UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

INDUZIONE DI PROCESSI AUTOFAGICI, APOPTOCI E EPIGENITICI IN *ZEBRAFISH* SOTTOPOSTI A STRESS NUTRIZIONALE.

INDUCTION OF AUTOPHAGICAL, APOPTOTIC AND EPIGENITIC PROCESSES INTO *ZEBRAFISH* SUBJECTED TO NUTRITIONAL STRESS.

Tesi di Laurea di:

Roberta Mesce

Docente Referente di:

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Maradonna

Sessione Straordinaria Febbraio 2021

Anno Accademico 2019/2020

INTRODUZIONE

L’autofagia e l’apoptosi sono due meccanismi che entrano in gioco in risposta a condizioni di stress.

La cellula, in carenza di nutrienti o in condizioni ambientali sfavorevoli, tende a degradare e riciclare le componenti cellulari danneggiate.

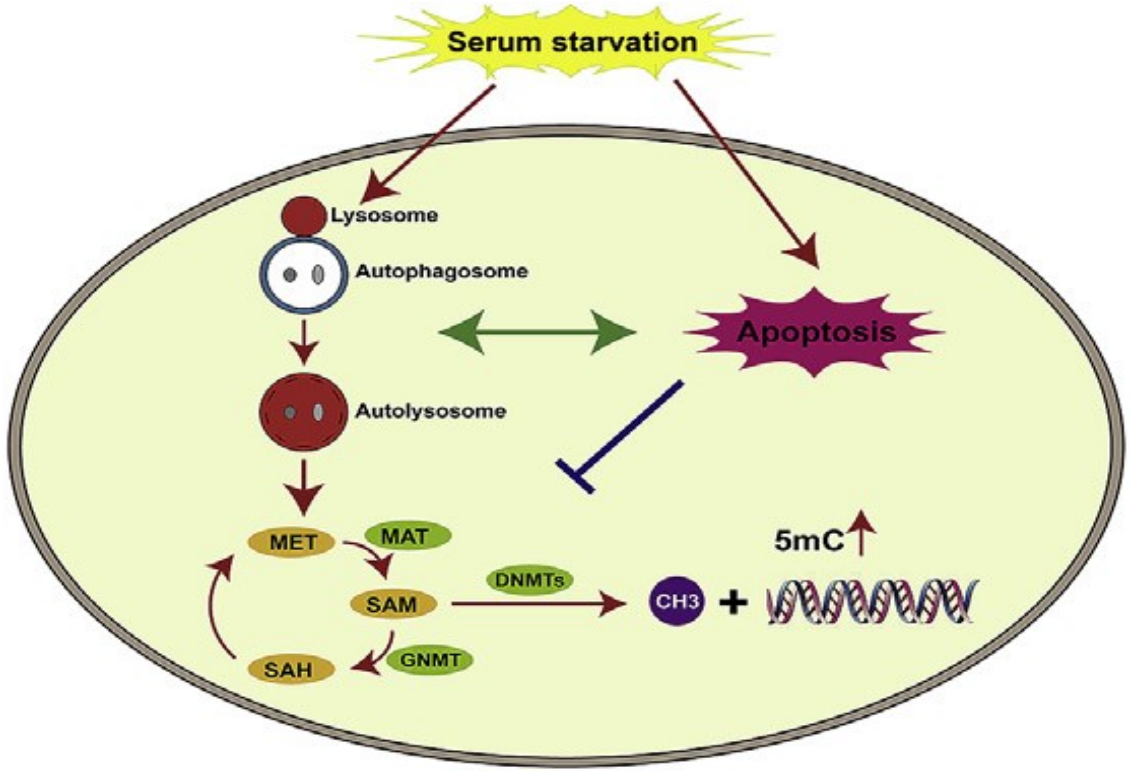
Nel momento in cui la cellula non riesce a compensare lo stress, attiva il meccanismo di apoptosi.

L’autofagia e l’apoptosi sono due processi separati ma entrambi fondamentali per determinare il destino delle cellule, in maniera combinata o esclusiva.

Numerose ricerche indicano che, sotto stress ambientale, molteplici meccanismi epigenetici, come la metilazione del DNA, possono influire sulla sopravvivenza.

SCOPO

Valutare l'insorgenza di processi apoptotici, autofagici e alterazioni epigenetiche in linee di fibroblasti di *Zebrafish*, stressate in seguito alla presenza di basse quantità di nutrienti nel mezzo di coltura.



MATERIALI E METODI

La linea cellulare ZF4 è stata mantenuta a 28°C e con 5% di CO_2 e inoculata nel terreno a 28°C in un'atmosfera umidificata col 5% di CO_2 e inoculate nel terreno DMEM/F12 con 10% di siero fetale bovino (FBS) e di 1% di antibiotici.

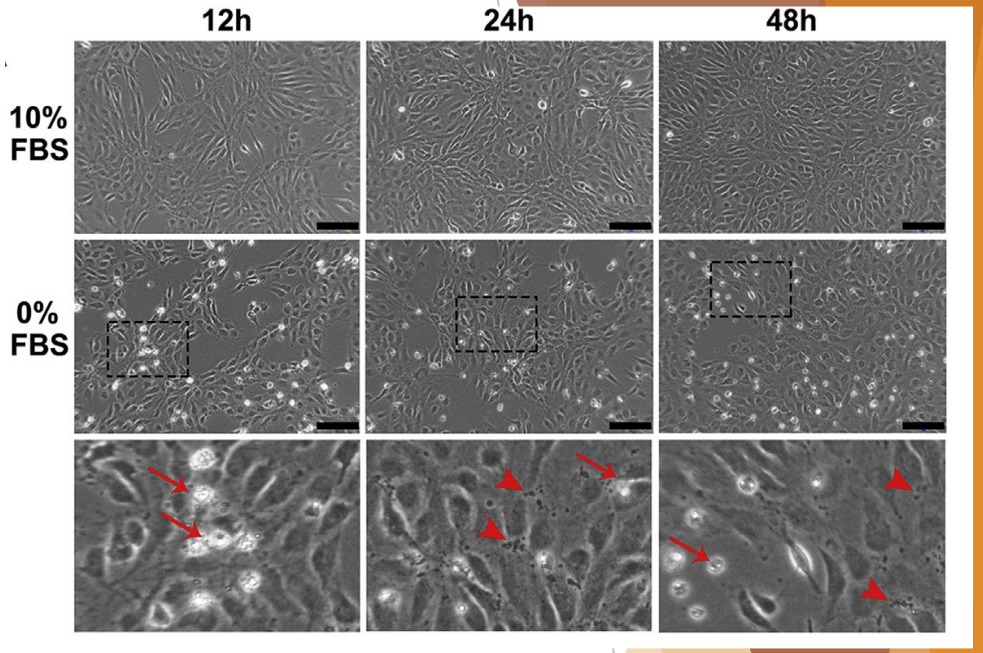
Parte di questa coltura cellulare è stata utilizzata per verificare l'effetto della deprivazione di nutrienti. Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura fresco, senza FSB (ossia 0% FBS) per 12, 24, e 48 ore.

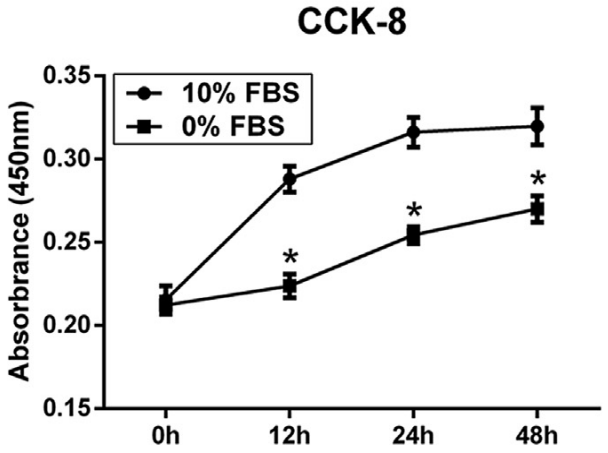
Tutti i trattamenti sono stati ripetuti in triplicato.

CONTA DELLE CELLULE VITALI

Le cellule ZF4 sono state trattate con un reagente (CCK-8) per 2 ore a 28°C e poi è stata misurata l'assorbanza a 450 nm.

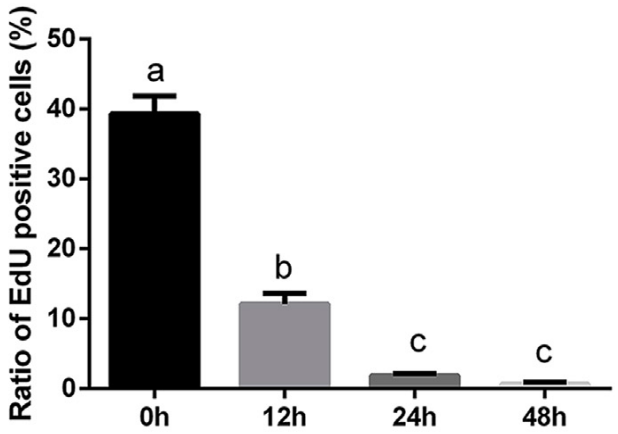
Le cellule coltivate con 0% di FBS erano ostacolate nella crescita e presentavano densità cellulare ridotta.



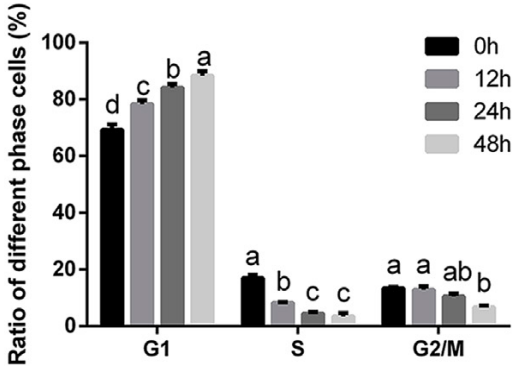


La vitalità cellulare rilevata da CCK-8 ha mostrato diminuzioni significative a 12, 24 e 48 ore dalla privazione del siero (hps) rispetto al gruppo di controllo.

ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE



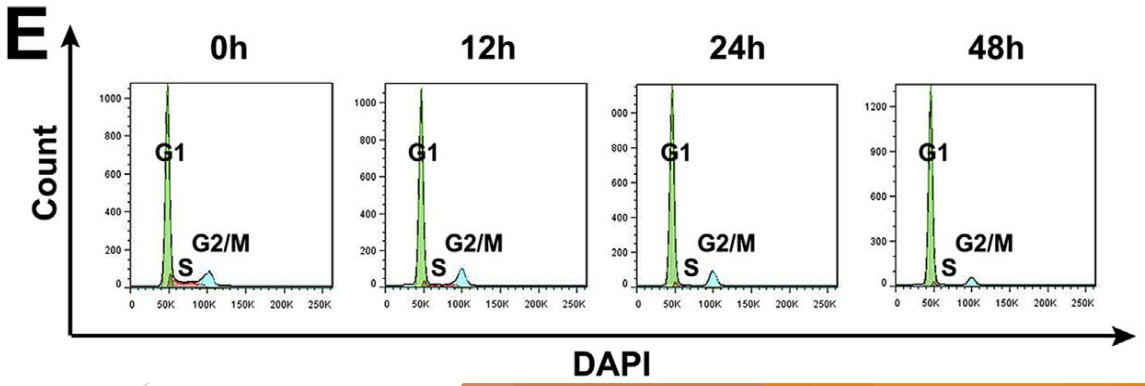
Il saggio con la 5-etinil-2´-deossiuridina(EdU) è stato usato per visualizzare le cellule in proliferazione. La proliferazione si è ridotta in modo dipendente dal tempo da 0 a 48 hps.



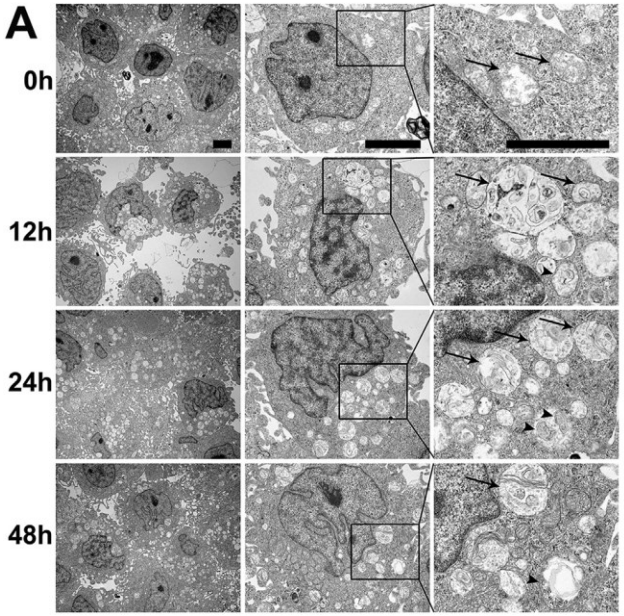
Nell'analisi del ciclo cellulare sono stati osservati:

- aumenti significativi delle cellule in fase G1.
- diminuzioni significative delle cellule in fase S in modo dipendente dal tempo da 0 a 48 hps.
- diminuzioni significative delle cellule in fase G2/M a 48 hps.

Questi risultati hanno dimostrato che l'assenza di siero ha inibito la replicazione del DNA, influenzando il ciclo cellulare e di conseguenza la proliferazione delle cellule.

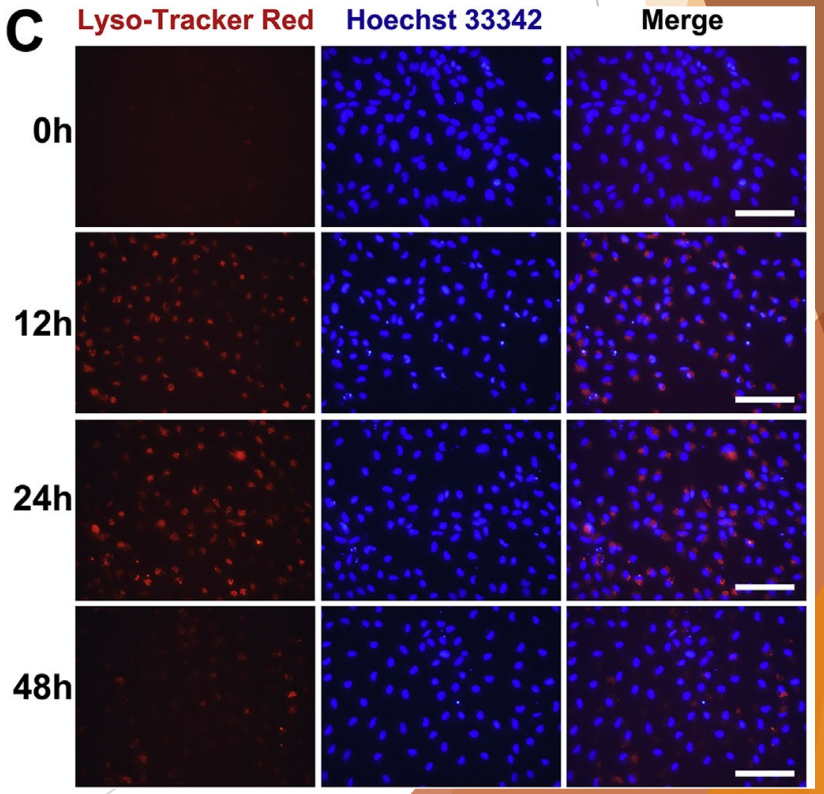


RILEVAMENTO DELL'ATTIVITA' LISOSOMIALE



Le cellule sono state incubate con il Lyso-Tracker Red, per visualizzare i lisosomi, nei rispettivi terreni di cultura a 28° C per 2 ore.

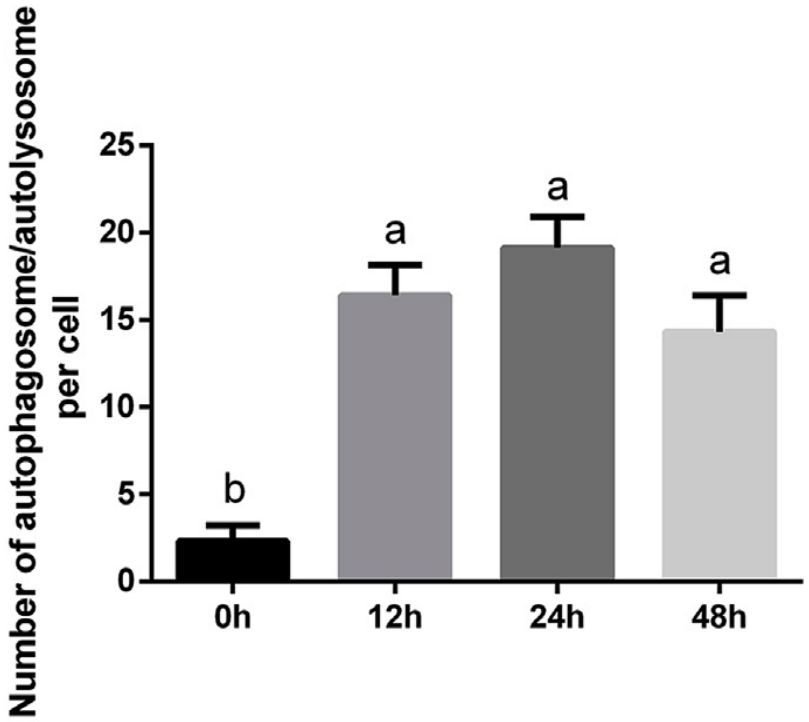
Dopodiché il nucleo è stato marcato con Hoechst 33342 per 10 minuti e poi sono state osservate al microscopio a fluorescenza.

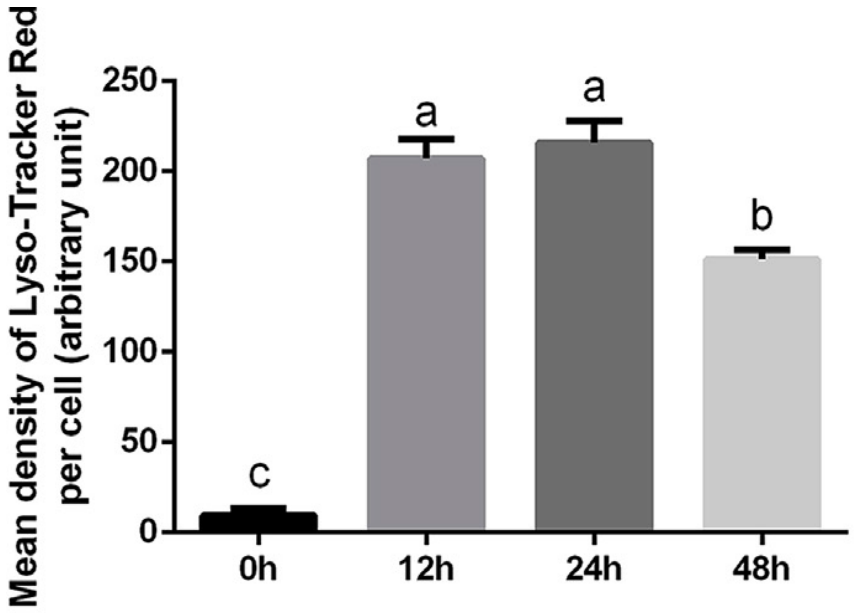


Per osservare l' ultrastruttura degli autofagosomi/autolisosomi, le cellule sono state fissate e sezionate per mezzo di un microtomo. Sono stati poi esaminati con un microscopio elettronico a trasmissione.

Lo stress causato dall'assenza di siero ha indotto:

- l'accumulo di autofagosomi/autolisosomi perinucleari a 12 e 24 hps e una riduzione relativa da 24 a 48 hps.
- l'aumento della quantità di lisosoma a 12 hps e 24 hps e relativa diminuzione a 48 hps.

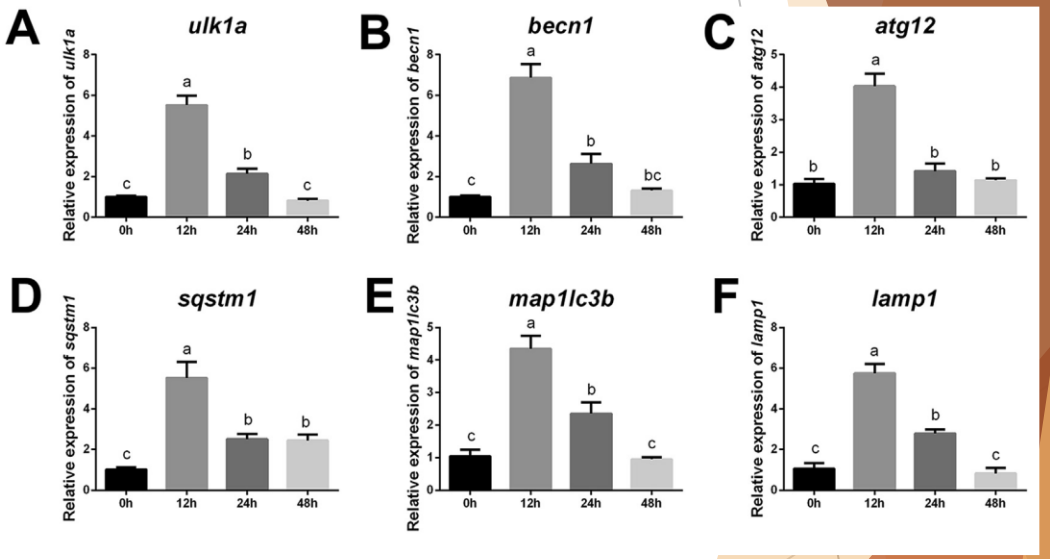




ANALISI DELL'mRNA E DEI GENI AUTOFAGICI

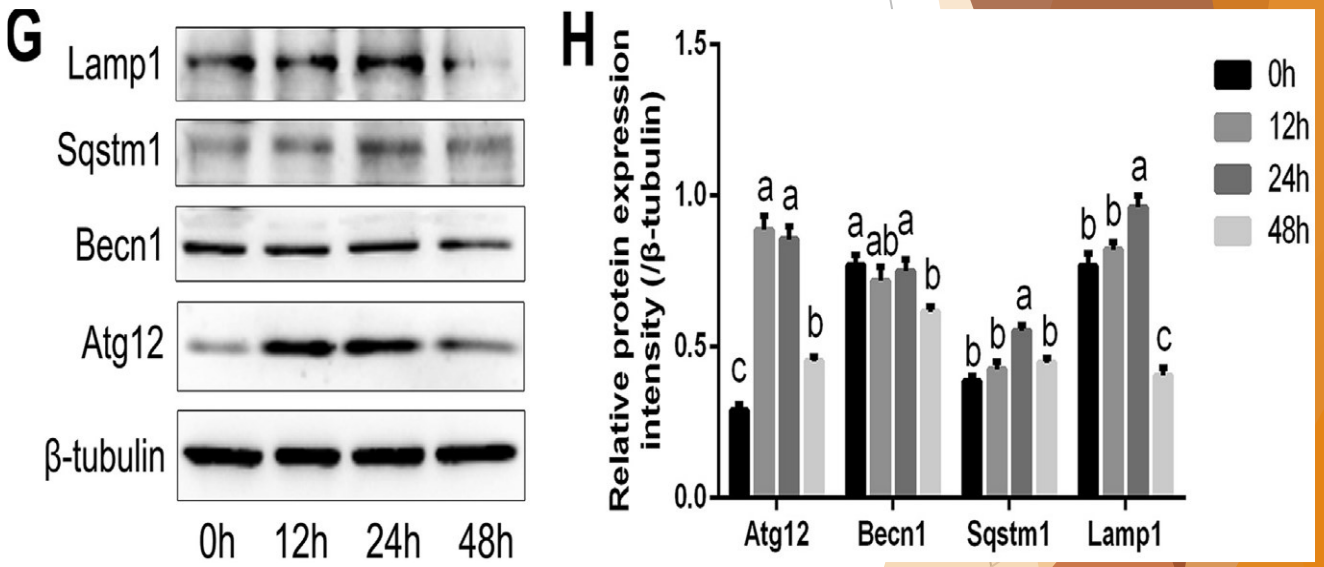
L'RNA totale è stato estratto dalle cellule ZF4 e l'espressione di mRNA coinvolti nell'autofagia è stata quantificata tramite real-time PCR.

- le trascrizioni di ulk1a, becn1, sqstm1, map1lc3b, e lamp1 erano marcatamente aumentate sia a 12 che a 24 hps.
- l'espressione di atg12 è stata significativamente upregolata a 12 hps.
- i trascritti di ulk1a, becn1, atg12, map1lc3b, e lamp1 a 48 hps, erano gradualmente vicini a quello del gruppo di controllo.
- la trascrizione di sqstm1 è risultata significativamente aumentata.

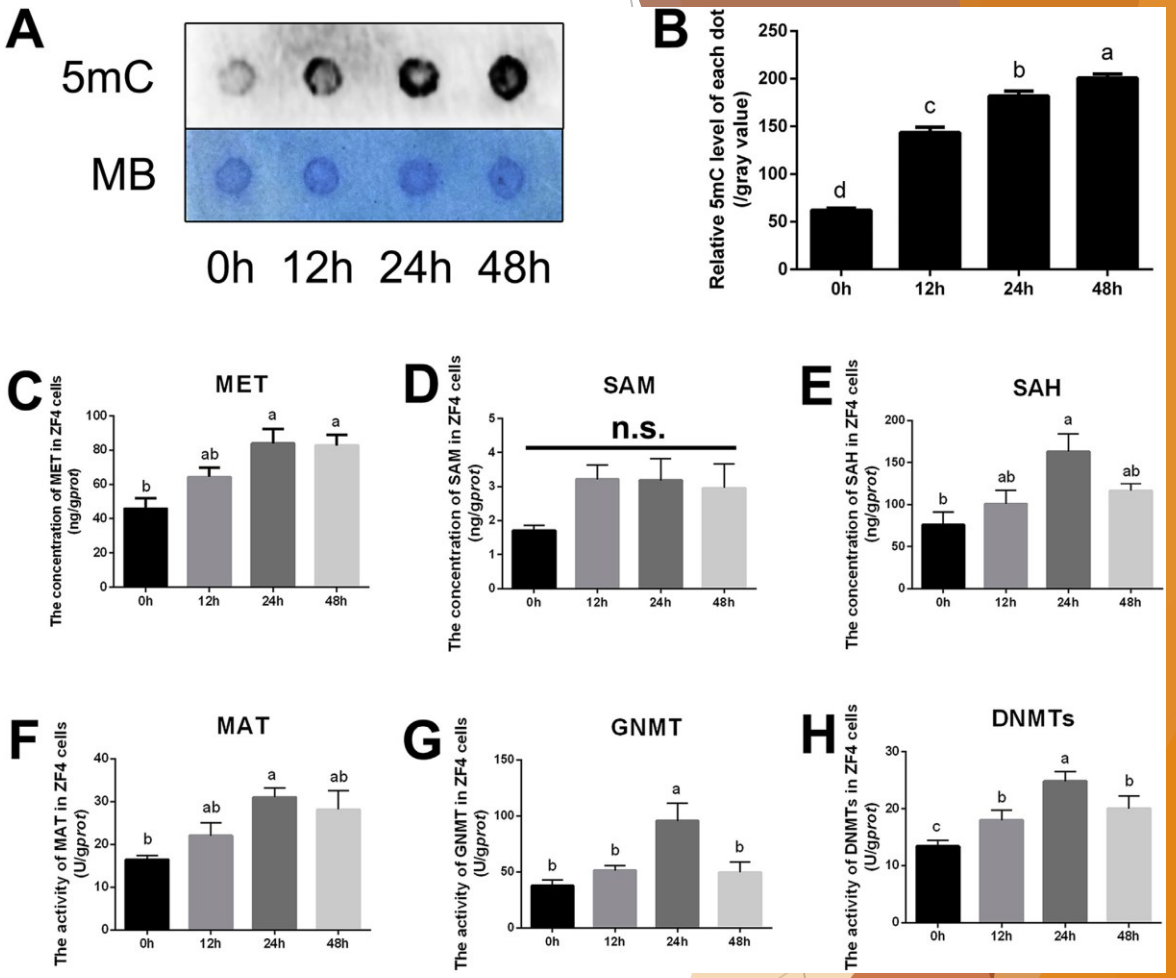


ANALISI DELLE PROTEINE AUTOFAGICHE

- L'espressione delle proteine autofagiche è stata analizzata tramite il Western blot.
  - Il livello di Atg12 era marcatamente elevato a 12 e 24 hps.
  - Sqstm1 e Lamp1 sono stati significativamente upregolati solo a 24 hps.
  - Tutte le espressioni di Atg12, Becn1, Sqstm1 e Lamp1 sono state distintamente down-regolate da 24 a 48 hps.



- Le quantità di metionina (MET), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilomocisteina (SAH) e le attività di metionina adenosiltransferasi (MAT), glicina N-metiltransferasi (GNMT), DNMT sono state misurate con ELISA.
  - Il contenuto di SAH è aumentato nelle 24 hps.
  - Le attività di MAT e GNMT sono aumentate a 24 hps, mentre non avevano cambiamenti significativi in altri momenti.
  - L'attività di DNMTs è aumentata in condizioni di stress e ha mostrato il livello più alto a 24 hps.



Questi cambiamenti sono in accordo con l'attività autofagica e vengano soppressi quando l'apoptosi aumenta.

CONCLUSIONI

- In condizioni di stress la cellula va incontro inizialmente a una fase di autofagia, per preservare la propria integrità, e in un secondo momento ad apoptosi.
- I livelli di 5mc sono drasticamente aumentati con l'aumentare dell'attività autofagica, così come sono aumentate le proteine MET, SAM e SAH.
- La transmetilazione del DNA diminuisce drasticamente con il passaggio da autofagia a apoptosi.

La privazione di siero nelle cellule di *Zebrafish* ha ostacolato la crescita e la proliferazione, ha cambiato la forma delle cellule, ha diminuito la vitalità delle cellule e arrestato il ciclo cellulare in modo dipendente dal tempo. L'attività autofagica è importante per la sopravvivenza nella fase iniziale e l'apoptosi si attua nella fase successiva. Inoltre, l'attività autofagica potrebbe aumentare il metabolismo del gruppo metile, che conduce all'aumento del livello globale 5mC.