Linee cellulari H1299 transfettate con i plasmidi HA-coniugati: TAp73 α , TAp73 β , Δ Np63 α , p53 (*wild type*) e p53 R175H (*mutato*).

L'efficienza della trasfezione è stata confermata mediante Western blot per la probe HA e per p21. La β -ubulina è stata usata come controllo interno.

In seguito ad estrazione dell'RNA e sua retrotrascrizione, seguita da analisi *qReal-Time* PCR, sono stati valutati i livelli dell'mRNA di GLUT-1 nelle cellule trasfettate. I dati ottenuti hanno confermato, come già osservato nelle Saos2, che TAp73 α e TAp73 β , inducono l'espressione di GLUT-1 (fig. 7).

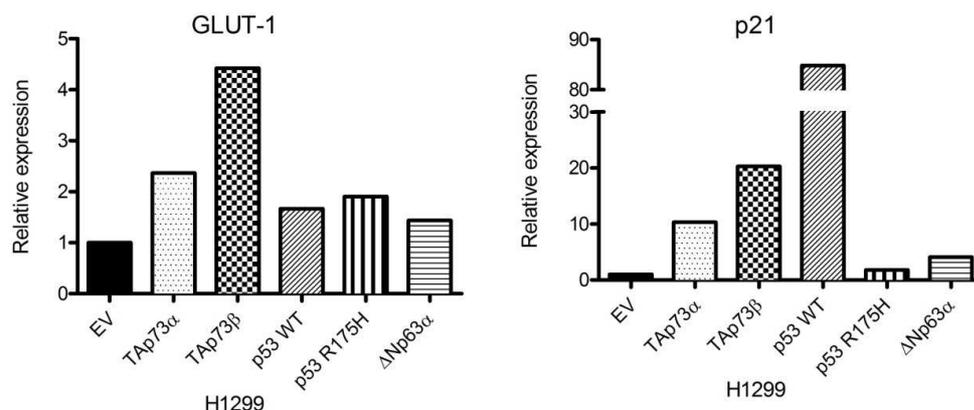


Fig. 7 Analisi qRT-PCR dei livelli di mRNA di GLUT-1 e p21 nelle linee cellulari H1299 transfettate.

L'analisi mostra un aumento dei livelli del trascritto di GLUT-1 sia nelle cellule transfettate con TAp73α che TAp73β. L32 è stato usato come standard interno per il calcolo del $2^{\Delta\Delta C_t}$. I livelli dell'mRNA di p21 sono stati quantificati al fine di confermare l'efficienza della trasfezione.

6. Analisi Western blot della proteina GLUT-1

Al fine di verificare che all'aumento del mRNA di GLUT-1 osservato mediante *Real-Time* PCR corrispondesse anche un aumento dell'espressione della proteina, è stato effettuato un *immunoblotting* utilizzando un anticorpo monoclonale specifico anti-GLUT-1 (Abcam 40084).

Nelle H1299 è stato apprezzato un aumento dei livelli di espressione della proteina GLUT-1 nelle linee cellulari transfettate con TAp73α e TAp73β rispetto alle cellule transfettate con l'*empty vector* (EV) (Fig. 8).

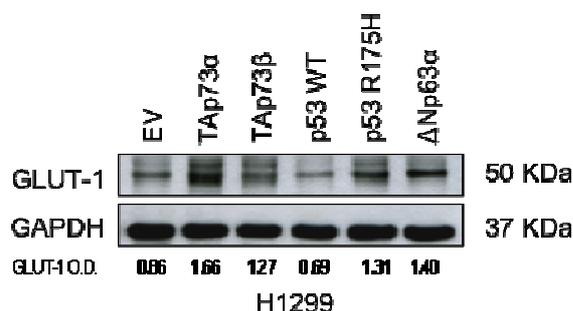


Fig. 8 Western blot per l'analisi dei livelli di espressione di GLUT-1 nelle cellule H1299 trasfettate. In basso è riportata l'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche di GLUT-1, normalizzata verso il controllo interno, GAPDH.

Anche nelle linee cellulari Saos2 TAp73 α indotte con doxiciclina per 24 ore è stato apprezzato un aumento nei livelli di espressione di GLUT-1, mentre nelle cellule indotte per l'isoforma Δ Np73 α i livelli della proteina non cambiano, confermando i dati ottenuti mediante *Real-Time* PCR (fig. 9).

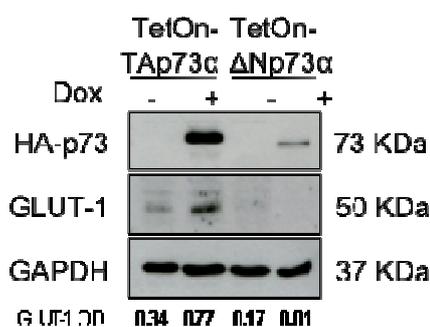


Fig. 9 Western blot per l'analisi dei livelli di espressione di GLUT-1 nelle cellule Saos2 indotte con doxiciclina (16h) per l'espressione del transgene TAp73 α o Δ Np73 α . In basso è riportata l'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche di GLUT-1, normalizzata verso il controllo interno, GAPDH. I livelli di espressione di GLUT-1 sono aumentati nelle cellule esprimenti l'isoforma TAp73 α (ma non in quelle esprimenti l'isoforma Δ Np73 α).

Tuttavia, essendo GLUT-1 una proteina integrale di membrana (con 7 regioni transmembrana), la sua analisi *Western blot* è complicata dalla comparsa di più bande. Come riportato nel *datasheet*, l'anticorpo anti-GLUT-1 generalmente riconosce due bande del peso molecolare apparente di 45 e 55 KDa, ma compaiono sulla lastra anche altre bande aspecifiche. Pertanto, data la difficoltà ad ottenere un'immagine affidabile relativa all'espressione di GLUT-1, per confermare l'aumento dei livelli della proteina, l'anticorpo anti-GLUT-1 è stato usato per un'analisi immunocitochimica.

7. Immunofluorescenza di GLUT-1 nelle Saos2 indotte con doxiciolina

Mediante immunofluorescenza è stata investigata l'espressione di GLUT-1 nelle Saos2 indotte con doxiciolina. Le cellule sono state piastrate su *coverslip* e il giorno dopo trattate con doxiciolina per 16 o 24h. Successivamente, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4%, lavate e bloccate con PBS contenente il 10% di *goat serum*, permeabilizzate con Triton-x100 allo 0,03% in PBS, incubate *overnight* con un anticorpo monoclonale anti-GLUT1 (1 µg/ml; Ab 40084) a +4°C. Dopo gli opportuni lavaggi, le cellule sono state incubate 1h a temperatura ambiente con un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse* (1:1000, A11-029, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e, infine, 5 minuti a temperatura ambiente con DAPI per la colorazione dei nuclei. I *coverslip* con le cellule sono stati montati su un vetrino portaoggetto e le immagini acquisite mediante un microscopio confocale, con un obiettivo 40x ad olio.

Nelle linee cellulari Saos2 indotte per TAp73 α è stata apprezzata una maggiore intensità di fluorescenza (nel verde) rispetto alla popolazione controllo non indotta (Fig. 10).

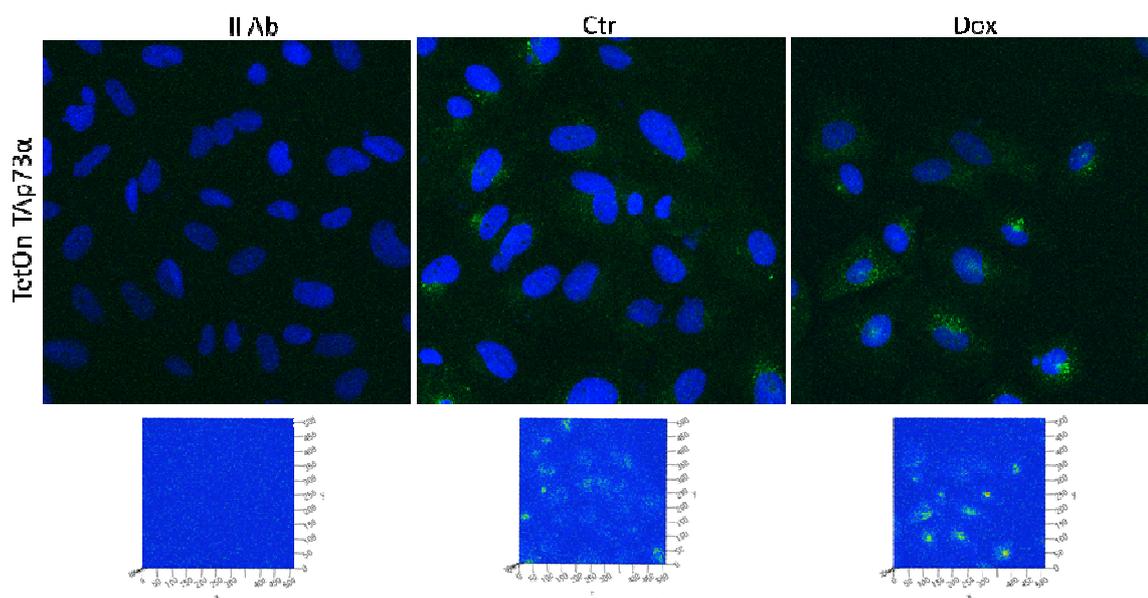


Fig. 10 Espressione di GLUT-1 nelle linee cellulari Saos2 TetOn-p73 TAp73 α .

Gli esperimenti di immunofluorescenza mostrano l'espressione di GLUT-1 (in verde) nelle cellule indotte per il gene TAp73 α . I nuclei cellulari sono stati marcati con il colorante DAPI (blu). Ogni immagine mostra una proiezione di una sezione di $\approx 0.9 \mu\text{m}$ acquisita tramite un microscopio confocale (Zeiss). Sotto ogni immagine viene mostrata la corrispondente analisi dell'intensità di fluorescenza totale. La fluorescenza verde aumenta nelle Saos2 TetOn-p73 TAp73 α dopo l'induzione del transgene con doxiciclina (Dox) per 24h, rispetto alle cellule controllo non trattate (Ctr). La fluorescenza verde scompare quando l'anticorpo primario viene omesso (II Ab, controllo negativo, sulla sinistra).

L'aumento della fluorescenza nel verde, attribuibile verosimilmente all'aumentata espressione di GLUT-1, è ancora più marcato nelle Saos2 indotte per TAp73 β (Fig. 11).

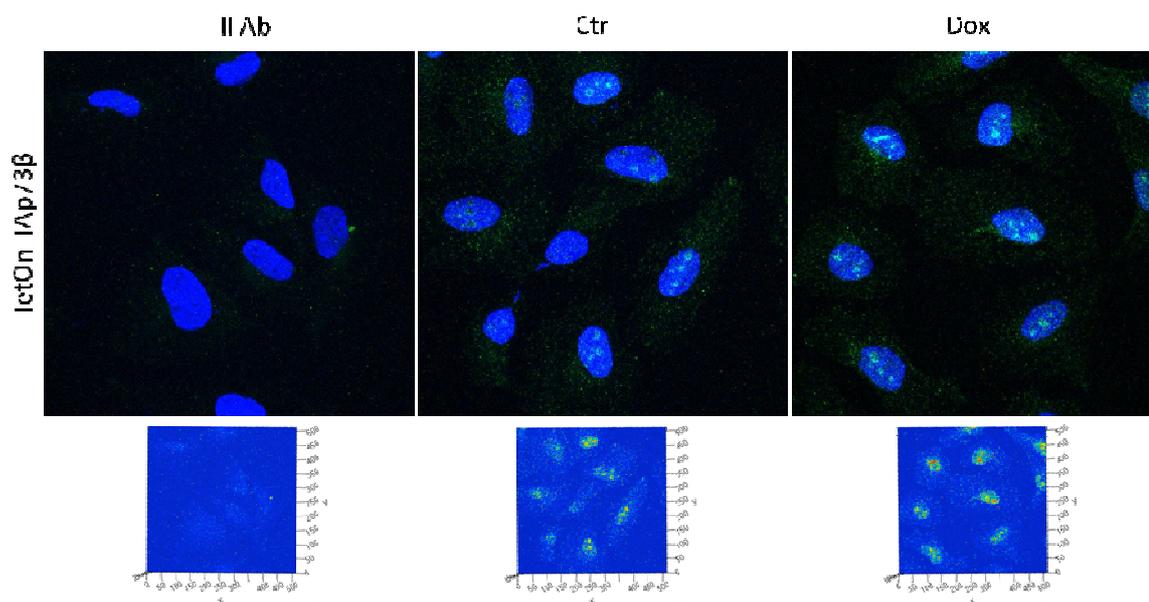


Fig. 11 Espressione di GLUT-1 nelle linee cellulari Saos2 TetOn-p73 TAp73 β .

Gli esperimenti di immunofluorescenza mostrano l'espressione di GLUT-1 (in verde) nelle cellule indotte per il gene TAp73 β . I nuclei cellulari sono stati marcati con il colorante DAPI (blu). Ogni immagine mostra una proiezione di una sezione di $\approx 0.9 \mu\text{m}$ acquisita tramite un microscopio confocale (Zeiss). Sotto ogni immagine viene mostrata la corrispondente analisi dell'intensità di fluorescenza totale. La fluorescenza verde aumenta nelle Saos2 TetOn-p73 TAp73 β dopo l'induzione del transgene con doxiciolina (Dox) per 16h, rispetto alle cellule controllo non trattate (Ctr). La fluorescenza verde scompare quando l'anticorpo primario viene omesso (II Ab, controllo negativo, sulla sinistra).

Anche l'immunofluorescenza, dunque, sembra confermare l'induzione del trasportatore del glucosio GLUT-1 nelle linee cellulari di osteosarcoma Saos2 esprimenti il gene TAp73 α o TAp73 β .

8. Analisi citofluorimetrica dei livelli di GLUT-1

Per confermare ulteriormente la capacità di TAp73 α e TAp73 β di indurre GLUT-1 è stata condotta un'analisi citofluorimetrica per valutare i livelli di espressione della proteina. In particolare, è stato utilizzato un protocollo di *staining* indiretto, in cui l'anticorpo primario che riconosce la proteina *target* non è coniugato ad un fluorocromo, ma viene rilevato da un anticorpo secondario fluorescente (es. FITC). Per l'esecuzione del saggio, le linee cellulari Saos2 indotte per le tre diverse isoforme di p73 (TAp73 α , TAp73 β e ANp73 α) e le rispettive popolazioni controllo sono state raccolte e fissate con metanolo per 5 minuti a temperatura ambiente, bloccate con PBS contenente il 10% di *goat serum* e incubate mezzora a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale anti-GLUT1 (1 ug/10⁶ cellule; Ab 40084). Dopo gli opportuni lavaggi, le cellule sono state incubate 30 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse* (1:250, A11-029, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e analizzate al citofluorimetro. Per controllo, sono state preparate sospensioni cellulari non sottoposte a *staining* (per valutare l'autofluorescenza delle cellule) e sospensioni cellulari incubate solo con l'anticorpo primario o secondario (per verificare la specificità del segnale positivo per GLUT-1).

Nelle Saos2 indotte per TAp73 α è stato osservato un *trend* all'aumento della fluorescenza nel canale FL-1 (relativo al numero di eventi positivi per GLUT-1), rispetto alle cellule controllo non trattate con la doxiciolina. Uno *shift* ancora più marcato è stato osservato nelle Saos2 indotte per Tap73 β , mentre non sono stati osservati cambiamenti dell'intensità di fluorescenza delle cellule Saos2 indotte per ANp73 α (fig. 12).

Anche l'analisi citofluorimetrica, quindi, sembra confermare la capacità di TAp73 α e Tap73 β , ma non di ANp73 α , di indurre l'espressione di GLUT-1.

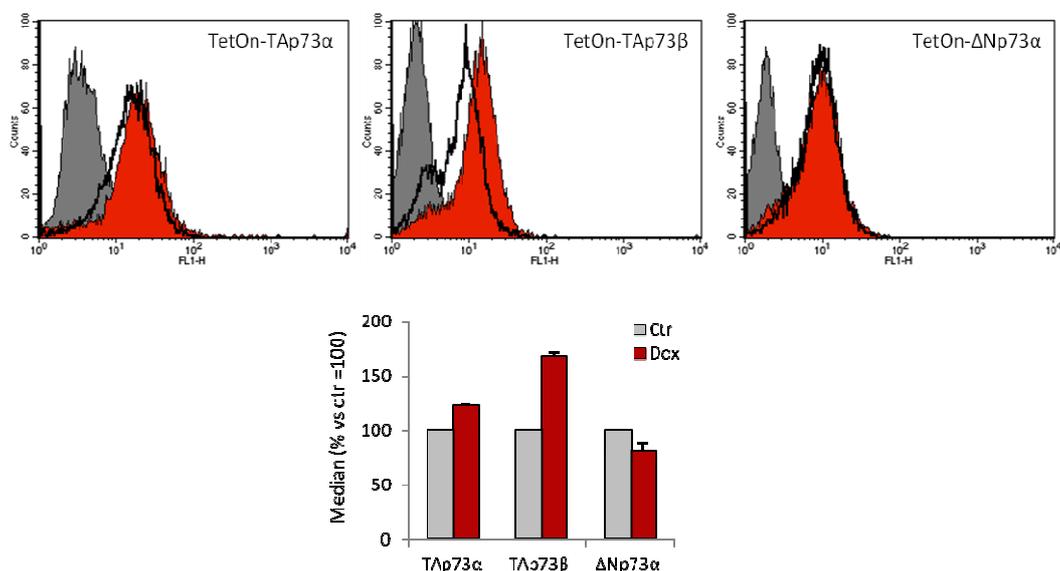


Fig. 12 Analisi citofluorimetrica dell'espressione di GLUT-1 nelle cellule Saos-2 TetOn-p73.

Per la visualizzazione citofluorimetrica di GLUT-1 è stato usato un protocollo di colorazione indiretta, ovvero, i campioni cellulari sono stati incubati con un anticorpo monoclonale specifico anti-GLUT-1 (Ab40084) e successivamente con un anticorpo secondario fluorescente (anti-mouse Alexa Fluor 488) capace di legarsi all'anticorpo primario. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata usando il programma CellQuest (Becton-Dickinson, CA, USA) e la distribuzione delle cellule in base all'intensità di fluorescenza di GLUT-1 (FL-1-H) viene mostrata negli istogrammi di frequenza (FL-1-H/counts). Nell'overlay è riportato in rosso il segnale del campione trattato con doxiciclina (16h) per l'induzione del transgene TAp73α o TAp73β o ΔNp73α, in trasparenza con bordo nero il segnale relativo alla popolazione controllo (non trattata) e in grigio il controllo negativo (cellule incubate con il solo anticorpo secondario). In basso è riportata la media del valore mediano (normalizzato verso il controllo) ottenuto da due esperimenti indipendenti, usando il programma CellQuest per l'analisi statistica dei dati.

9. Clonaggio del promotore di GLUT-1

Usando ALGGENE *software* e il *database* TRANSFAC, abbiamo ricercato nella regione promotore di GLUT-1 potenziali siti di legame per p53. In particolare, sono state trovate quattro sequenze consenso per p53 sul promotore del gene umano di GLUT-1, analizzando una regione di 2,5Kb a monte del sito di inizio della trascrizione.

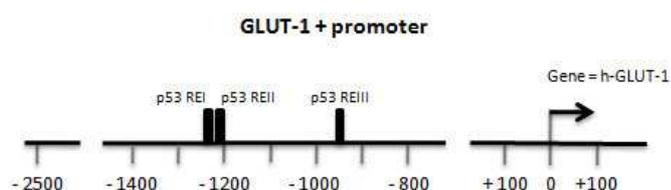


Fig. 14 Analisi del promotore di GLUT-1.

Nella regione promotrice del gene umano GLUT-1 vengono mostrati tre potenziali elementi responsivi per p53 (RE) (-1219/1240 paia di basi dall'ATG), p53 RE II (-1208/1230 paia di basi dall'ATG) and p53 RE III (- 956/978 paia di basi dall'ATG). L'analisi in silico è stata effettuata utilizzando il programma Genomatix MatInspector (Genomatix Software GmbH, München, Germany).

Per confermare in maniera incontrovertibile la transattivazione di GLUT-1 da parte dei membri della famiglia di p53, sono in corso esperimenti di ChIP (immunoprecipitazione della cromatina) e clonaggio della regione promotrice del gene umano di GLUT-1, che verrà utilizzata in saggi di luciferasi.

10. Conclusioni

In molti tipi di cellula tumorale il metabolismo del glucosio è fortemente incrementato e la glicolisi diventa la principale risorsa per la produzione di ATP (*Warburg effect*) (Warburg, 1956).

Recenti scoperte hanno confermato l'ipotesi che il metabolismo del glucosio regola le *pathway* di morte cellulare, attraverso meccanismi multipli che culminano nella regolazione di proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2, come Bax, per il controllo dell'apoptosi. Ad esempio, è stato dimostrato che il mantenimento del metabolismo del glucosio attraverso l'overespressione di Glut1 e/o HK1, sia in linee cellulari continue che primarie, stabilizza Mcl-1 e attenua la morte cellulare indotta dalla rimozione dei fattori di crescita (Zhao *et al.*, 2008; Zaho *et al.*, 2007).

L'overespressione di GLUT-1 è stata trovata in tumori della mammella, della tiroide, del pancreas, del polmone e dello stomaco (si veda: Schwartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004). In alcuni casi, l'overespressione di GLUT-1 è correlata a una prognosi negativa (Mediana *et al.*, 2002).

I risultati prodotti durante questi sei mesi di attività di ricerca all'estero hanno permesso di dimostrare che GLUT-1 è indotto, almeno *in vitro*, da due isoforme di p73: TAp73 α e TAp73 β .

La conoscenza dei fattori trascrizionali che regolano l'espressione di GLUT-1 è importante al fine di poter controllare, farmacologicamente o mediante terapia genica, il metabolismo delle cellule tumorali, incrementando la loro suscettibilità ai farmaci chemioterapici. In quest'ottica, i risultati ottenuti potrebbero essere molto rilevanti.

Bibliografia

- BISSO A, COLLAVIN L, DEL SAL G. (2011) p73 as a Pharmaceutical Target for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design*; **17**: 578-590
- BROSH R, ROTTER V. (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*; **9**: 701-13.
- CHOMCZYNSKI P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*; **15**: 532-537.
- COLLAVIN L, LUNARDI A, DEL SAL G. (2010) p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Diff*; **17**: 901-11.
- FLIER JS, MUECKLER MM, USHER P, LODISH HF. (1987) Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*; **235**:1492-5.
- FOGH J, WRIGHT WC, LOVELESS JD. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 celllines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*; **58**:209-14.
- GROB TJ, NOVAK U, MAISSE C, BARCAROLI D, LÜTHI AU, PIRNIA F, HÜGLI B, GRABER HU, DE LAURENZI V, FEY MF, MELINO G, TOBLER A. (2001) Human delta Np73 regulates a Dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*; **8**:1213-1223.
- HATANAKA M. (1974) Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta*; **355**:77-104.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. (1996) Quantitative Real Time PCR. *Genome Res*; **6**:986-994.
- KAHN BB. (1992) Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest*; **89**:1367-74.
- KILLICK R, NIKLISON-CHIROU M, TOMASINI R, BANO D, RUFINI A, GRESPI F, VELLETRI T, TUCCI P, SAYAN BS, CONFORTI F, GALLAGHERE, NICOTERA P, MAK

- TW, MELINO G, KNIGHTR A, AGOSTINI M. (2011) p73: A Multifunctional Protein in Neurobiology. *Mol Neurobiol*; **43**:139–146.
- MEDINA RA, OWEN GI. (2002) Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res*; **35**:9–26.
- MULLER M, SCHILLING T, SAYAN AE, KAIRAT A, LORENZ K, SCHULZE-BERGMEN H, OREN M, KOCH A, TANNAPFEL A, STREMMEL W, MELINO G, KRAMMER PH. (2005) TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*; **12**:1564–1577.
- MURRAY-ZMIJEWSKI F, SLEE EA, LU X. (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **9**: 702-12.
- NAKANO K, BÁLINT E, ASHCROFT M, VOUSDEN KH (2000) A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene*; **19**(37):4283-9.
- POZNIAK CD, RADINOVIC S, YANG A, MCKEON F, KAPLAN DR, MILLER FD. (2000) An antiapoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*; **289**:304–306.
- ROSENBLUTH JM, MAYS DJ, JIANG A, SHYR Y, PIETENPOL JA. (2011) Differential regulation of the p73 cistrome by mammalian target of rapamycin reveals transcriptional programs of mesenchymal differentiation and tumorigenesis. *PNAS*; **108**: 2076–2081.
- RUFINI A, AGOSTINI M, GRESPI F, TOMASINI R, SAYAN BS, NIKLISON-CHIROU MV, CONFORTI F, VELLETRI T, MASTINO A, MAK TW, MELINO G, KNIGHT RA. (2011) p73 in Cancer. *Genes Cancer*; **2**(4):491-502.
- SAIKI R, GELFAND D, STOFFEL S, SCHARF S, HIGUCHI R, HORN G, MULLIS K, ERLICH H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*; **239** (4839): 487–91.
- SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH F, ARMONI M, KARNIELI E. (2004) The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression. *Canc Res*; **64**: 2627–2633.
- SMITH TA. (2000). Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *B J Biomed*

Sci; **57**: 170–178.

VOUSDEN KH, PRIVES C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*; **137**: 413-31.

WANG J, LIU YX, HANDE MP, WONG AC, JIN YJ, YIN Y. (2007) TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. *J Biol Chem*; **282**:29152–29162.

WARBURG O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*; **123**: 309–314.

YOUNES M, BROWN RW, STEPHENSON M, GONDO M, CAGLE PT. (1997). Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer*; **80**: 1046–1051.

ZIPPER H, BRUNNER H, BERNHAGEN J, VITZTHUM F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*; **32**(12):e103.

Pubblicazioni

BERLIOCCHI L, CIOCIARO A, RUSSO R, CASSIANO MGV, BLANDINI F, ROTIROTI D, MORRONE LA, CORASANITI MT. (2011) Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Food Chem Toxicol.*; **49**:2780-92.