



Programma CNR Mobilità di breve durata – anno 2010

Titolo del programma: Segnalazione retrograda mitocondriale e risposta cellulare allo stress

Proponente e Fruitore: Dr. Sergio Giannattasio

Istituto di appartenenza: Istituto di Biomembrane e Bioenergetica (IBBE)

Relazione scientifica dell'attività svolta presso il Department of Biological Sciences dell'Università di New Orleans (UNO), LA-USA dal 15/10 al 2/11/2010

Gli studi effettuati sui meccanismi di morte cellulare programmata indotta da acido acetico (AA-PCD) in cellule di *Saccharomyces cerevisiae* hanno permesso di determinare il decorso temporale di alcuni eventi biochimici durante il processo di morte cellulare [1-8]. In seguito al trattamento con acido acetico a pH 3.00 le cellule di lievito perdono completamente la vitalità dopo 200 min. A 15 min si misura un alto livello di H₂O₂ che diminuisce fino a non essere più misurabile a 60 min. Il rilascio del citocromo c come proteina funzionale da mitocondri accoppiati inizia a 60 min ed è completo a 150 min. Nella fase finale dell'AA-PCD si verifica un graduale disaccoppiamento dei mitocondri con diminuzione del $\Delta\psi$ e disfunzione della citocromo c ossidasi e un incremento dell'attività caspasi-simile con un massimo a 200 min.

Le cellule eucariotiche rispondono a cambiamenti dello stato funzionale dei mitocondri mediante attivazione della via di segnalazione "retrograda" (RTG) mitocondri-nucleo che determina adattamento cellulare mediante variazione dell'espressione di specifici geni nucleari, quali quelli che codificano per enzimi coinvolti in reazioni anaplerotiche del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) che forniscono acetil-CoA e citrato ai mitocondri, proteine perossisomiali e proteine coinvolte nella β -ossidazione degli acidi grassi. E' quindi interessante studiare se esiste e quale sia il ruolo della segnalazione RTG nell'AA-PCD di cellule di lievito e, più in generale, nella risposta cellulare allo stress

La risposta retrograda mitocondriale è stata studiata in modo approfondito in cellule di *S. cerevisiae* [9] nelle quali, tra l'altro, determina longevità in caso di disfunzione/danno mitocondriale o di carenza di nutrienti [10]. Il meccanismo di attivazione della risposta RTG è mediato dal fattore di trascrizione etoridimerico Rtg1/3p, normalmente localizzato nel citoplasma, che migra nel nucleo in risposta ad una disfunzione mitocondriale, e riconosce una specifica sequenza nucleotidica (R box) a 5' dei geni bersaglio. Rtg2p e Mks1p sono, rispettivamente, un regolatore positivo ed uno negativo della trascrizione dei geni retrogradi Rtg1/3-dipendenti. Esistono due gruppi di geni bersaglio della segnalazione retrograda: il primo comprende i geni DLD3 e CIT2, codificanti, rispettivamente, per la D-lattato deidrogenasi citoplasmatica e la citrato sintasi perossisomiale, che mostrano una robusta attivazione trascrizionale in risposta a disfunzioni mitocondriali. L'overespressione del gene CIT2 è indicativo dell'attivazione della risposta retrograda. Un secondo gruppo comprende diversi geni di enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) la cui trascrizione risulta non essere attivata esclusivamente dal fattore retrogrado Rtg1/3 in risposta a disfunzioni mitocondriali. Questo gruppo comprende i geni CIT1, ACO1 e IDH1/2, codificanti gli enzimi dei primi tre stadi del ciclo dei TCA, rispettivamente, la citrato sintasi mitocondriale, l'aconitasi e l'isocitratodeidrogenasi NAD⁺-dipendente. In cellule con una attiva respirazione l'espressione di questi quattro geni è sotto il controllo del fattore Hap2,3,4,5, che regola la funzionalità mitocondriale coordinando l'espressione dei geni nucleari e mitocondriali nel passaggio da un metabolismo fermentativo ad uno respiratorio (*diauxic-shift*) [11]. In cellule con funzionalità mitocondriale ridotta o compromessa la trascrizione dei geni CIT1, ACO1 e IDH1/2 passa sotto il controllo del fattore di trascrizione retrogrado Rtg1/3.



E' stato dimostrato che l'acido acetico induce la PCD in cellule di lievito cresciute in presenza di glucosio (fonte di carbonio fermentabile che reprime l'espressione di geni coinvolti nella respirazione) ma non in presenza di raffinosisio (fonte di carbonio fermentabile ma che non reprime la respirazione). L'analisi dei livelli dei trascritti in cellule trattate con AA in glucosio o raffinosisio, mostra la specifica over-espressione dell'mRNA del gene CIT2 in cellule cresciute in raffinosisio resistenti all'induzione dell'AA-PCD, suggerendo attivazione di una risposta retrograda mitocondriale.

Al fine di studiare se esiste e quale sia il ruolo della segnalazione RTG nell'AA-PCD di cellule di lievito e, più in generale, nella risposta cellulare allo stress, durante il soggiorno del Dr. Giannattasio presso il Department of Biological Sciences dell'UNO sono stati preparati i seguenti ceppi mutanti singoli e doppi di cellule W303-1B *knock-out* per i geni RTG2, RTG3, MKS1 e HAP4:

ceppo	genotipo	origine
W303-1B	MATa ade2 leu2 his3 trp1 ura3	Liu Lab stock
w303-1B rtg2	rtg2::LEU2	Liu Lab stock
w303-1B rtg3	rtg3::LEU2	Liu Lab stock
w303-1B mks1	Mks1::kanMX4	Questo studio
w303-1B hap4	Hap4::kanMX4	Questo studio
w303-1B rtg2 mks1	rtg2::LEU2 Mks1::kanMX4	Questo studio
w303-1B rtg3 mks1	Rtg3::LEU2 Mks1::kanMX4	Questo studio
w303-1B rtg2 hap4	rtg2::LEU2 hap4::kanMX4	Questo studio
w303-1B rtg3 hap4	Rtg3::LEU2 hap4::kanMX4	Questo studio

E' stato avviato lo studio della sensibilità all'acido acetico dei ceppi *knock-out* in presenza di glucosio o raffinosisio. Cellule di lievito w303-1B rtg2, mancanti del fattore di regolazione positiva della risposta retrograda mitocondriale, cresciute in raffinosisio mostrano una vitalità del 40% dopo 200 min di trattamento con AA diversamente dalle cellule wt la cui vitalità risulta dell'80% allo stesso tempo di trattamento nelle stesse condizioni sperimentali. Questo dato preliminare dimostra che la disattivazione della segnalazione retrograda abolisce parzialmente la resistenza all'induzione dell'AA-PCD in cellule di lievito in presenza di raffinosisio.

Esiste una forte omologia di inibitori e meccanismi regolatori fra la risposta retrograda mitocondriale di lievito e la risposta allo stress mediata dal fattore di trascrizione *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) nei mammiferi [12]. Dato l'alto grado di conservazione di geni e proteine fra *S. cerevisiae* e gli eucarioti superiori e la conoscenza approfondita del meccanismo di regolazione della segnalazione retrograda mitocondriale in *S. cerevisiae*, il lievito è un sistema modello ideale per lo studio delle relazioni fra i meccanismi di risposta cellulare allo stress e quelli di PCD, la cui disfunzione è alla base di patologie quali la neurodegenerazione e il cancro.

I ceppi di lievito *knock-out* preparati e i dati preliminari ottenuti durante il soggiorno del Dott. Giannattasio presso l'UNO forniranno le basi per proseguire un progetto collaborativo fra l'IBBE e il Department of Biological Sciences dell'UNO sullo studio del coinvolgimento della segnalazione retrograda nel meccanismo di AA-PCD e nella risposta allo stress in *S. cerevisiae* al fine di:



- chiarire il ruolo dei mitocondri nella PCD e se e come la "risposta retrograda" a cambiamenti di stato funzionale dei mitocondri possa influenzare la risposta cellulare allo stress;
- caratterizzare il ruolo di nuovi geni regolatori della PCD.

Bibliografia

1. S. Giannattasio, N. Guaragnella, M. Corte-Real, S. Passarella, E. Marra (2005) *Gene*, 354, 93-98.
2. N. Guaragnella, C. Pereira, M. J. Sousa, L. Antonacci, S. Passarella, M. Corte-Real, E. Marra and S. Giannattasio (2006) *FEBS Lett.* 580, 6880-6884.
3. N. Guaragnella, L. Antonacci, S. Passarella, E. Marra, S. Giannattasio (2007) *Folia Microbiol.* 52, 237-240.
4. Guaragnella N., Antonacci L., Giannattasio S., Marra E., Passarella S. (2008) *FEBS Lett.* 582, 210-214.
5. Valenti D., Vacca R.A., Guaragnella N., Passarella S., Marra E., Giannattasio S. (2008) *FEMS Yeast Res.* 8, 400-404.
6. Giannattasio S., Atlante A., Antonacci L., Guaragnella N., Lattanzio P., Passarella S., Marra E. (2008) *FEBS Lett.* 582, 1519-1525.
7. Guaragnella N., Bobba A., Passarella S., Marra E. and Giannattasio S. (2010) *FEBS Lett.* 584, 224-228.
8. Guaragnella N, Passarella S, Marra E, Giannattasio S. (2010) *FEBS Lett.* 584:3655-60.
9. Liu Z and Butow RA. (2006) *Annu Rev Genet.* 40:159-85.
10. Wang J, Jiang JC and Jazwinski SM. (2010) *Exp Gerontol.* 45:621-31.
11. Buschlen S, Amillet JM, Guiard B, Fournier A, Marcireau C and Bolotin-Fukuhara M. (2003) *Comp Funct Genomics.* 4:37-46.
12. Srinivasan V, Kriete A, Sacan A and Michal Jazwinski S. (2010) *Aging Cell* doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00622.x.

Dr. Sergio Giannattasio