



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

16° Corso di formazione avanzata

**Autofagia:
fisiologia e malattie correlate**

26-28 aprile 2017, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Giampaolo Merlini

16° Corso di formazione avanzata

Autofagia: fisiologia e malattie correlate



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

16° Corso di formazione avanzata

**Autofagia:
fisiologia e malattie correlate**

26-28 aprile 2017, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Giampaolo Merlini

© Copyright 2017 

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag. VII
<i>Giampaolo Merlini</i>	
1. Le basi molecolari dell'autofagia.....	» 1
<i>Francesco Cecconi</i>	
2. Fagociti professionisti e dilettanti	» 7
<i>CarloAlberto Redi</i>	
3. Christian de Duve e Yoshinori Ōsumi: autofagia – fagocitosi – autofagia	» 16
<i>Manuela Monti</i>	
4. Regolazione dell'autofagia e sue applicazioni in patologia	» 22
<i>Mauro Piacentini</i>	
5. Metodi di Ingegneria Tissutale per lo studio dell'autofagia	» 30
<i>Lorenzo Fassina</i>	
6. Methods for the ultrastructural detection of autophagy and phagocytosis.....	» 40
<i>Marco Biggiogera</i>	
7. Regulation of Autophagy.....	» 44
<i>Anna Ivana Scovassi</i>	
8. Autophagy in cancer cells-tumour stroma interaction; a dangerous liaison.....	» 49
<i>Patrizia Agostinis</i>	
9. Autofagia e infezione	» 59
<i>Raffaele Bruno, Valentina Zuccaro</i>	
10. Autophagy and systemic autoimmune diseases.....	» 63
<i>Guido Valesini, Marta Vomero, Cristiana Barbati, Tania Colasanti, Cristiano Alessandri</i>	
11. Autofagia e supporto nutrizionale nel paziente critico	» 70
<i>Danilo Radrizzani</i>	

12. Autofagia nelle plasmacellule normali e neoplastiche	»	74
<i>Enrico Milan</i>		
13. Autophagy in muscle diseases	»	82
<i>Paolo Bonaldo</i>		
14. Autofagia e neurodegenerazione nelle malattie del motoneurone	»	87
<i>Angelo Poletti</i>		
15. Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times	»	93
<i>Luca Scorrano</i>		
16. Autophagy and cancer	»	96
<i>Alessia Ciarrocchi</i>		
17. To survive or to die: the eternal dilemma of the “autophagic cell”	»	103
<i>Sergio Comincini</i>		
18. Druggability of autophagy	»	114
<i>Stefano Govoni, Marialaura Amadio, Alessia Pascale</i>		

Prefazione

Il tema del XVI Corso di formazione avanzata del Collegio Ghislieri è l'autofagia: fisiologia e malattie correlate. È un tema di grande attualità e rilevanza, sottolineata dal conferimento del Premio Nobel 2016 al ricercatore giapponese Yoshinori Ōsumi, autore di ricerche fondamentali nel campo.

Il termine autofagia fu coniato da Christian de Duve nel 1963 e deriva dal greco “mangiare se stesso”. L'autofagia ha un ruolo centrale nel mantenere l'omeostasi cellulare e l'equilibrio tra sintesi e degradazione delle componenti cellulari. Le due principali vie di degradazione per i componenti cellulari in organismi eucarioti sono l'autofagia e il proteasoma. L'autofagia riguarda la degradazione di massa delle proteine e organelli a lunga emivita, mentre il sistema di degradazione ubiquitina-proteasoma è principalmente responsabile per il turn-over delle proteine con breve emivita. Ci sono diversi tipi di autofagia, che variano tra loro sulla base dei segnali che inducono e aspetti temporali di induzione, tipo di carico e meccanismo di sequestro. Ad oggi sono state caratterizzate tre diverse vie autofagiche: la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia chaperone-mediata che si differenziano nella loro regolazione, le modalità del processo ed il tipo di materiale da degradare. Una delle differenze fondamentali tra diversi tipi di autofagia è che può essere selettiva o non selettiva. L'autofagia è attiva e svolge un ruolo fondamentale in tutte le fasi della vita, dall'embrione alla senescenza, e, se si svolge in maniera deregolata, si sviluppano patologie quali il cancro, cardiomiopatie, malattie autoimmuni sistemiche, infettive, muscolari, neurodegenerative e malattie oculari, come la degenerazione maculare senile.

Il corso si avvale di ricercatori di eccellenza che esplorano i meccanismi molecolari dell'autofagia e la sua rilevanza in numerose patologie con uno sguardo finale sulle possibilità di controllo farmacologico. Sarà illustrato lo sviluppo delle conoscenze con un breve excursus a ritroso nel tempo, partendo dalla fagocitosi, per giungere ai meccanismi molecolari che regolano l'autofagia, e all'utilizzo di tecniche ultrastrutturali per il suo studio. Particolare attenzione è dedicata ai fattori e alle vie di segnale coinvolti nella fine regolazione dell'autofagia. La stretta interazione fra autofagia e mitocondri sarà analizzata approfonditamente, con particolare attenzione alla elongazione mitocondriale, che comporta una produzione più efficiente di ATP, nelle fasi di induzione del processo autofagico. Tecniche di ingegneria tissutale sono state sviluppate per studiare, in un modello neuronale, la possibilità di modulare l'autofagia per migliorare la clearance di accumuli intracellulari, per esempio di β -amiloido, in un modello di malattia di Alzheimer.

In ambito oncologico, l'autofagia è utilizzata dalle cellule tumorali come un meccanismo altamente plastico e dinamico sia nelle fasi iniziali della carcinogenesi sia per sostenere la sopravvivenza e la crescita dei tumori. La regolazione dell'autofagia nelle cellule stromali è una caratteristica emergente del microambiente tumorale e evidenze recenti suggeriscono che l'autofagia regoli l'interazione tra le cellule tumorali e quelle stromali. L'autofagia agisce come un 'Giano bifronte' nello sviluppo del cancro e nella sua progressione. Nelle prime fasi, l'autofagia svolge funzioni oncosoppressive proteggendo le cellule sane dall'accumulo di componenti potenzialmente dannosi. Successivamente, una volta che il tumore è stabilito, l'autofagia ne sostiene la progressione aiutando le cellule tumorali a superare le condizioni avverse del microambiente. L'equilibrio tra autofagia selettiva e non selettiva è probabilmente un fattore determinante in questo contesto. L'autofagia ha un ruolo fondamentale nella biologia delle plasmacellule normali e neoplastiche e studi recenti hanno evidenziato un inaspettato livello di plasticità tra la biologia delle plasmacellule e la risposta anticorpale, il cui significato funzionale nelle patologie immunitarie dovrà essere delucidato. In effetti, la regolazione aberrante dell'autofagia è stata correlata a varie malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (SLE) e l'artrite reumatoide. Lo studio del ruolo della autofagia nelle malattie infettive batteriche e virali è in rapida espansione per chiarire in particolare come l'autofagia venga attivata durante l'infezione virale e il suo ruolo nel modulare la replicazione di alcuni virus. L'autofagia è un processo chiaramente operativo nella malattia critica e il suo ruolo nella protezione o promozione della morte cellulare dipende dal momento temporale della malattia critica e dalla gravità dello stress ossidativo. Un numero crescente di studi sperimentali indica che una corretta regolazione della autofagia è fondamentale per l'omeostasi dei muscoli scheletrici in condizioni fisiologiche e in risposta allo stress. La importanza critica di una fine regolazione della macchina autofagica è chiaramente dimostrata dal fatto che sia un difetto che un eccesso di autofagia svolge un importante ruolo patogenetico in diverse forme di malattie muscolari. L'autofagia svolge un ruolo importante anche in alcune malattie del motoneurone associate a proteine mutate neurotossiche, come la sclerosi laterale amiotrofica e la atrofia muscolare spinale e bulbare. L'autofagia è un processo che può essere modulato dai farmaci. Tuttavia, diversi problemi sono ancora da risolvere, tra questi il più importante è la selettività tissutale. La possibilità di modulare l'autofagia dipende dallo sviluppo di tecniche in grado di seguire in modo dinamico il processo durante la malattia, per stabilire se e in quale fase sia utile interrompere o promuovere il processo.

Giampaolo Merlini

1

Le basi molecolari dell'autofagia

Francesco Cecconi

Cell Stress and Survival Unit, Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark
Department of Biology, University of Rome Tor Vergata

L'autofagia, dal greco *autòs* "se stesso" e *phagéin* "mangiare", è un processo degradativo cellulare conservato negli eucarioti definito come un flusso (1). La sua funzione è quella di riciclare le componenti cellulari, sia per la normale omeostasi, sia per garantire la sopravvivenza della cellula in condizioni di stress. Essa si differenzia dagli altri sistemi di degradazione della cellula, ed in particolare dal sistema ubiquitina-proteasoma, per la sua capacità degradativa illimitata: attraverso l'autofagia possono infatti essere eliminati lipidi, acidi nucleici, proteine, e strutture macromolecolari come aggregati proteici o interi organuli (1). Infatti, il processo autofagico può essere selettivo, quando riguarda la degradazione di specifici organelli cellulari danneggiati, o può avvenire in maniera casuale nel citoplasma. La digestione delle macromolecole avviene nel lisosoma, e a seconda di come il substrato viene portato al lisosoma, si distinguono diversi tipi di autofagia:

- *microautofagia*: il materiale da degradare è direttamente fagocitato dal lisosoma, attraverso protrusioni o invaginazioni della sua membrana (1);
- *autofagia mediata da chaperoni (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA)*: le proteine che non sono ripiegate correttamente espongono un motivo (KFERQ) che ne permette il riconoscimento da parte di un sistema di chaperoni e co-chaperoni come ad esempio HSP70; questi mediano il legame con la membrana del lisosoma ed il passaggio nel lume della proteina mal ripiegata mediato da LAMP2A (2);
- *macroautofagia*: è la più studiata e quella a cui ci si riferisce generalmente quando si parla di autofagia; prevede la formazione di una struttura a doppia membrana, detta fagoforo, che avvolge il materiale da degradare e si fonde con il lisosoma (1).

L'autofagia è finemente regolata; nel lievito sono state identificate almeno trentasette proteine correlate all'autofagia (*Autophagy related genes, Atg*) e sono conservate nei mammiferi. Di queste, almeno una metà è direttamente coinvolta nel processo, mentre l'altra metà partecipa ad eventi regolativi (1). Negli eucarioti l'autofagia si presenta come una strategia di sopravvivenza della cellula che si trova in carenza di nutrienti, come ad esempio carenza di aminoacidi o glucosio; in queste circostanze gli autofagosomi (vescicole formate a partire dal fagoforo) inglobano casualmente materiale citoplasmatico trasportandolo al lisosoma

attraverso i microtubuli, dove viene effettivamente degradato. In questo modo vengono riciclati i precursori biosintetici delle macromolecole (1). Negli eucarioti superiori, l'autofagia svolge anche funzioni più specializzate, come l'eliminazione di organelli danneggiati o vecchi, di patogeni e di inclusioni citoplasmatiche dovute all'età o a stress di varia natura (3). Inoltre è stata descritta essere essenziale per il rimodellamento dei tessuti durante l'embriogenesi, per la presentazione dell'antigene, e per la protezione dall'apoptosi (1). Recentemente è stato osservato che alterazioni nella regolazione dell'autofagia possono contribuire allo sviluppo e alla progressione di molteplici patologie, come neurodegenerazioni, cancro, malattie genetiche e numerose altre malattie (1).

Fasi dell'autofagia

L'autofagia prevede la degradazione, lisosoma mediata, del materiale trasportato nell'autofagosoma e consta di varie fasi: iniziazione, che prevede la formazione della porzione di membrana iniziale, detta fagoforo; allungamento, di questa membrana; formazione e maturazione dell'autofagosoma, che quindi ingloba il materiale citoplasmatico; fusione con il lisosoma; ed infine degradazione del materiale inglobato (1) e riciclo dei componenti base. Nonostante l'autofagia sia un processo fisiologico per la cellula, affinché inizi è necessario uno stimolo. Tra i vari segnali che sono in grado di regolare l'autofagia ci sono i nutrienti, i fattori di crescita, gli ormoni, i livelli intracellulari di calcio, i livelli di adenosina trifosfato (ATP, *Adenosine TriPhosphate*), l'ipossia, l'accumulo di proteine mal ripiegate e stress di varia natura come patogeni o determinati composti chimici (1). Il meccanismo di induzione dell'autofagia meglio studiato è sicuramente quello legato alla disponibilità di nutrienti, che dipende dal complesso mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*). Questo complesso è in grado di coordinare i processi catabolici ed anabolici in funzione dei segnali che riceve dai fattori di crescita e della disponibilità di nutrienti, energia, e ossigeno (4). È costituito dalla chinasi mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), che può formare anche un altro complesso detto mTORC2, e da varie subunità regolatorie (*Regulatory associated protein of mTOR*, Raptor; *mammalian Lethal with Sec13 protein 8*, mLST8 o GβL; *Proline Rich AKT Substrate 40 kDa*, PRAS40; *DEP domain containing mTOR interacting protein*, Depton) (4). Quando c'è abbondanza di nutrienti, o il segnale di un fattore di crescita, mTORC1 è attivato e inibisce il complesso regolatore ULK. Questo complesso è formato dalla serina/treonina proteina chinasi, ULK1 o ULK2, e dalle proteine ATG13, ATG101, FIP200, AMBRA1 (5). mTORC1 inibisce l'attività del complesso ULK, e quindi l'autofagia, attraverso la fosforilazione di ULK1, di ATG13 e AMBRA1 (5, 6). Quando la cellula è in carenza di nutrienti, mTORC1 non è più attivo, ed un altro complesso AMPK, che "percepisce" la carenza di nutrienti (in particolare i livelli di ATP) attiva la chinasi ULK1 (o ULK2) che si autofosforila ed inizia una cascade di fosforilazioni tra cui AMBRA1 e ATG14, che fanno parte del complesso della PI3KC3 (*Phosphatidylinositol-3-Kinase Class-III*) (5). Quest'ultimo è un altro importante complesso regolatore dell'autofagia,

composto dalle proteine VPS34, VPS15, AMBRA1, e BECLIN1 più una serie di proteine regolatorie (1). AMBRA1 svolge un ruolo importante nella regolazione a monte del processo autofagico, orchestrando un sistema regolativo retroattivo tra i complessi di ULK1 ed AMBRA1 (10). In condizioni normali AMBRA1 è inibita attraverso il legame al citoscheletro e la fosforilazione, mTORC1 mediata, sulla Ser52 (6, 11). In seguito ad induzione dell'autofagia, ULK1 fosforila AMBRA1, promuovendone la ri-localizzazione al reticolo endoplasmatico, ed AMBRA1 media la stabilizzazione e l'aumento dell'attività chinastica di ULK1, attraverso ubiquitinazione TRAF6 mediata (6, 11). Il complesso della PI3KC3, oltre ad avere una funzione regolativa nell'induzione dell'autofagia, è il principale attore della formazione dell'autofagosoma. La PI3KC3 infatti è responsabile della sintesi del fosfatidilinositolo-3-fosfato (PI3P, *Phosphatidylinositol 3 Phosphate*), lipide tipico della membrana dell'autofagosoma, che permette il reclutamento di numerose proteine ATG sul fagoforo (1). Nei mammiferi sono stati osservati più siti di formazione dell'autofagosoma, tra cui la membrana plasmatica, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, e il nucleo (1). Una volta che si è formato il fagoforo, il processo prosegue con l'allungamento e la maturazione della membrana dell'autofagosoma. Queste fasi sono portate avanti da due sistemi di coniugazione che ricalcano il sistema dell'ubiquitina (1). Il primo porta alla formazione del dimero ATG12-ATG5, attraverso le proteine ATG7, simil E₁, e ATG10, simil E₂; questo dimero, una volta formato, interagisce con ATG16L1 e forma un trimero che quindi prende parte alla formazione di

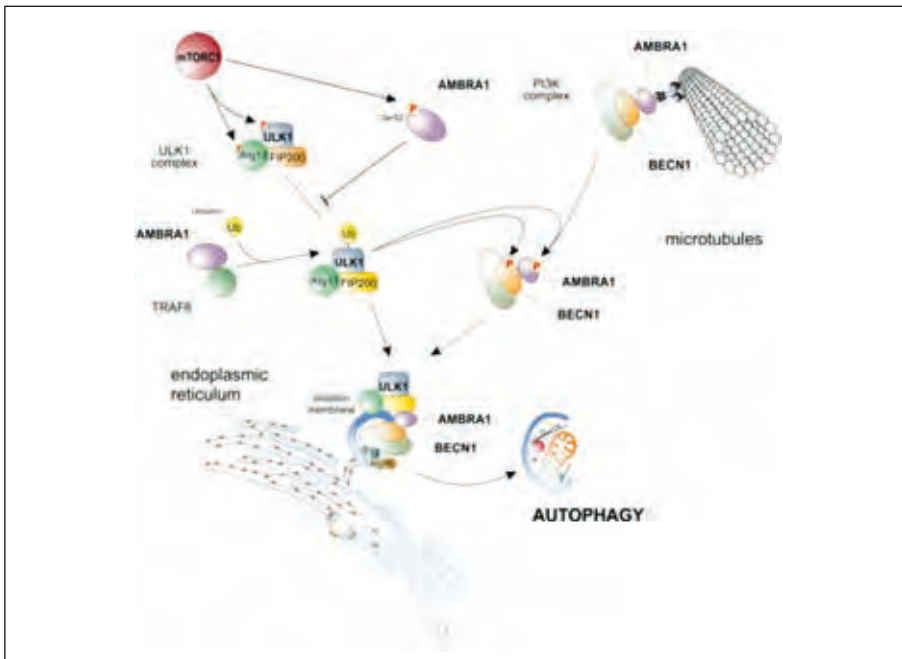


Fig. 1

un grande complesso multi-proteico, detto appunto complesso ATG16L1 (1). Questo complesso partecipa al secondo sistema di coniugazione, che determina la lipidazione della proteina LC3 (*microtubule associated Light Chain 3*). LC3 esiste nella cellula in due forme che sono dette LC3-I ed LC3-II: la prima è la proteina completa, mentre la seconda è mancante di una sequenza amminoacidica e porta la fosfatidiletanolamina (*PhosphatidylEthanolamine*, PE). Attraverso la fosfatidiletanolamina, LC3 è associato sia alla membrana della vescicola in formazione. Quando il processo di sintesi è completato, LC3-II viene rimosso dalla membrana esterna e riciclato mentre quello localizzato nella membrana interna sarà degradato insieme ad essa (1). La conversione di LC3-I in LC3-II è una delle modifiche più utilizzate nello studio dell'autofagia. Una volta formato, l'autofagosoma si muove sui microtubuli e fonde con il lisosoma, formando l'autofagolisosoma (1) dove enzimi lisosomali promuovono la degradazione delle macromolecole nei loro costituenti di base, permettendone il loro riciclo.

ULK1 ed AMBRA1: due fini regolatori dell'autofagia

Per il suo ruolo particolarmente importante nelle fasi iniziali dell'autofagia, ULK1 è finemente regolato attraverso modificazioni post-traduzionali tra cui ubiquitinazione e acetilazione che ne regolano la sua attività chinasi e la sua stabilità. In quest'ottica recentemente abbiamo indagato la possibilità che altre E3 ligasi potessero interagire con ULK1 per regolare, invece, la stabilità proteica. Abbiamo identificato NEDD4L come l'E3 ligasi responsabile della degradazione di ULK1 via proteasoma durante l'autofagia (7). Abbiamo scoperto che a tempi lunghi d'induzione dell'autofagia, l'E3 ligasi NEDD4L, che associa ad ULK1 mediante il proprio dominio WW1, promuove l'ubiquitinazione dei residui K925 e K933 di ULK1. Quest'altro tipo di ubiquitinazione, che con molta probabilità avviene con catene di ubiquitina collegate mediate K27 e K29, promuove la degradazione di ULK1 mediante proteasoma. Anche NEDD4L si auto-ubiquitina e viene poi degradata. In questo modo NEDD4L determina lo spegnimento dell'autofagia, attraverso la degradazione di ULK1, per evitare un'attivazione prolungata, e per questo dannosa, del processo. Oltre ad essere coinvolta nella macroautofagia, AMBRA1 è anche coinvolta in una forma selettiva di autofagia chiamata mitofagia, che rimuove in maniera specifica i mitocondri danneggiati. Per comprendere meglio il ruolo della proteina AMBRA1 al mitocondrio, il nostro gruppo ha generato un mutante di Ambra1 che è traslocato forzatamente dal citoplasma al mitocondrio (AMBRA1-ActA). I nostri dati in vitro indicano come Ambra1 mitocondriale sia un potente induttore di mitofagia in cellule di mammifero (8). In particolare, abbiamo dimostrato che AMBRA1 è in grado di regolare una via mitofagica "alternativa" (indipendentemente dagli attori molecolari descritti finora in questo processo di degradazione selettiva). Inoltre, recentemente, abbiamo identificato un ruolo importante per Ambra1 nel regolare l'apoptosi mitocondriale (9). L'autofagia e l'apoptosi sono due processi altamente interconnessi. In questo lavoro abbiamo scoperto che il frammento C-terminale di AMBRA1, generato in seguito al taglio delle caspasi attivate durante l'apoptosi,

inibisce direttamente il fattore anti-apoptotico BCL-2 attraverso l'interazione con un dominio specifico sulla sequenza di Ambra1 (BH3-like domain). In questo modo AMBRA1 è in grado di aumentare la risposta apoptotica, bloccando un inibitore fondamentale come BCL-2. Inoltre, AMBRA1 prende anche parte al "cross-talk" tra apoptosi e autofagia, competendo con Beclin 1 per il legame a BCL-2, dal quale poi AMBRA1 si dissocia in seguito ad induzione del processo apoptotico (14). La generazione di un topo caratterizzato da una mutazione "loss-of-function" di *Ambra1* (*Ambra1^{sl/sl}*) ha messo in evidenza anche il ruolo essenziale di questa proteina durante lo sviluppo embrionale, ed in particolare nello sviluppo del sistema nervoso (12). Una delle caratteristiche distintive del topo mutante *Ambra1^{sl/sl}* è l'evidente proliferazione del neuroepitelio all'inizio della neuroloazione (12). Questo fenotipo ha suggerito un ruolo per *Ambra1* come regolatore negativo del ciclo cellulare, ed uno studio successivo ci ha permesso di dimostrare che tale effetto è mediato dall'interazione diretta di AMBRA1 con la protein-fosfatasi PP2A (*Protein Phosphatase2A*). In dettaglio, il complesso AMBRA1/PP2A destabilizza l'oncogene c-Myc, tenendo sotto controllo la proliferazione cellulare e prevenendo la tumorigenesi. L'assenza di un singolo allele di AMBRA1 determina infatti un aumento della tumorigenesi *in vivo*, e permette di classificare AMBRA1 come un nuovo soppressore tumorale aploinsufficiente (13).

Alla luce del ruolo funzionale di AMBRA1 sia nella regolazione dell'autofagia che della proliferazione cellulare, i livelli d'espressione di questo gene devono essere finemente regolati; infatti, la traduzione del mRNA di AMBRA1 è mantenuta a livelli basali dal microRNA miR-7. Questa regolazione ha un impatto sia sull'autofagia che sulla proliferazione, ed inoltre innesca un "feed-back loop" regolativo tra miR-7, AMBRA1 e c-Myc, il quale è sia un target diretto di AMBRA1 che il fattore di trascrizione per miR-7 (15).

Bibliografia

1. Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12: 1-222.
2. Kaushik S, et al. Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J. Cell Sci*. 2011; 124: 495-499.
3. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* 2016; 428: 1714-1724.
4. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci*. 2013; 126: 1713-1719.
5. Papinski D, Kraft C. Regulation of Autophagy by Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *J. Mol. Biol.* 2016; 428: 1725-1741.
6. Nazio F, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 406-416.
7. Nazio F, et al. Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. 2016; 215.

8. Strappazon F, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ.* 2015; 22: 419-432.
9. Strappazon F, et al. Prosurvival AMBRA1 turns into a proapoptotic BH3-like protein during mitochondrial apoptosis. *Autophagy.* 2016; 12: 963-975.
10. Nazio F, Cecconi F. mTOR, AMBRA1, and autophagy: An intricate relationship. *Cell Cycle.* 2013; 12: 2524-2525.
11. Di Bartolomeo S, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* 2010; 191: 155-168.
12. Fimia GM, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 2007; 447: 1121-1125.
13. Cianfanelli V, et al. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat. Cell Biol.* 2015; 17: 20-30.
14. Strappazon F, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J.* 2011; 30: 1195-1208.
15. Capizzi M, Strappazon F, Cianfanelli V, Papaleo E, Cecconi F. MIR7-3HG, a MYC-dependent modulator of cell proliferation, inhibits autophagy by a regulatory loop involving AMBRA1. *Autophagy.* 2017; 13: 554-566.

Fagociti professionisti e dilettanti

CarloAlberto Redi

Dipartimento Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia

Quando nell’ottobre 2016 il comitato per l’assegnazione del premio Nobel per la fisiologia o la medicina ha deciso di omaggiare Yoshinori Ōsumi con la motivazione: “per le sue scoperte sui meccanismi della autofagia” si è di fatto definito da sé il tema del corso dell’anno 2016 del Collegio Ghislieri: non poteva che essere dedicato all’autofagia!

Il contributo degli altri oratori è rivolto ad inquadrare storicamente l’avanzamento delle conoscenze sulla struttura e funzione delle varie componenti cellulari implicate nel processo di autofagia, a partire dalla consacrazione di questi studi con il premio Nobel per la fisiologia o la medicina dell’anno 1974 dedicato a Christian de Duve, Albert Claude e George Emil Palade “per le scoperte sull’organizzazione strutturale e funzionale della cellula”; ed illustrando vari campi di indagine ove l’autofagia gioca un ruolo cruciale (si vedano i contributi al presente volume) in processi fisiologici e patologici.

Un breve excursus a ritroso nel tempo permette di meglio inquadrare il ruolo svolto da un altro aspetto cruciale delle attività fagocitarie/autofagocitarie, quello della fagocitosi operata da cellule che svolgono, di norma, un’altra funzione con ciò suggerendo che forme di riprogrammazione genetica del fenotipo cellulare sono sempre possibili, in dipendenza degli stimoli presenti nell’ambiente, nell’intorno, nella nicchia ove risiede la cellula bersaglio di stimoli adatti alla evocazione di quella particolare funzione (o comunque competente a rispondere a particolari stimoli capaci di indurre riprogrammazione genetica).

L’autofagia svolge un ruolo fondamentale ed è alla base di molteplici processi biologici; costituisce un meccanismo essenziale perché avviene in ogni tipo di essere vivente ed in ogni fase della storia del ciclo vitale sia degli organismi unicellulari sia pluricellulari, nel corso di processi embrionali e della senescenza, in altri termini in ogni fase dello sviluppo di un organismo. È attivo in qualsiasi momento e, se si svolge in maniera deregolata, si sviluppano patologie. L’interesse per il processo autofagico è tale che a partire dai primi anni 2000 il numero di articoli pubblicati sull’autofagia è aumentato esponenzialmente, arrivando a 4.254 articoli su riviste internazionali nel solo anno 2015.

Come sopra esposto, gli studi sull’autofagia hanno avuto grande impulso a partire dagli anni ’60 grazie al biochimico belga Christian de Duve che, insieme ad Albert Claude e George Emil Palade, svolse ricerche cruciali per la comprensione della fine organizzazione strutturale e funzionale della cellula. Va precisato che allora

si riteneva che le vescicole “mangiassero” gli organelli cellulari e particelle di varia origine biologica, da qui il nome autofagia; oggi sappiamo che le vescicole hanno solo una funzione di trasporto verso centri di distruzione o riciclaggio cellulare. Spesso si tratta di mitocondri danneggiati che, se lasciati nella cellula, produrrebbero radicali liberi in grande quantità capaci di innescare processi patologici. In altri casi gli “scarti” vengono riciclati come nel caso di proteine di grandi dimensioni o di particolare resistenza.

Ōsumi alla fine degli anni '90 ha capito il funzionamento del meccanismo studiando il lievito di birra e individuando i geni-chiave coinvolti. Il biologo è riuscito poi a dimostrare che lo stesso meccanismo che permetteva al lievito di liberarsi delle sostanze di scarto era presente in tutte le altre cellule, comprese quelle umane. Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* e nell'ameba *Dictyostelium discoideum* l'autofagia si attiva quando le fonti di carbonio e azoto si riducono. In *Caenorhabditis elegans* le condizioni di ridotto accesso alle risorse trofiche o di aumento della temperatura attivano l'autofagia e permettono al nematode di entrare in una forma alternativa di sviluppo (stato di *dauer*) capace di sopravvivere anche per lunghi periodi (i.e., mesi) a tali condizioni. Nematodi con mutazioni del gene *bec-1* (omologo del gene *atg6* di lievito) non sopravvivono a lungo nelle stesse condizioni. Di notevole interesse il ruolo della autofagia nei Mammiferi ove in pratica non vi è processo biologico che in qualche misura non veda l'autofagia entrare in gioco (crescita e morte cellulare, sviluppo embrionale, rimozione di agenti patogeni, processi immunitari, tumorigenesi, processi neurodegenerativi, etc.). Nell'adulto, l'autofagia segue ritmi circadiani e va incontro a variazioni ritmiche durante la giornata in relazione ai cicli di alimentazione: dopo i pasti l'insulina stimola la captazione cellulare delle sostanze nutritive, in risposta ai loro alti livelli presenti nel sangue, e inibisce l'autofagia attivando tor. Al contrario, durante il riposo la temporanea riduzione dei livelli degli amminoacidi stimola la secrezione del glucagone che a sua volta attiva l'autofagia.

Di particolare interesse è il ruolo svolto nella regolazione delle migrazioni cellulari sebbene solo ora inizino ad emergere dati al riguardo della motilità cellulare autofagico-dipendente.

L'adesione cellulare dipendente dal dinamico rimodellamento dei microtubuli ha alla propria base il turnover delle integrine cellulari mediato dal recettore autofagico NBR1 nel corso dei processi di motilità cellulare. Il traffico delle integrine è in relazione alle tensioni alle quali è sottoposta la cellula nel corso delle migrazioni che effettua in processi di diversa natura (sviluppo embrionale, migrazioni cellulari, etc.) e illumina di altri ruoli ancora il processo di autofagia. È chiaro come le evidenze ottenute dagli studi di Ōsumi siano in grado di proiettare nuova luce su tante, e di diversa natura, patologie umane ed in particolare sulle malattie neurologiche, Parkinson e l'Alzheimer in primis: gli aggregati che si formano all'interno dei neuroni vengono eliminati da autofagosomi e lisosomi. Nelle persone sane il processo funziona perfettamente, nei malati l'autofagia non riesce a rimuovere completamente gli aggregati. Per questo ci sono oggi linee di ricerca sul possibile potenziamento del meccanismo di autodistruzione per diverse patologie neuronali sebbene non sia ancora risolto il quesito centrale e

cioè se la presenza di autofagosomi in diverse patologie neurologiche (Alzheimer, Parkinson, Huntington, encefalopatie spongiformi) contribuiscano alla morte dei neuroni o rappresentino un meccanismo di protezione. L'idea prevalente è che la presenza di autofagosomi e l'induzione dell'autofagia sia una risposta di tipo neuroprotettivo capace di degradare gli aggregati insolubili, caratteristici di ciascuna di queste malattie. In altri termini l'idea prevalente è che difetti nel processo di autofagia siano la causa della morte dei neuroni in queste malattie.

Per definizione l'autofagia è un processo catabolico che come sopra ricordato è evolutivamente conservato a partire da organismi unicellulari (cellule di lievito) sino ai pluricellulari (piante e animali). L'autofagia costituisce il principale meccanismo di regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e di rimozione selettiva degli organelli danneggiati. Da queste funzioni basali per la sopravvivenza della cellula ne discendono le funzioni vitali e dunque appare chiaro come le disfunzioni del meccanismo siano implicate in molteplici patologie fra cui Parkinson, diabete, cancro, disturbi del sistema immunitario, del come siano coinvolte nella senescenza e nella regolazione delle difese immunitarie contro le infezioni e esercitano funzioni essenziali in condizioni di malnutrizione. A questo riguardo un semplice dato numerico può meglio far apprezzare il ruolo della autofagia per la sopravvivenza stessa dell'organismo. Nell'uomo, un adulto ha bisogno di circa 200-300 gr di proteine al giorno, con il cibo ne assumiamo circa 70 gr: è dunque chiaro che una larga parte del fabbisogno proteico viene soddisfatto non dalla nutrizione, ma dal riciclo cellulare di proteine e organelli. Sotto il profilo epistemologico (genetico), l'autofagia è un meccanismo di morte cellulare programmata (detta di tipo II) ed insieme all'apoptosi (morte cellulare programmata di tipo I) contribuisce, durante lo sviluppo embrionale, a scolpire e a modellare gli organi (la distinzione tra i due tipi di processi non sempre è netta e frequentemente questi coesistono e si influenzano). Singolare è la fisiologia dei mitocondri a questo riguardo (mitofagia): sono infatti capaci di generare segnali apoptotici ma vengono rimossi per autofagia quando danneggiati. I membri della famiglia di Bcl-2, presenti sulla membrana del mitocondrio, modulano sia l'apoptosi sia l'autofagia. Bcl-2 normalmente inibisce l'autofagia perché lega e blocca il gene *beclin1* (omologo di atg6, si veda oltre). È idea prevalente quella di attribuire a *beclin1* anche la funzione di gene soppressore dei tumori: delezioni monoalleliche di *beclin1* sono state infatti riscontrate in diversi tipi di tumori e la perdita di proteina beclin1 nelle cellule epiteliali promuove la tumorigenesi; inoltre, topi con livelli ridotti di beclin1 sviluppano spontaneamente tumori.

Esistono diversi tipi di autofagia e però, in tutti i casi, si ha la formazione di vescicole a doppia membrana che inglobano, isolano e separano dal resto della cellula il materiale da degradare (attraverso l'intervento di lisosomi).

La macroautofagia (i.e. autofagia) è un processo seriale a più tappe (quattro) che prevede dapprima la formazione di vescicole a doppia membrana (i.e. autofagosomi) includenti entità citoplasmatiche superflue o danneggiate e il successivo intervento di lisosomi per la loro degradazione. Più precisamente è possibile individuare le seguenti fasi:

- *induzione*: è regolata da una chinasi (tor) che funge da sensore dei livelli di

energia cellulare e di amminoacidi disponibili; l'inattivazione di tor attiva geni che codificano proteine coinvolte nell'espansione dell'autofagosoma;

- *formazione dell'autofagosoma*: materiale citoplasmatico di varia natura è inglobato nell'autofagosoma grazie all'azione di diverse attività enzimatiche, di un sistema costituito dai prodotti dei geni *Atg* (*Autophagy-related gene*), ossia dalla proteina atg8 (lc3 nei mammiferi, una proteina simile all'ubiquitina) e dalla proteasi atg4 e dal complesso atg12-atg5;
- *riconoscimento e fusione dell'autofagosoma al lisosoma*: diverse proteine di membrana assicurano l'aggancio delle vescicole (le principali sono le SNARE);
- *demolizione del corpo autofagico*: mentre la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con quella del lisosoma il resto è degradato dalle idrolasi lisosomiali.

L'autofagia non solo contribuisce alla conservazione della omeostasi cellulare e dell'organismo in condizioni fisiologiche ma gioca anche un ruolo cruciale nella risposta adattativa in condizioni di stress. Le funzioni dell'autofagia emergono da almeno tre linee di evidenze:

- 1) l'autofagia come processo in sè e le componenti della macchina autofagica sono presenti in tutti gli eucarioti;
- 2) l'eliminazione di qualunque gene implicato nel processo autofagico nei Mammiferi è associata alla morte embrionale;
- 3) una ampia varietà di malattie e disordini clinici è associata a difetti nella competenza autofagica di altrettanti tipi di tessuti.

Gli autofagosomi sono in grado di inglobare in modo specifico diverse entità citoplasmatiche grazie al riconoscimento attraverso specifici recettori; il caso più paradigmatico e meglio studiato è la autofagia selettiva dei mitocondri (mitofagia). La mitofagia come processo citoprotettivo interviene in processi specifici nel caso di disfunzioni mitocondriali o in processi fisiologici quali l'eliminazione dei mitocondri paterni dall'uovo fecondato nel corso dello sviluppo embrionale. Il processo mitofagico (nello sviluppo embrionale di *Caenorhabditis elegans* così come nelle cellule tumorali umane) dipende sia dal riconoscimento specifico tra la catena leggera 3 beta dei microtubuli degli autofagosomi (MAP1LC3B; meglio conosciuti come LC3) e recettori specifici sulla membrana esterna dei mitocondri danneggiati sia dal coinvolgimento della proibitina 2 (PHB2), una proteina integrale della membrana interna dei mitocondri (per una presentazione critica di questi recentissimi dati si veda Galluzzi et al., 2017). Tra le tante dimostrazioni di biologia molecolare illustrate dai gruppi di Galluzzi, Levine e altri autori, la classica digestione enzimatica ha dimostrato in modo definitivo che PHB2 diviene accessibile alla macchina autofagica dopo rottura della membrana esterna dei mitocondri. Nell'insieme i dati presentati attribuiscono a PHB2 il carattere di proteina altamente conservata sotto il profilo evolutivo e capace di agire quale recettore per innescare il processo mitofagico a livello di membrana interna dei mitocondri: questo nuovo dato implica la riconsiderazione dei modelli classici di mitofagia basati essenzialmente sul coinvolgimento di recettori sulla membrana esterna dei mitocondri. La riconsiderazione dei modelli di mitofagia

alla luce del ruolo svolto da PHB2 può aiutare a rivalutare i rischi di aumentata neurodegenerazione nell'Uomo sulla base di possibili mutazioni somatiche (o della linea germinale) della proibitina.

Ricordate queste poche nozioni sul processo autofagico è possibile ora meglio inquadrare, nel percorso inverso come suggerito in introduzione, il processo di fagocitosi e come questo possa essere indotto in cellule che di norma svolgono altre funzioni.

La fagocitosi è il processo grazie al quale le cellule ingeriscono una varietà di particelle ($>0.5 \mu\text{m}$) entro vescicole derivate dalla introggressione del plasmalemma. Potrà sembrare strano ai giovani studenti di medicina, mi auguro molto meno ai biologi, che questo processo sia stato storicamente individuato da uno dei padri della moderna immunologia, lo scienziato russo Elie Metchnikoff (colui che ha introdotto il termine "fagocita": "cellule circolanti in invertebrati e capaci di inglobare corpi estranei") grazie a pionieristici lavori di embriologia e immunologia sugli embrioni di stella di mare. Gli studi di Metchnikoff presso la stazione zoologica di Napoli Anton Dohrn portarono alla identificazione del processo di fagocitosi quale attore di processi biologici fondamentali per i quali basterà ricordare l'assunzione di nutrienti, l'omeostasi dei tessuti e le difese immunitarie (per una recente review, Gordon, 2016). Grazie a tutta una serie di lavori (per una review si veda Arango Dunque e Descoteaux, 2016; Han et al., 2016) emerge oggi che i fagociti possono essere classificati quali fagociti "professionisti" e "non-professionisti" (Rabinovitch, 1995).

La fagocitosi da parte di fagociti "professionisti" e "non-professionisti" gioca un ruolo critico nella omeostasi dei tessuti, nel loro rimodellamento durante lo sviluppo embrionale e nella risposta immunitaria. I fagociti professionisti sono cellule mieloidi che includono macrofagi, cellule dendritiche, neutrofilo, monociti, osteoclasti e eosinofili. Questi fagociti possiedono recettori di superficie che permettono loro di riconoscere e degradare particelle quali microbi e cellule senescenti. I fagociti professionisti possono essere rapidamente attivati verso un sito di infezione o offesa grazie a processi chemiotattici. Al contrario, i fagociti non-professionisti sono cellule sessili che non svolgono primariamente e di regola processi di fagocitosi; inoltre è molto limitato lo spettro di particelle che possono ingerire per fagocitosi. I non-professionisti includono fibroblasti e cellule endo- ed eso-epiteliali che si trovano in organi quali il polmone e la pelle. Interessante il fatto che i non-professionisti svolgano un ruolo cruciale nell'eliminazione delle cellule apoptotiche da organi quali il polmone (dagli alveoli polmonari) dove i macrofagi sono scarsamente rappresentati. Il tipo di particelle ingerite determina se i macrofagi attivino o meno una risposta infiammatoria grazie alla secrezione di mediatori solubili come i fattori di crescita o le citochine (Arango Duque e Descoteaux, 2014). In realtà, i fagociti professionisti usano queste molecole per influenzare lo sviluppo di specifiche funzioni da parte dei linfociti e dunque è possibile ipotizzare che i fagociti professionisti rilascino anche molecole capaci di porli in comunicazione con i fagociti non-professionisti e di alterarne le funzioni. Vale la pena di ricordare ancora che particelle extracellulari e cellule apoptotiche vengono inglobate dai fagociti professionisti (i.e., macrofagi) e da quelli non-

professionisti (i.e., cellule epiteliali, ad esempio). Queste popolazioni di fagociti realizzano comunicazioni tra di loro così da coordinare le loro attività: la natura di queste comunicazioni resta però ancora vaga (Freeman e Grisein, 2016) nonostante il recentissimo suggerimento sul ruolo svolto quale messaggero tra fagociti professionisti e non-professionisti da parte dell'insulin-like growth factor 1, IGF-1 (Han et al., 2016). Per meglio inquadrare questo ruolo è bene ricordare che concettualmente la fagocitosi è il principale meccanismo impiegato dalle cellule del sistema immunitario innato per contrastare possibili processi patologici da parte di agenti microbici. Macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche (tutti fagociti professionisti) riconoscono, inglobano ed eliminano potenziali patogeni grazie ad una serie di processi e sostanze microbicide. In parallelo questi fagociti attivano processi infiammatori rilasciando citochine pro-infiammatorie ed orchestrando l'infiltrazione di altre cellule del sistema immunitario verso i siti dove la sterilità viene a mancare. Inoltre, la fagocitosi esplicita dai fagociti professionisti è un processo altamente modulabile che può essere fortemente innalzato da agenti pro-infiammatori o spento da quelli anti-infiammatori. Inoltre, la fagocitosi svolge funzioni che vanno al di là di quella immunitaria. A questo proposito basterà ricordare che nei Mammiferi ogni giorno miliardi di cellule apoptotiche, e loro frammenti, vengono prodotte in conseguenza di normali processi di rimodellamento tissutale ed eliminate dai fagociti: è questa una attività, immunologicamente silente, di fagocitosi che prende il nome di efferocitosi (dal latino *efferre*, condurre alla tomba) e che si rivela di una estrema efficienza visto che rarissimamente in vivo si riesce a riscontrare una cellula apoptotica. È noto che questa efficienza è raggiunta grazie alla collaborazione ed alla divisione del lavoro tra fagociti professionisti e non-professionisti (i.e., fibroblasti e cellule epiteliali). La degradazione delle cellule morenti da parte dei fagociti non-professionisti residenti assicura ai tessuti l'abilità di conservare preziosi blocchi cellulari che così è possibile riutilizzare. Ad esempio, le cellule intestinali hanno una vita media di 4-7 giorni e mentre alcune cellule apoptotiche vengono del tutto eliminate al loro termine, altre vengono efferocitate dalle cellule a loro vicine così da riusare alcuni dei loro costituenti.

È molto probabile che i processi di invecchiamento (i.e., metabolismo dell'aging) siano in grado di innescare autofagia che così viene a svolgere un ruolo di primo piano nel mantenimento delle condizioni fisiologiche di particolari tessuti. A questo proposito è di estremo interesse il ruolo svolto dall'autofagia nel mantenimento delle condizioni di staminalità in alcuni tessuti. Di questi giorni (marzo 2017) il contributo di Emmanuelle Passegué e collaboratori (Ho et al., 2017) sul ruolo svolto dalla autofagia nel mantenimento della staminalità nel corso dell'invecchiamento delle staminali ematopoietiche. La perdita della capacità autofagica nelle cellule staminali ematopoietiche determina un accumulo di mitocondri ed uno stato di metabolismo estremamente attivo capaci di accelerare la differenziazione mieloide (attraverso meccanismi di deregolazione genomica di tipo epigenetico) deregolando la capacità autoreplicativa e rigenerativa delle staminali ematopoietiche. Degno di ulteriori studi è il dato assai interessante che circa un terzo delle staminali ematopoietiche in senescenza non va incontro a

questi processi ma mantiene le stesse caratteristiche delle staminali ematopoietiche di animali giovani con grande capacità autoreplicativa e metabolismo quiescente. Centrale in questo quadro concettuale di funzioni proprie e funzioni indotte resta il ruolo svolto da mediatori capaci di modulare lo svolgimento armonioso tra fagociti professionisti e non-professionisti. Di recente IGF-1 è stato individuato quale messaggero di comunicazioni tra macrofagi e cellule epiteliali (Han et al., 2016). Han e collaboratori hanno dimostrato che in un modello sperimentale di infiammazione delle vie aeree i macrofagi secernono IGF-1 per modulare il processo di fagocitosi dei fagociti non-professionisti (cellule epiteliali) bloccando così il processo apoptotico mentre aumentano l'assunzione di microvescicole antiinfiammatorie prodotte dai macrofagi stessi. Come ben noto, IGF-1 è un ormone simile all'insulina che è prodotto primariamente a livello sistemico dal fegato e a livello locale da polmone, cuore e rene e come l'ormone della crescita anche IGF-1 promuove la crescita muscoloscheletrica. Se l'effetto anabolico è ben conosciuto, meno chiaro è il suo effetto sul sistema immunitario e così è di rilievo il risultato ottenuto da Han e collaboratori per chiarirne il ruolo a fronte della rilevanza dell'eliminazione delle cellule apoptotiche nel corso dei processi infiammatori e del rimodellamento tissutale. Questi autori dimostrano poi che IGF-1 provoca una diminuzione della fagocitosi dei timociti morti da parte dei fibroblasti e delle cellule epiteliali del polmone. A dimostrazione di queste conclusioni vi è la prova che la diminuzione della fagocitosi mediata da IGF-1 è inibita da anticorpi contro il recettore di IGF-1. Concomitante alla diminuzione di fagocitosi si verifica un aumento di assunzione (uptake) di lisosomi da parte dei fagociti non-professionisti. Questi stessi effetti indotti da IGF-1 non si verificano nei macrofagi. Nell'insieme, questi risultati suggeriscono che IGF-1 influenzi anche la tipologia delle particelle che possono essere ingerite dai fagociti non-professionisti. Sulla base dell'evidenza sperimentale che i macrofagi secernono IGF-1 dopo stimolazione con IL-4 Han e collaboratori ipotizzano che nel polmone i macrofagi (ed altre cellule mieloidi) siano la sorgente di IGF-1. Il modello sperimentale impiegato da Han e collaboratori è particolarmente adatto alla dissezione molecolare del processo di mediazione chimica tra fagociti professionisti e non-professionisti, e questo per diverse ragioni ma basterà ricordare che:

- nell'uomo l'epitelio delle vie respiratorie copre una incredibile area di circa 90 m²;
- i macrofagi alveolari sono presenti uno per alveolo e dunque è chiaro che non possono da soli svolgere l'intera gamma di operazioni fagocitarie necessarie all'omeostasi ed alle difese immunitarie.

Così mentre i macrofagi residenti proteggono contro i patogeni inalati, la loro scarsità li rende impossibilitati a svolgere le necessarie operazioni di efferocitosi giornaliera. Al rovescio, le numerose cellule dell'epitelio respiratorio, oltre a regolare gli scambi gassosi, rispondono al fabbisogno di efferocitosi così come si dimostra in occasione di involuzione dei tessuti o nei casi di massive apoptosi cellulari che accompagnano traumi (in condizioni di sterilità). I fagociti non-professionisti contribuiscono anche in larga misura al sistema immunitario

polmonare producendo fattori antimicrobici, citochine e chemochine che, tutti insieme, contribuiscono ad accendere processi infiammatori in risposta ad agenti patogeni. Quando l'omeostasi è in pericolo si attivano meccanismi di segnale tra i diversi tipi di fagociti e così dei macrofagi "sentinella" che risiedono negli alveoli rilasciano dei fattori che permettono loro di comunicare con le cellule epiteliali vicine (presenti nella stessa nicchia). È chiaro che stante queste condizioni di strutturazione anatomica il tessuto polmonare è un luogo d'elezione per verificare questo quadro concettuale di dialogo tra fagociti professionisti e non-professionisti, così come sopra ricordato hanno ben pensato e progettato Han e collaboratori. Questi ultimi hanno iniziato i loro studi alla ricerca di putativi fattori che potessero regolare l'attività fagocitaria. A beneficio di una piena comprensione di queste ricerche varrà la pena ricordare che Han e collaboratori hanno dapprima ottenuto dati inaspettati: IGF-1 diminuisce l'assunzione di corpi apoptotici da parte dei fagociti non-professionisti. IGF-1 è normalmente sintetizzato nel fegato e si ritrova poi in circolazione. IGF-1 è sintetizzato anche nel polmone, ad esempio in condizioni di asma si riscontra un surplus di IGF-1 nel polmone in quanto prodotto anche dal comparto cellulare mieloide, presumibilmente macrofagi alveolari. In accordo con questi dati della letteratura, Han e collaboratori hanno dimostrato che i macrofagi residenti producono IGF-1, quando stimolati con citochine quali interleuchina 4, e che questa condizione deprime l'efferocitosi dei fagociti non-professionisti. In apparenza questa risposta appare paradossale, in altre parole pare incomprensibile il fatto che i macrofagi residenti deprimano la fagocitosi dei non-professionisti a fronte del fatto che le cellule dell'epitelio delle vie aeree sono in grado di inglobare in modo altamente efficiente cellule apoptotiche e di secernere citochine antiinfiammatorie orchestrando in tal modo una risposta globale di tipo benefico. Per una piena comprensione di questo fenomeno è necessario qui pensare però in termini di biologia olistica: in certe condizioni è ragionevole ritenere che la selezione abbia premiato un meccanismo capace di evitare il riciclo all'interno dell'ospite di agenti potenzialmente aggressivi, situazione che si verrebbe a creare favorendo il cannibalismo cellulare caratterizzato da un minore costo energetico; così evitando la riesposizione a agenti patogeni o allergeni. In altri termini, in termini "soggettivi", è preferibile per le cellule epiteliali apoptotiche essere eliminate dai macrofagi professionisti, "lasciare ai professionisti il lavoro" piuttosto che essere eliminate dalle cellule epiteliali vicine "richiamate in servizio" quali non-professionisti. L'efferocitosi di cellule infette da parte di altre cellule epiteliali riconvertite a fagociti non-professionisti potrebbe semplicemente prolungare nel tempo, e potenzialmente propagare, l'infezione mentre i fagociti professionisti, dotati di più potenti agenti effettori microbici, sono ben più adatti a risolvere il ciclo infettivo.

Bibliografia essenziale

1. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophages Tell the Non-Professionals What to Do. *Developmental Cell*. 2016; 39: 633-635.
2. Freeman S, Grinstein S. Phagocytosis: How Macrophages Tune Their.

3. Non-professional Counterparts. *Current Biology*. 2016; 26: R1279-R1282.
4. Galluzzi L, Bravo-San Pedro J, Kroemer G. Mitophagy: Permitted by Prohibitin. *Current Biology*. 2017; 27: R73-R76.
5. Gordon S. Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity*. 2016; 44: 463-475.
6. Han C, et al. Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. *Nature*. 2016; 539: 570-574.
7. Ho T, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*. Marzo 2017doi:10.1038/nature21388.
8. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biol*. 1995; 5: 85-87.

Christian de Duve e Yoshinori Ōsumi: autofagia - fagocitosi - autofagia

Manuela Monti

Laboratorio di Biotecnologie, Centro Ricerche di Medicina Rigenerativa,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Life is cell activity; it's uniqueness is the uniqueness of the cell
R. Virkow, 1958

Nel 1974 il comitato del Karolinska Institutet di Stoccolma, assegna al biochimico Christian René de Duve, insieme ad Albert Claude e George Emil Palade, il Nobel per la Fisiologia o Medicina per le loro scoperte sull'organizzazione strutturale e funzionale della cellula.

Il lavoro di de Duve, in particolar modo, evidenzia la presenza dei lisosomi, ovvero degli organelli responsabili della degradazione, della distruzione, della digestione di molecole endogene o di tutte quelle molecole ingerite dalla cellula per endocitosi.

Diverse patologie, alcune delle quali ereditarie (malattia di Tay-Sachs o il morbo di Pompe), derivano da un malfunzionamento dei lisosomi dovuto alla mancanza di particolari proteine litiche che causano problemi nel corretto funzionamento del metabolismo cellulare.

Gli studi pionieristici che hanno portato de Duve ad una scoperta di tale importanza, sono stati resi possibili grazie a...una centrifuga!

Nel 1949 insieme ad altri colleghi, de Duve inizia a studiare quella che viene definita "terra incognita", ossia tutto ciò che non poteva essere definito al di sotto del potere risolutivo del microscopio ottico e al di sopra delle analisi chimiche delle macromolecole. Omogeneizzando fegato di ratto o topo e, attraverso una serie di centrifugazioni, riesce a separare diverse frazioni, quali quella dei "nuclei", dei "mitocondri", dei "microsomi" e del surnatante e ad analizzarne i rispettivi contenuti enzimatici e chimici. Sebbene parte di questi dati fossero già noti in letteratura, de Duve e collaboratori vogliono investigare la localizzazione dell'enzima glucosio-6-fosfato-deidrogenasi che pensano possa essere in qualche modo coinvolto nel meccanismo di azione dell'insulina.

Come nelle migliori storie da Nobel, l'idea originale si trasforma, un po' per *serendipity* un po' per "semplice" intuizione, in qualche cosa d'altro. Sarà infatti la collaborazione con un giovane e puntiglioso studente di medicina, Jaques

Berthet, che spinge de Duve a studiare in modo più approfondito la teoria della centrifugazione per contrastare le critiche nascenti in quel periodo sugli artefatti ottenuti. I parametri che i due studiosi iniziano a considerare sono il coefficiente di sedimentazione, la polidispersità ed il potere risolutivo perché capiscono che le frazioni che intendono separare, in realtà, sono impure e si sovrappongono. Per questo motivo, invece di studiare e dissezionare ciascuna singola frazione, decidono di cambiare approccio e di focalizzarsi sulla distribuzione di determinati enzimi (tra cui già citato il glucosio-6-fosfato-deidrogenasi) all'interno di tutte le frazioni ottenute, scelta che si rivela essere quella vincente e che porta alla definizione dei postulati "della omogeneità biochimica" e "della singola posizione" che affermano che i costituenti di una data frazione cellulare condividono la stessa composizione biochimica e che ciascun enzima è ristretto ad un singolo sito intracellulare. Viene inoltre definito il concetto di "latenza enzimatica" dipendente in qualche modo dal grado di permeabilità, a uno o più substrati utilizzati nel dosaggio, delle membrane dei componenti le diverse frazioni cellulari. Se due o più enzimi sono presenti nella stessa frazione, verranno rilasciati insieme, se presenti in frazioni diverse verranno rilasciati separatamente.

Tutti questi esperimenti di centrifugazione differenziale hanno portato nel 1955 alla scoperta e descrizione di una frazione cellulare caratterizzata da un alto contenuto di enzimi proteolitici, e altre idrolasi. Questi enzimi restano inattivi fino a quando la frazione con la quale si depositano, circondata da una membrana a un solo strato lipoproteico, non viene rotta. De Duve propone di chiamare queste frazioni con il nome di lisosomi e ipotizza anche l'esistenza di un'altra frazione che diverrà in seguito definita con il nome di perossisomi (Tabella 1).

Tab. 1 - Tabella tratta da de Duve, 1965 (1). Proprietà fisiche delle frazioni cellulari del fegato di ratto.

Parameter	Mitochondria			Lysosomes		Peroxisomes	
	Cytochrome oxidase	Acid phosphatase	Acid DNase	Urate oxidase	Catalase	D-Amino acid oxidase	
Dry weight (μg)	10^7	2.7×10^{-8}	3.6×10^{-8}	2.4×10^{-8}	-	-	
Dry density	1.315	1.300	1.331	1.322	1.319	1.315	
Osmotically active solutes (milliosmoles/g dry weight)	0.157	0.128	0.334	0	0	0	
Water compartments (cm^3/g dry weight)	0.430	0.256	0.212	0.214	0.295	0.296	
Hydration							
Sucrose space	0.905	1.075	0.330	2.51	2.68	2.54	
Osmotic space in 0.25 M sucrose	0.595	0.485	1.265	0	0	0	
Total in 0.25 M sucrose	1.930	1.816	1.807	2.724	2.975	2.836	
Sedimentation coefficient in 0.25 M sucrose (Svedberg units)	10^4	4.4×10^3	5×10^3	4.4×10^3	-	-	
Diameter in 0.25 M sucrose (μm)	0.8	0.51	0.56	0.54	-	-	
Density in 0.25 M sucrose	1.099	1.103	1.100	1.095	1.088	1.090	

L'analisi con microscopia elettronica della frazione isolata di lisosomi ne ha provato definitivamente l'esistenza e ha potuto confermare l'esistenza anche dei perossisomi.

Oggi, dunque, dobbiamo ringraziare una centrifuga (e certamente l'ingegno di chi, come de Duve, ha pensato a come impiegarla) se conosciamo abbastanza bene i lisosomi, i "sacchetti suicidi", ed il loro ruolo nella fagocitosi. Quando il corpo da fagocitare si invagina all'interno della membrana citoplasmatica con la costituzione del fagosoma (fagocitosi), la cui formazione dipende dalla glicolisi, il lisosoma ed il fagosoma entrano in contatto e originano il fagolisosoma (dipendente dalla perossidazione delle membrane lisosomiali) che digerisce il corpo fagocitato ed espelle i resti nell'ambiente extracellulare (autofagia). Questa teoria, sviluppata definitivamente nel 1963 (2) si opponeva a quella della eterofagia, ora conosciuta con il nome di endocitosi.

Come sottolineato in precedenza, i lisosomi svolgono sì un ruolo importante di protezione cellulare ma, nello stesso tempo, possono anche essere pericolosi quando i loro enzimi proteolitici vengono liberati distruggendo l'architettura protoplasmatica della cellula.

L'autofagia controlla importanti funzioni fisiologiche, fornisce molto velocemente combustibile alla cellula, permette il rinnovo dei suoi componenti ed interviene, ad esempio, in risposta ad alti livelli di stress oppure dopo un'infezione, eliminando batteri e virus e contrastando gli effetti negativi dell'invecchiamento cellulare.

Tuttavia, i lavori pionieristici di de Duve e di altri colleghi che negli anni '70 e '80 hanno scoperto il sistema usato per degradare le proteine, il proteasoma (Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose, Nobel per la Chimica del 2004), hanno permesso a Yoshinori Ōsumi di chiarire definitivamente il meccanismo dell'autofagia negli anni '90.

La grande intuizione di Ōsumi è stata quella di capire se l'autofagia potesse essere il link mancante tra l'attività del proteasoma di degradare le proteine una ad una e la capacità della cellula di liberarsi, ad esempio, dei grandi complessi proteici e dei residui cellulari.

Per il risultato delle sue ricerche "sulla scoperta dei meccanismi dell'autofagia", è stato insignito del Nobel per la Fisiologia o Medicina nel 2016.

Yoshinori Ōsumi non appena avviato il suo laboratorio a Tokyo nel 1988 inizia a studiare come avviene la degradazione proteica nei vacuoli del lievito (*S. cerevisiae*), organelli che corrispondono ai lisosomi delle cellule umane, chiedendosi se sono in grado di compiere autofagia. Ōsumi sceglie il lievito come modello per due motivi fondamentali: le cellule sono relativamente semplici da studiare, nonostante la loro piccola dimensione e la difficoltà nel distinguere al microscopio le loro diverse strutture, e possono essere usate come modello per l'analisi di organismi più complessi (i.e. uomo). In *S. cerevisiae* il vacuolo è l'unico organello ben visibile con un microscopio a contrasto di fase e una delle sue funzioni è quella di accumulare ioni e aminoacidi. Quando le cellule di lievito sono private di azoto, sporulazione e mitosi sono indotte.

Ōsumi arriva ad ipotizzare che, se riesce a disturbare il processo di degradazione nei vacuoli mentre l'autofagia è attiva, è verosimile che gli autofagosomi si

accumulino nei vacuoli stessi e diventino in questo modo visibili al microscopio. Per concretizzare la sua idea coltiva cellule mutate di lievito (mancanti degli enzimi di degradazione) e allo stesso tempo stimola l'autofagia privando le cellule dei nutrienti essenziali. Dopo soli 30 minuti, corpuscoli sferici appaiono all'interno dei vacuoli, aumentano di volume fino ad occupare tutta la superficie disponibile. Analisi in microscopia elettronica dimostrano che questi corpuscoli hanno una dimensione di circa 500 nm di diametro e contengono ribosomi e alcuni mitocondri.

Il risultato ottenuto da Ōsumi è dunque eccezionale: in poche ore i vacuoli si riempiono di piccole vescicole che non sono state degradate, provando che l'autofagia esiste anche nel lievito e dimostrando che esistono geni chiave responsabili di questo processo (Takeshige et al., 1992; Figura 1) (3).

Ulteriori analisi mediante microscopia elettronica dimostrano che il processo di autofagia del lievito e nelle cellule umane è praticamente uguale, con la formazione dell'autofagosoma che si fonde, tramite la sua membrana esterna, a quella del vacuolo (4). Lo stesso processo è stato osservato privando le cellule dei nutrimenti, ovvero di aminoacidi, azoto, carbonio, solfati.

Ōsumi ed il suo gruppo utilizzano successivamente le linee di lievito mutate in cui gli autofagosomi si accumulano anche in assenza dei suddetti nutrienti e dimostrano che questo accumulo non avviene se i geni importanti per l'autofagia vengono inattivati. In questo modo riescono ad isolare il primo gene mutante autofagia-difettivo, *apg1*, incapace di degradare le proteine ed il suo omologo diploide che presenta problemi nella sporulazione (5). Tuttavia, il mutante per *apg1*, è in grado di crescere normalmente in terreno di coltura e non mostra difetti nella secrezione e nella endocitosi ma muore dopo lunghi periodi in assenza di nutrienti. Con questo approccio, Ōsumi e collaboratori identificano 15 altri geni con un fenotipo simile a *apg1* ma caratterizzati dagli stessi difetti nella formazione dell'autofagosoma.

Diversi altri gruppi hanno successivamente identificato ulteriori geni, che ora, per semplicità, sono definiti geni ATG (autophagy-related genes) (6). Ad oggi, si conoscono più di 37 geni autophagy-related implicati in diverse funzioni del processo autofagocitario.

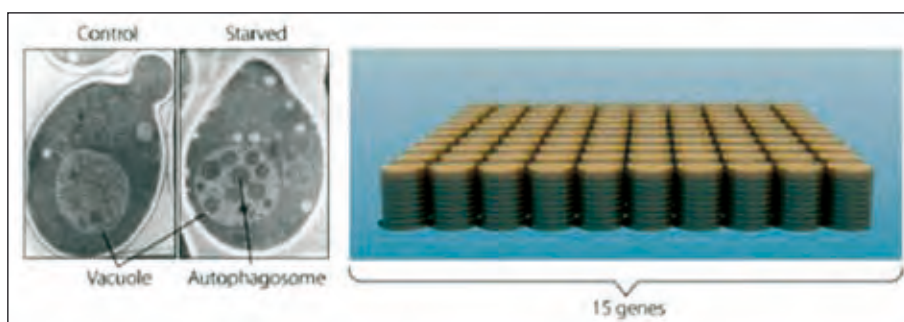


Fig. 1 - Formazione degli autofagosomi in cellule di lievito private dei nutrienti (pannello di sinistra) e scoperta dei 15 geni responsabili della autofagia grazie allo studio di cellule di lievito mutate (pannello di destra).

Tab. 2 - Proteine Atg/ATG implicate nella formazione dell'autofagosoma (8).

	Yeast	Mammals	Characteristics and functions
Atg1/ULK complex	Atg1	ULK1/2	Ser/Thr protein kinase: phosphorylated by M/TORC1; recruitment of Atg proteins to the PAS
	Atg13	ATG13	Regulatory subunit through phosphorylation by M/TORC1 and/or PKA, linker between Atg1 and Atg17
	Atg17	RB1CC1/FIP200 (functional homolog)	Scaffold protein, ternary complex with Atg29 and Atg31. Phosphorylated by ULK1; scaffold for ULK1/2 and Atg13
	Atg29		Ternary complex with Atg17 and Atg31
	Atg31		Ternary complex with Atg17 and Atg29
	Atg11		Scaffold protein in selective autophagy for PAS organization
			C12orf44/Atg101
Atg9 and its cycling system	Atg2	ATG2	Interacts with Atg18
	Atg9	ATG9A/B	Transmembrane protein, directs membrane to the phagophore
	Atg18	WIPI1/2	PtdIns3P-binding protein
PtdIns3K complex	Vps34	PIK3C3/VPS34	PtdIns 3-kinase
	Vps15	PIK3R4/VPS15	Ser/Thr protein kinase
	Vps30/Atg6	BECN1	Complement of PtdIns3K complex I and II
	Atg14	ATG14	Complement of PtdIns3K complex I
Atg8 Ubl conjugation system	Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARABPL1/2	Ubl, conjugated to PE
	Atg7	ATG7	E1-like enzyme
	Atg3	ATG3	E2-like enzyme
	Atg4	ATG4/B/C/D	Deconjugating enzyme, cysteine proteinase
Atg12 Ubl conjugation system	Atg12	ATG12	Ubl
	Atg7	ATG7	E1-like enzyme
	Atg10	ATG10	E1-like enzyme
	Atg16	ATG16L1	Interacts with Atg5 and Atg12
	Atg5	ATG5	Conjugated by Atg12

Ōsumi porta a termine anche un altro esperimento sottoponendo le cellule ad un reagente chimico che induce mutazioni casuali in molti geni, inducendo successivamente l'autofagia. In questo modo riesce ad identificare anche le proteine responsabili dell'attivazione di questo processo dimostrando che l'autofagia è controllata da una cascata di complessi proteici che regolano ciascuno una determinata fase della formazione dell'autofagosoma (Tabella 2) (7-9).

Grazie agli studi di Ōsumi si è capito, nel corso degli anni, che un meccanismo simile opera anche nelle cellule umane. Alcune delle patologie più comuni negli anziani (diabete di tipo 2 e Parkinson) così come alcuni tipi di cancro sono legate proprio al malfunzionamento dell'autofagia ed intense ricerche date dalla sinergia tra biologia di base ed applicata stanno cercando di sviluppare farmaci che possano colpire i meccanismi difettivi.

L'autofagia è divenuta uno degli *hot field* in biologia nonostante siano passati più di quaranta anni dalle ricerche di de Duve e più di trenta da quelle di Ōsumi. Tuttavia, ancora molti sforzi devono essere compiuti per dissezionare finemente gli ingranaggi di questo meccanismo così sofisticato ed importante.

Bibliografia essenziale

1. de Duve C. The separation and characterization of subcellular particles. *The Harvey Lectures*. 1965; 59: 49-87.
2. de Duve C, Foundation C. *Ciba Foundation Symposium: Lysosome*. De Reuck A, Cameron MP, eds. Little, Brown. 1963.
3. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Oshumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*. 1992; 119: 301-311.
4. Baba M, Takeshige K, Baba N, Oshumi Y. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol*. 1994; 124: 903-913.
5. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1993; 333: 169-174.
6. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky D. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014; 24: 24-41.
7. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998; 395: 395-398.
8. Mizushima N, Yoshimori T, Oshumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27: 107-132.
9. Oshumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*. 2014; 24: 9-23.

Regolazione dell'autofagia e sue applicazioni in patologia

Mauro Piacentini

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata";
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive IRCCS "Lazzaro Spallanzani", Roma

L'autofagia

Il termine autofagia fu coniato da Christian de Duve nel 1963, deriva dal greco "mangiare se stesso". L'autofagia è un processo catabolico delle cellule eucariotiche che coinvolge i lisosomi, altamente regolato e conservato evolutivamente, deputato alla degradazione e al riciclo di macromolecole e organelli intracellulari. L'autofagia utilizza il riarrangiamento di membrane endocellulari al fine di sequestrare materiale citoplasmatico da inviare al lisosoma, all'interno del quale i substrati vengono degradati e i singoli componenti riciclati (Levine e Klionsky, 2004). Oltre all'autofagia basale, che è presente in tutte le cellule eucariotiche, il processo può essere indotto in risposta a diverse situazioni di stress quali: deprivazione di nutrienti, stress ossidativo, segnali ormonali, o trattamento con xenobiotici (Kroemer et al., 2010). In carenza di nutrienti l'eliminazione di proteine e organelli non essenziali e il riciclo delle loro componenti rappresenta una importante possibilità di sopravvivenza per le cellule. Oltre all'adattamento al digiuno l'autofagia svolge molteplici funzioni; è coinvolta nel rimodellamento durante lo sviluppo embrionale e il differenziamento cellulare (Levine et al., 2004), partecipa al controllo della proliferazione cellulare (Klionsky 2005) ed è stato proposta come meccanismo anti-invecchiamento in quanto porta all'eliminazione di membrane, proteine e organuli danneggiati che si accumulano con l'età (Cuervo et al., 2005). L'autofagia è una componente essenziale dell'immunità innata e agisce nella difesa contro l'infezione da parte di batteri o virus permettendone la degradazione intracellulare (Levine et al., 2008). È ormai chiaro che deregolazioni del processo autofagico sono presenti e spesso causali di varie patologie quali: cancro, cardiomiopatie, malattie infettive e neurodegenerative (Mizushima et al., 2008).

Ad oggi sono state caratterizzate tre diverse vie autofagiche: la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia chaperone-mediata (CMA) che si differenziano nella loro regolazione, le modalità del processo ed il tipo di materiale da degradare.

La macroautofagia

La macroautofagia è la principale e meglio caratterizzata a livello molecolare forma di autofagia che è responsabile della degradazione sia di aggregati proteici

che di organelli danneggiati (mitocondri, perossisomi, ribosomi) in condizioni di stress (Klionsky et al., 2005). La macroautofagia comporta la formazione di vacuoli a doppia membrana che riconoscono e sequestrano tramite recettori specifici i materiali da degradare e trasportandoli ai lisosomi. Il fenomeno inizia per gemmazione da un organulo (reticolo endoplasmatico, mitocondri e membrana plasmatica) della vescicola preautofagica o fagoforo che avvolge il materiale da degradare e poi chiudendosi forma un vacuolo delimitato da una doppia membrana, chiamato autofagosoma (Figura 1). L'autofagosoma si fonde con il lisosoma formando una struttura che prende il nome di autofagolisosoma, all'interno del quale il materiale citoplasmatico è completamente degradato e i singoli componenti riciclati.

La microautofagia

La microautofagia è la forma di autofagia meno caratterizzata a livello molecolare; non richiede la formazione di vacuoli autofagici, ma consiste nell'invaginazione per mezzo di una sorta di endocitosi di materiali citoplasmatici direttamente all'interno dei lisosomi. (Mijaljica et al., 2011).

L'autofagia mediata dagli chaperoni

Le cellule eucariotiche possono degradare proteine citosoliche attraverso una terza forma di autofagia mediata da "chaperoni" (CMA). Caratteristica della CMA è la sua selettività per singole proteine citoplasmatiche, questi substrati sono riconosciuti specificamente da un complesso di chaperoni e traslocati attraverso la membrana lisosomiale mediante un canale formato dalla proteina Lamp-2A, questo processo non richiede la formazione di vacuoli o fusione di membrane. I substrati della CMA contengono ed espongono sulla loro superficie la sequenza pentapeptidica KFERQ o sequenze simili. Questo motivo è riconosciuto dalle chaperonine, tra cui una delle principali è la proteina heat shock di 70 kDa (Hsc70). Il recettore lisosomiale Lamp-2A riconosce il complesso proteina-chaperonina e ne permette il passaggio attraverso la membrana lisosomiale (Cuervo et al., 2010). Organelli o aggregati proteici non possono essere degradati dalla CMA.

La regolazione della macroautofagia

La regolazione dell'autofagia a livello molecolare è stata scoperta in gran parte nei primi anni 90 dal Prof Yoshinori Ohsumi attraverso studi genetici sul lievito *Saccharomyces cerevisiae* che hanno portato all'identificazione di più di 30 geni coinvolti nel controllo del processo. Tali geni sono stati denominati geni-Atg (*Autophagy related*), molti dei quali sono conservati nei vertebrati. Per questi studi il Prof. Ohsumi ha ricevuto il premio Nobel per la Medicina o Fisiologia nel 2016. Grazie a questi studi è stato possibile anche caratterizzare le diverse fasi alla base del processo autofagico: induzione dell'autofagia, formazione di autofagosomi, fusione con i lisosomi con formazione di autofagolisosomi e degradazione del contenuto dei vacuoli autofagici.

Induzione dell'autofagia

L'autofagia è strettamente e direttamente regolata dall'attività della serina/treonina chinasi mTor (*Mammalian target of rapamycin*) (Figura 1). mTOR regola positivamente la sintesi proteica, la proliferazione cellulare, la produzione di ATP e allo stesso tempo inibisce l'apoptosi e l'autofagia. In condizioni metaboliche sfavorevoli o quando i fattori di crescita vengono a mancare, mTOR è inattivo e l'autofagia viene indotta, in modo tale da fornire una risorsa alternativa di substrati metabolici indispensabili per la produzione di ATP e la sopravvivenza della cellula (Lum et al., 2005). In condizioni metaboliche favorevoli mTORC1 si associa con il complesso proautofagico Ulk1 che comprende Ulk1 (ortologo di Atg1 nel lievito), mAtg13 (Atg13 nel lievito), Fip200 (Atg17 nel lievito) e Atg101 (Figura1). Una volta associatosi al complesso Ulk1, mTORC1 fosforila Ulk1 e Atg13 e inibisce la loro attività chinasicca reprimendo l'autofagia. L'inattivazione di mTORC1 causa la sua dissociazione dal complesso Ulk1/Atg1, favorendo l'inizio della cascata autofagica.

Formazione degli autofagosomi

La formazione degli autofagosomi è un processo altamente conservato nel corso dell'evoluzione dal lievito ai mammiferi. Inizialmente componenti citoplasmatici, inclusi gli organelli, vengono sequestrati da una membrana pre-autofagica o di isolamento detta fagoforo. Il fagoforo si allunga e chiudendosi forma l'autofagosoma, che è un organello costituito da una doppia membrana al cui interno è presente il materiale da degradare (Figura 1). L'origine delle membrane di isolamento è ancora dibattuta; il reticolo endoplasmatico è stato proposto come l'origine della membrana autofagosomale, sebbene recentemente sembrano essere coinvolte membrane di altri organelli come i mitocondri o la membrana plasmatica (Yen et al., 2010). L'evento chiave nella formazione dell'autofagosoma è la produzione di membrane ricche in fosfatidilinositolo tris fosfato (PI3P) attraverso il complesso Atg14-Vps34/PI3K-Vps15-Beclin1 e Ambra1 (Antonioni et al., 2017). Beclin1 è stata identificata come interattore della proteina anti apoptotica Bcl2 (Sinha et al., 2008). Bcl2 regola negativamente l'autofagia attraverso il legame con Beclin1 (Patingre et al., 2005; Figura 1). È stato infatti dimostrato, che la privazione di nutrienti induce la dissociazione di Beclin1 da Bcl2 promuovendo l'autofagia. Beclin1 interagisce inoltre con Ambra1 (*Activating molecule in beclin1-regulated autophagy*), una proteina che svolge un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso centrale. Ambra1 lega Beclin1 e regola l'attività del complesso Beclin1/Vps34 promuovendo la formazione dell'autofagosoma (Fimia et al., 2007).

Nella fase di allungamento della membrana autofagosomale due sistemi di coniugazione agiscono in maniera coordinata, il complesso Atg12-Atg5-Atg16 ed il complesso Atg8-fosfatidiletanolamina (PE) (Antonioni et al., 2017). Il complesso Atg12-Atg5-Atg16 è il primo a entrare in funzione, dirige l'espansione e la curvatura della membrana dell'autofagosoma in formazione. Nell'altro sistema di coniugazione la proteina Atg8, il cui ortologo funzionale nei mammiferi è LC3 (*Microtubule-associated protein light chain 3*), viene inizialmente tagliata

dalla proteasi Atg4 a livello del Carbossi (C) terminale, in modo tale da esporre un residuo di glicina a cui viene attaccata una molecola di fosfatidiletanolamina (PE) mediante l'azione di Atg7 e Atg3. La forma non coniugata a PE di Atg8/LC3, chiamato LC3 I, si trova diffusa nel citoplasma, mentre la forma lipidata, chiamata LC3 II, si accumula sulle membrane dell'autofosoma. La conversione di LC3 da proteina solubile a proteina associata a membrana è di fondamentale importanza per l'espansione e la chiusura degli autofosomi. Mentre il complesso Atg12-Atg5-Atg16 dissocia dalla membrana poco prima il completamento della formazione dell'autofosoma, LC3 II resta legato all'autofosoma e viene degradato durante la maturazione all'interno del autolisosoma (Tanida et al., 2008). Proprio per questo motivo LC3-II è un ottimo marcatore per il rilevamento degli autofosomi maturi (Mizushima et al., 2007). LC3-II può legare direttamente la proteina p62 (sequestrosoma1, Sqstm1), che possiede all'estremità Carbossi (C) terminale un dominio associato all'ubiquitina (UBA). Attraverso questo dominio p62 riconosce proteine mal ripiegate e gli aggregati di proteine poliubiquitinate troppo grandi per essere degradate dal proteosoma (Bjorkoy et al., 2005). p62 agisce quindi da adattatore: da una parte lega LC3 attraverso il dominio LIR (*LC3 Interacting Region*), dall'altra lega l'ubiquitina delle suddette proteine citosoliche (Noda et al., 2008). L'ultima fase nel processo di autofagia e la formazione dell'autofagolisosoma attraverso la fusione tra la membrana esterna degli autofosomi e quella dei lisosomi avviene mediante proteine appartenenti alla famiglia delle SNARE e da piccole proteine con attività GTP-asi chiamate Rab che sono coinvolte in fenomeni di fusione di membrane in diversi contesti cellulari (Antonioni et al., 2017). Dopo la fusione, all'interno dei lisosomi si trovano vacuoli autofagici

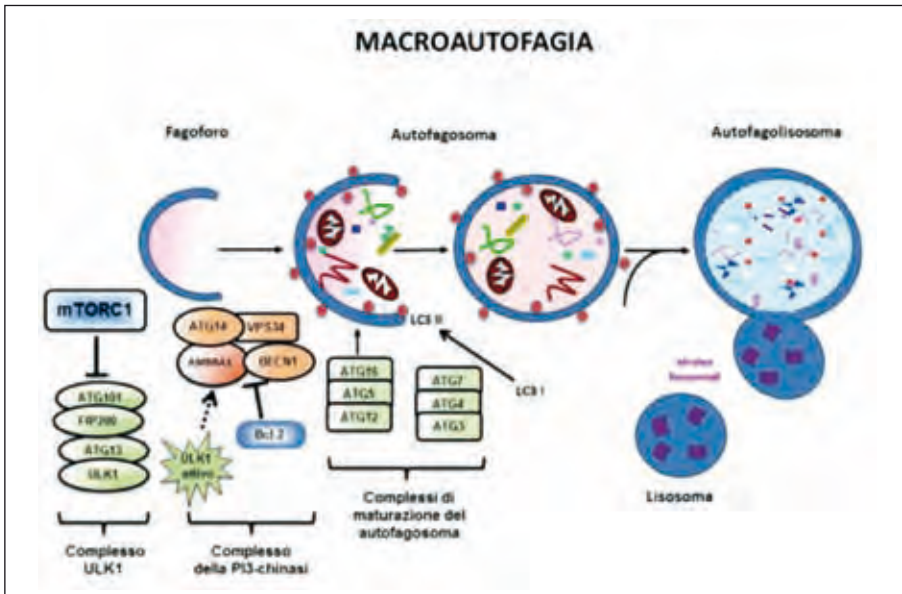


Fig. 1

delimitati da un solo strato lipidico, questi vengono chiamati corpi autofagici, per distinguerli dagli autofagosomi delimitati da una doppia membrana. Tali corpi vengono efficientemente degradati e il loro contenuto idrolizzato fino alle componenti più semplici come aminoacidi, zuccheri, acidi grassi e nucleotidi, che vengono riciclati per la sintesi di componenti essenziali (Figura 1).

Ruolo dell'Autofagia in patologia

Disfunzioni del processo autofagico sono associate all'insorgenza di molte malattie, inclusi tumori e malattie neurodegenerative (Figura 2). Il ruolo dell'autofagia nel cancro è complesso e dibattuto, a causa delle evidenze che sostengono un suo ruolo sia pro che antitumorale. Da un lato, l'autofagia può agire come soppressore tumorale prevenendo l'accumulo di proteine e organelli danneggiati e conseguentemente l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno che favoriscono le mutazioni al DNA. Dall'altro lato l'abilità dell'autofagia, soprattutto nei tumori solidi, di supportare la sopravvivenza cellulare in condizioni di ipossia e scarsità di nutrienti favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali (Kondo et al., 2005). Molti lavori definiscono l'autofagia come un meccanismo di soppressione tumorale. Numerosi geni autofagici come Beclin1 hanno proprietà di soppressori tumorali (Qu et al., 2003). Inoltre, si stanno accumulando evidenze che indicano come la regolazione dell'autofagia è strettamente legata all'oncogenesi. Diversi comuni oncogeni (per esempio quelli codificanti PI3K di classe I, Pkb, Tor, Akt) inibiscono l'autofagia, mentre geni soppressori del tumore (come quelli codificanti p53, Pten, Tsc1, Tsc2) stimolano l'autofagia (Botti et al., 2006).

Autofagia e neurodegenerazione

Numerosi lavori dimostrano che gli autofagosomi si accumulano nel cervello dei pazienti affetti da malattie neurodegenerative, quali: il morbo di Alzheimer,



Fig. 2

il morbo di Parkinson e la malattia di Huntington (Rubinsztein et al., 2007), portando a ipotizzare che difetti nell'autofagia siano coinvolti nella patogenesi di numerosi disturbi neurodegenerativi.

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate dall'accumulo di aggregati di proteine mutate nel citoplasma dei neuroni. Il meccanismo con cui queste proteine esercitano la loro tossicità cellulare è ancora controverso, ma in generale si ritiene che esse siano particolarmente tossiche quando formano complessi oligomericici (Martinez-Vicente et al., 2007). Molti studi mostrano che l'attivazione dell'autofagia riduce, mentre la sua inibizione aumenta, la formazione di aggregati proteici e la neurotossicità di proteine a rischio e propongono un modello secondo cui l'autofagia funziona come un sistema di controllo di qualità che degrada proteine oligomeriche potenzialmente tossiche. Questo fenomeno è stato dimostrato per entrambe le forme, selvatica e mutata, della proteina tau responsabile della malattia di Alzheimer, per le forme mutate della proteina α -sinucleina che causano il Morbo di Parkinson familiare, e proteine contenenti estese ripetizioni di poliglutamina che causano il morbo di Huntington, la malattia di Kennedy, e l'ataxia spinocerebellare di tipo III (Williams et al., 2006). A sostegno di un ruolo protettivo dell'autofagia, animali transgenici con ablazione selettiva dei geni Atg5 o Atg7 a livello del sistema nervoso sviluppano una neurodegenerazione estremamente rapida, accompagnata dalla presenza di corpi inclusi e morte precoce (Komatsu et al., 2006). Questi risultati dimostrano che l'autofagia basale è importante per prevenire l'accumulo di proteine che potrebbero causare danni alle funzioni dei neuroni, anche in assenza di mutazioni associate a malattie. Al tempo stesso, suggeriscono, che l'autofagia è un importante target terapeutico per il trattamento delle malattie neurodegenerative.

Autofagia e infezioni virali

L'autofagia è un processo catabolico importante per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, ma interviene anche nella prevenzione di patologie umane come le infezioni (Levine e Klionsky, 2004). Infatti l'autofagia, in maniera simile all'eliminazione dei costituenti cellulari, può rimuovere batteri, virus e protozoi, liberi nel citosol o all'interno di fagosomi (Xenofagia) (Levine e Deretic, 2007). Il ruolo dell'autofagia nelle infezioni è complesso, infatti oltre che nella diretta eliminazione di alcuni virus, è anche coinvolta nella rimozione di fattori cellulari richiesti per la replicazione virale o nell'inibizione della risposta immunitaria innata. Al contrario l'autofagia interviene nella promozione della sopravvivenza delle cellule infettate dal virus sia rimuovendo componenti tossiche cellulari o virali, sia mantenendo l'omeostasi cellulare (Levine e Deretic, 2007). Inoltre il processo autofagico svolge un ruolo importante nell'attivazione della risposta immunitaria innata ed adattativa. Per quanto riguarda l'immunità innata, recenti evidenze sperimentali indicano che l'autofagia interviene nel trasporto di acidi nucleici virali intracellulari ai recettori toll-like (TLRs) che innescano la produzione di interferone di tipo I (IFN), promuovendo uno stato antivirale (Levine e Deretic, 2007). Inoltre l'autofagia promuove l'immunità adattativa favorendo la presentazione di antigeni virali citosolici da parte delle MHC di classe II, importanti per l'attivazione dei linfociti T CD4⁺ (Levine e Deretic, 2007). È interessante come la relazione tra

autofagia e immunità è bidirezionale: non solo l'autofagia promuove la risposta immunitaria, ma citochine, recettori e ligandi coinvolti nell'immunità innata e adattativa stimolano o inibiscono il processo autofagico. Le molecole PKR (proteina chinasi dipendente da RNA a doppio filamento), $IFN\gamma$ e TNF (tumor necrosis factor) inducono il processo autofagico, al contrario l'interleuchina (IL) 4 e IL-13 regolano negativamente l'autofagia (Levine e Kroemer, 2008).

L'autofagia costituisce quindi un meccanismo essenziale della risposta antivirale delle cellule eucariotiche. Molti studi hanno dimostrato i meccanismi attraverso i quali l'autofagia limita la replicazione virale. Un esempio è interessante è rappresentato dall'infezione da virus Sindbis, che provoca encefaliti. È stato osservato che nei topi in cui viene aumentata l'autofagia per via genetica questo evento conferisce protezione contro la replicazione virale, in quanto gli effetti patologici del virus sono meno gravi e si riscontra un più basso titolo virale rispetto a topi selvatici (Levine e Deretic, 2007). Nel corso dell'evoluzione i virus hanno acquisito meccanismi specifici che inibiscono il processo autofagico allo scopo di evitare il contenimento della loro replicazione, mentre altri virus inducono autofagia per servirsi degli autofagosomi come sito per la replicazione virale. Ad esempio il virus herpes simplex-1 (HSV-1) sfugge alla degradazione operata dall'autofagia poiché esprime la proteina ICP34.5 che inibisce l'autofagia legando la proteina Beclin1 (Levine e Kroemer, 2008). Altri virus codificano proteine che inibiscono la funzione di Beclin1, proteina importante per l'avvio del processo autofagico. In particolare, i gamma herpes virus oncogeni inducono l'espressione di proteine simili a BCL-2, le quali legando Beclin1 ne bloccano l'attività autofagica (Levine e Kroemer, 2008).

Bibliografia

1. Antoniolli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42: 28-41.
2. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 2005; 171: 603-614.
3. Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy.* 2006; 2: 67-73.
4. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, French M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy.* 2005; 1: 131-140.
5. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010; 21: 142-150.
6. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di BS, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 2007; 447: 1121-1125.
7. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000; 290, 1717-1721.

8. Klionsky DJ. Autophagy. *Curr. Biol.* 2005; 15: R282-R283.
9. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006; 441: 880-884.
10. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 726-734.
11. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell.* 2010; 40: 280-293.
12. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 767-777.
13. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 2004; 6: 463-477.
14. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132: 27-42.
15. Lum JJ, De Berardinis R J, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6: 439-448.
16. Martinez-Vicent M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp. Gerontol.* 2005; 40: 622-633.
17. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011; 7: 673-682.
18. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451: 1069-1075.
19. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007; 3: 542-545.
20. Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells.* 2008; 13: 1211-1218.
21. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122: 927-939.
22. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1809-1820.
23. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 304-312.
24. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* 2008; 445: 77-88.
25. Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2006; 76: 89-101.
26. Yen WL, Shintani T, Nair U, Cao Y, Richardson BC, Li Z, Hughson FM, Baba M, Klionsky DJ. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J. Cell Biol.* 2010; 188, 101-114.

Metodi di Ingegneria Tissutale per lo studio dell'autofagia

Lorenzo Fassina

Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Università degli Studi di Pavia

Alcuni concetti base dell'Ingegneria Tissutale

L'Ingegneria Tissutale è stata così definita: "Tissue engineering is the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and development of biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue functions".

Il concetto fondamentale che emerge dalla precedente definizione è la cosiddetta relazione tra struttura e funzione. In altre parole, le cellule sono caratterizzate sia all'interno che all'esterno da un contesto strutturale (chiamato 'tensegrity') in grado di modulare proliferazione e differenziamento. In particolare:

- 1) C'è continuità strutturale tra proteine extracellulari, integrine della membrana plasmatica, citoscheletro, membrana nucleare e macromolecole di DNA (eterocromatina, eucromatina durante l'interfase del ciclo cellulare, Figura 1A).
- 2) Alla precedente tensegrity vanno aggiunti i pori del nucleo attraverso cui passano fattori di trascrizione, mRNA e miRNA (Figura 1A).

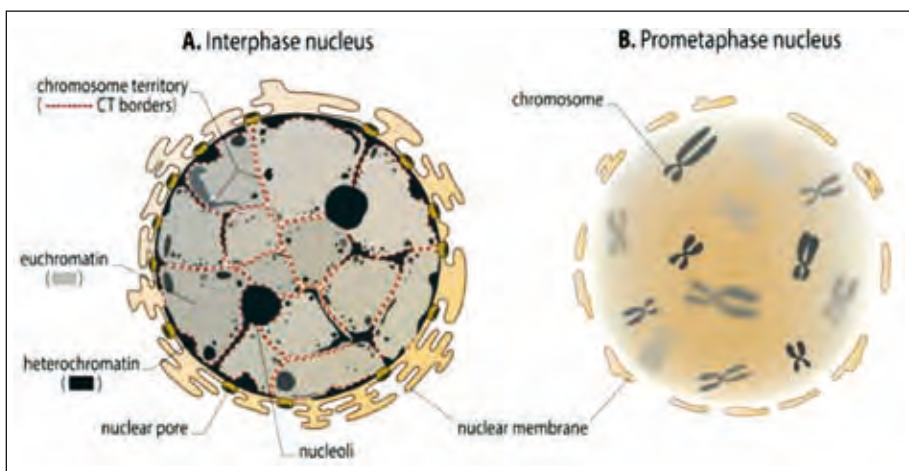


Fig. 1 - Organizzazione spaziale del DNA in interfase e in prometafase (1).

- 3) Forze e deformazioni (concentrate, distribuite, perpendicolari alla membrana plasmatica, di shear cioè parallele alla membrana plasmatica) sono trasmesse lungo l'impalcatura della tensegrity fino al DNA in interfase, influenzandone la trascrizione (Figura 2).
- 4) Tali forze e deformazioni, così trasmesse, sono anche in grado di modulare la permeabilità dei pori del nucleo, influenzando così il traffico di fattori di trascrizione, mRNA e miRNA.
- 5) I principali attori biochimici sono quasi tutti collegati alla impalcatura della tensegrity (si pensi alla proteina G, al PIP_2 , al DAG, agli enzimi localizzati su membrane). Si è dimostrato che queste molecole guidano le reazioni biochimiche non solo dal punto di vista chimico, ma anche dal punto di vista spaziale; cioè le reazioni biochimiche sono possibili perché avvengono in una ben precisa organizzazione spaziale.
- 6) Inoltre un citoscheletro funzionante e rimodellabile (cioè non distrutto o fissato) è una condizione necessaria per varie reazioni biochimiche (ad esempio la via G- PIP_2 -DAG- IP_3).

Fatte queste considerazioni, si capisce come l'Ingegneria Tissutale sia una disciplina multidisciplinare che utilizza concetti e metodi sia della Biologia sia

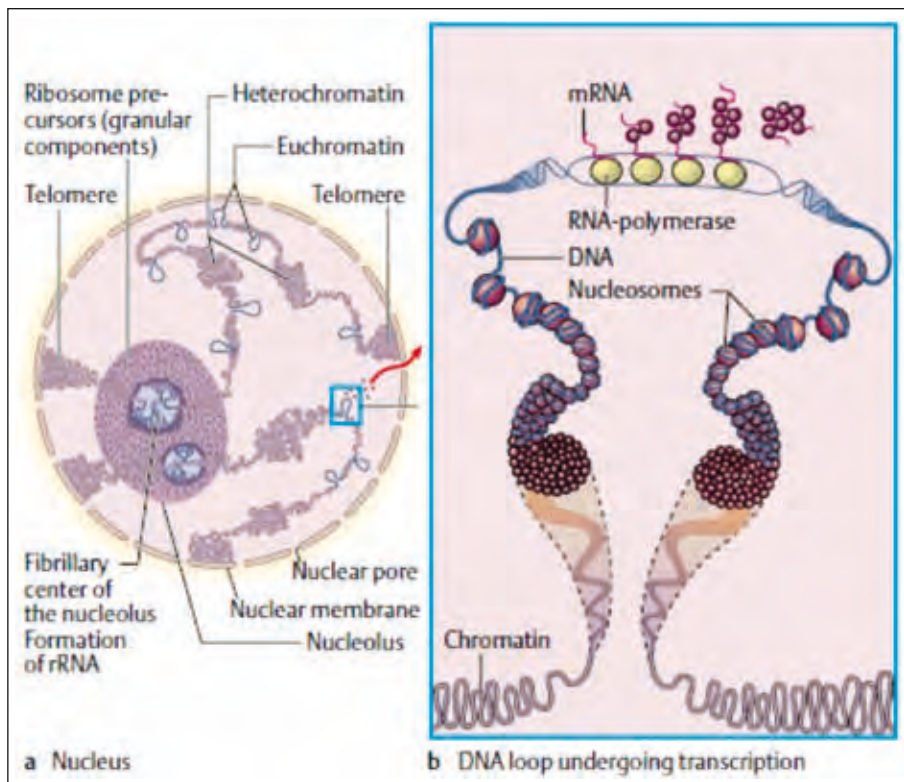


Fig. 2 - Eterocromatina ed euromatina (2).

dell'Ingegneria dandosi il compito di studiare come le variazioni del contesto strutturale (tensegrity) in cellule, tessuti, organi inducano variazioni nelle funzioni biologiche (ad esempio: crescita e differenziamento delle cellule, formazione e rimodellamento dei tessuti, morfogenesi, funzionamento degli organi).

Un esempio (3) classico dell'effetto della tensegrity è rappresentato nella Figura 3. All'aumentare dell'adesività della superficie di coltura, adesività causata dalla deposizione di fibronectina, aumenta l'area di spreading cellulare; la conseguenza

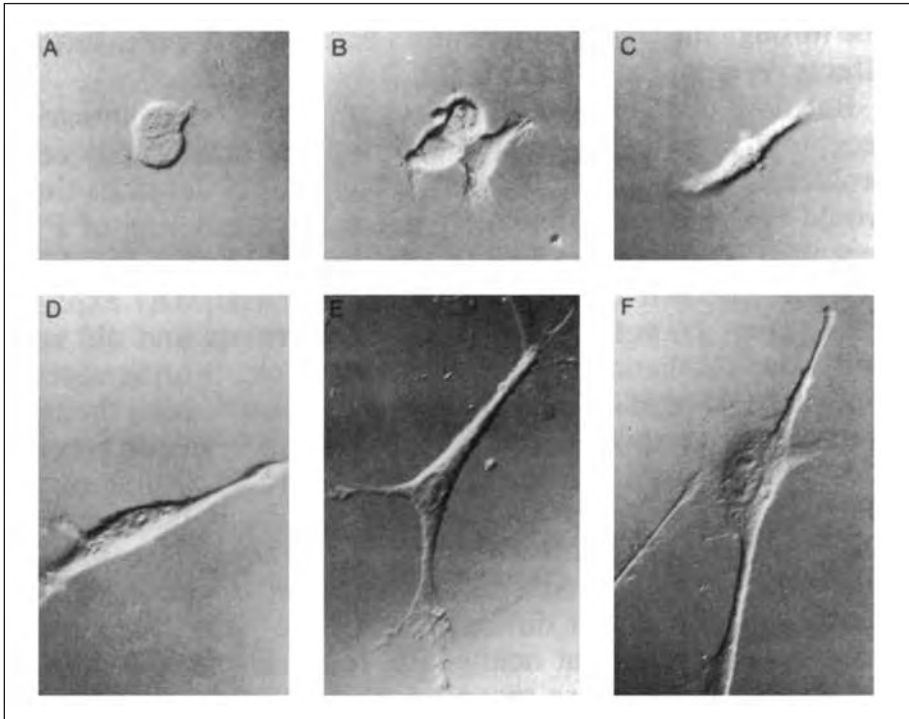
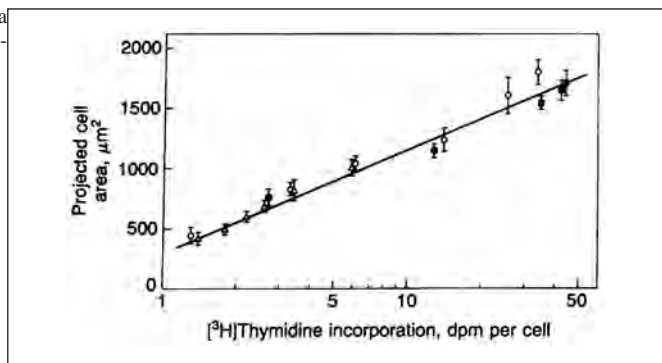


Fig. 3 - Variazione dello spreading all'aumentare della concentrazione di fibronectina (da A a F) (3).

Fig. 4 - Aumento della proliferazione all'aumentare dello spreading (3).



di ciò è una maggiore crescita (misurata, nelle cellule proliferate, in termini di incorporazione del nucleoside radioattivo timidina triziata) (Figura 4).

Un altro esempio (4) è rappresentato dalla semina di singoli epatociti su singole aree ottenute con particolari tecniche fotochimiche (Figura 5). Si dimostra sperimentalmente (Figura 6) che gli epatociti adesi a piccole aree producono albumina e hanno una bassa proliferazione (cioè mantengono il loro fenotipo), mentre, se le stesse cellule vengono fatte aderire su aree maggiori, allora queste tendono a proliferare di più e a produrre minori quantità di albumina (ovvero non mantengono il caratteristico fenotipo).

Altro esempio (5) famoso è la formazione, da parte delle cellule endoteliali, di strutture cordoniformi *in vitro*. In questo esperimento, gli autori cercavano di capire in quale particolare tensegrity è favorita la formazione di capillari; lo scopo del lavoro era quello di trovare come sfavorire la neo-angiogenesi in tessuti tumorali. Come si vede in Figura 7, solo particolari concentrazioni di fibronectina e di collagene IV (collagene della lamina basale) sono in grado di favorire la formazione di strutture endoteliali cordoniformi.

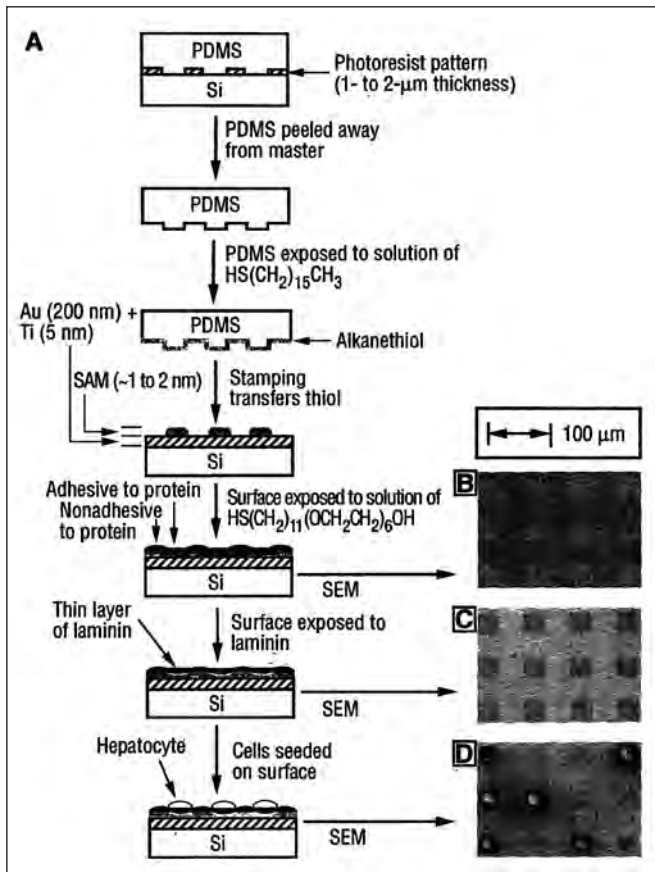


Fig. 5 - Produzione di aree di spreading per singoli epatociti (4).

Fig. 6 - Proliferazione (barre nere) e produzione di albumina (barre grigie) in funzione dell'area di spreading (4).

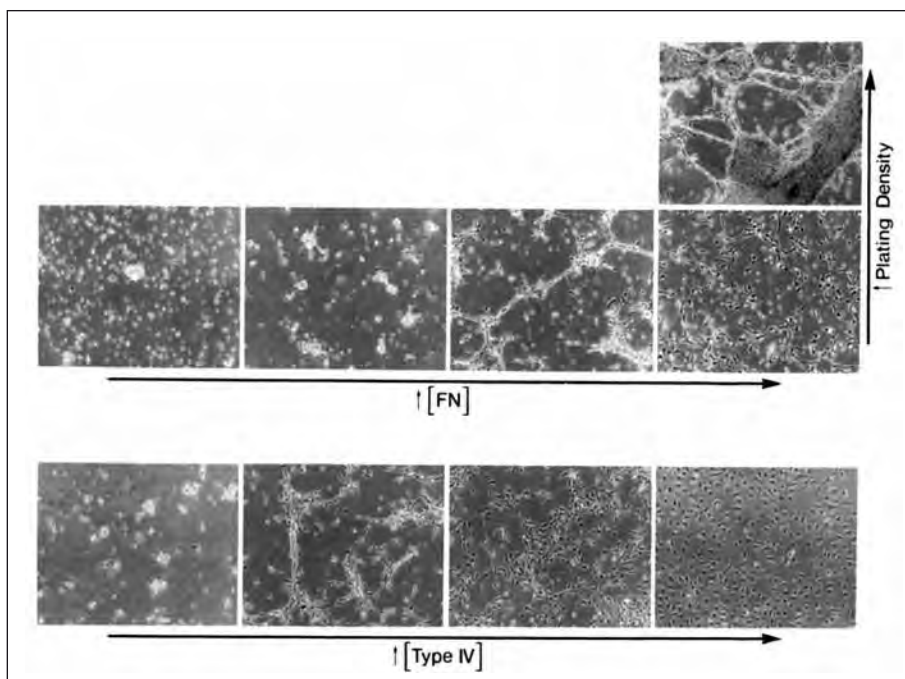
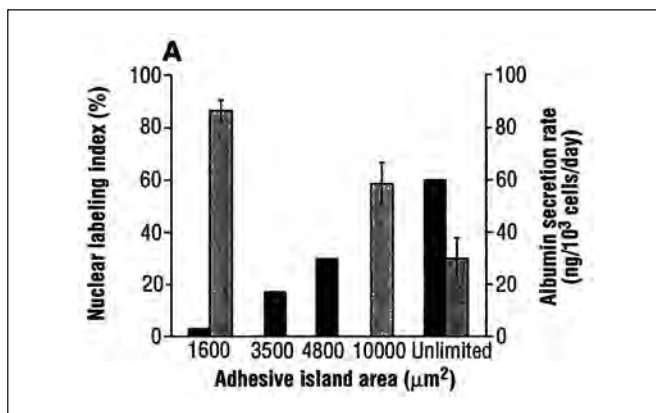


Fig. 7 - Formazione di capillari al variare della concentrazione di fibronectina e di collagene IV (5).

Risultati sperimentali

Venendo alla nostra esperienza, presso il Centro di Ingegneria Tissutale (CIT) dell'Università di Pavia è stato progettato un bioreattore elettromagnetico per la stimolazione biofisica delle cellule *in vitro* (6). Tale apparecchiatura è costituita da due avvolgimenti elettrici (chiamati solenoidi) (in verde in Figura 8) al cui centro è posizionata la coltura cellulare. Il bioreattore è in grado di stimolare le cellule con

un campo magnetico variabile nel tempo (intensità massima =3.3 mT, frequenza =75 Hz) e con un campo elettrico indotto variabile nel tempo (Figura 8).

Come si vede nelle immagini al microscopio elettronico a scansione (Figura 9), la stimolazione elettromagnetica è in grado, rispetto al controllo non trattato, di promuovere la proliferazione cellulare con la formazione di estesi cluster 3D formati da cellule e da matrici extracellulare ossea (6).

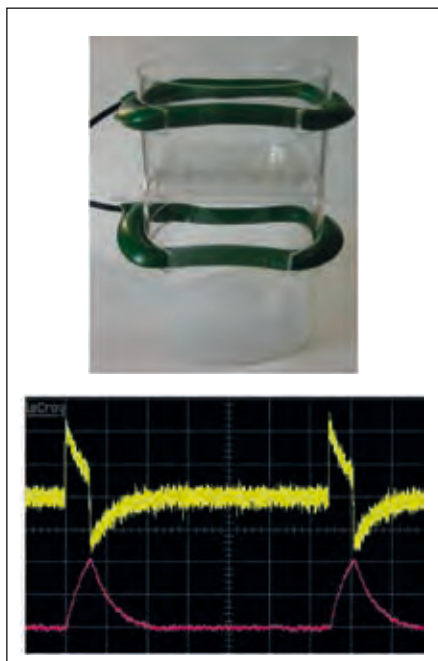


Fig. 8 - Bioreattore elettromagnetico (sinistra), tensione indotta (giallo), campo magnetico (rosa) (6).

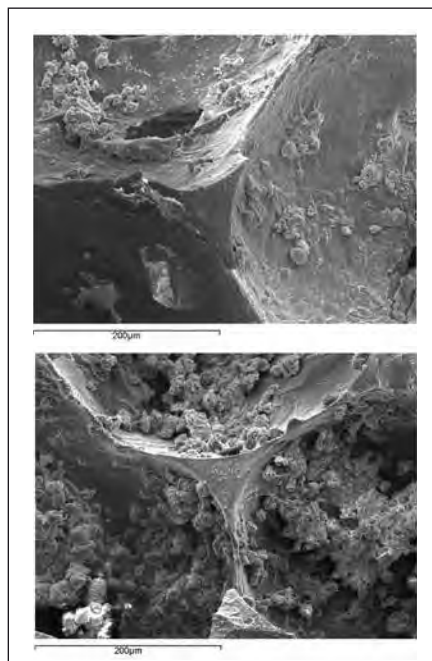


Fig. 9 - Coltura di osteoblasti di controllo (sinistra) e coltura stimolata elettromagneticamente (destra) (6).

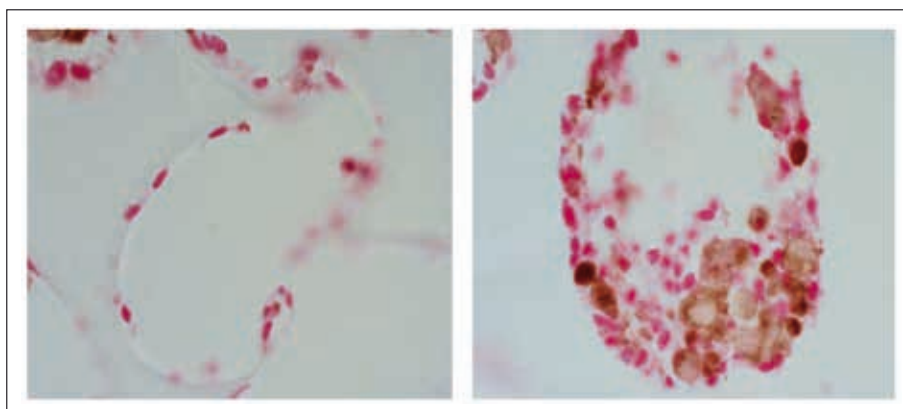


Fig. 10 - Coltura di osteoblasti di controllo (sinistra) e coltura stimolata elettromagneticamente (destra) (6).

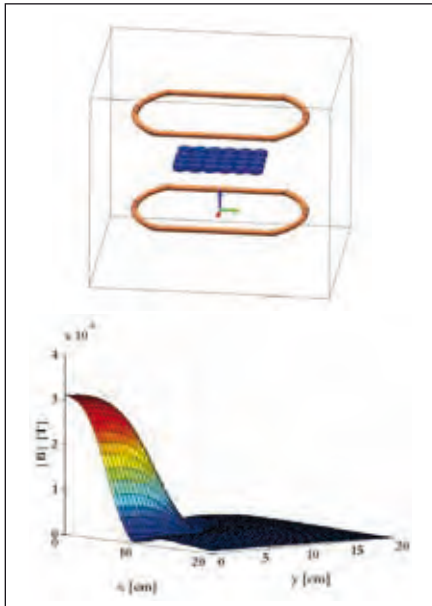


Fig. 11 - Modello *in silico* del bioreattore elettromagnetico (sinistra) e distribuzione 3D del campo magnetico nell'istante in cui è massimo (destra) (7).

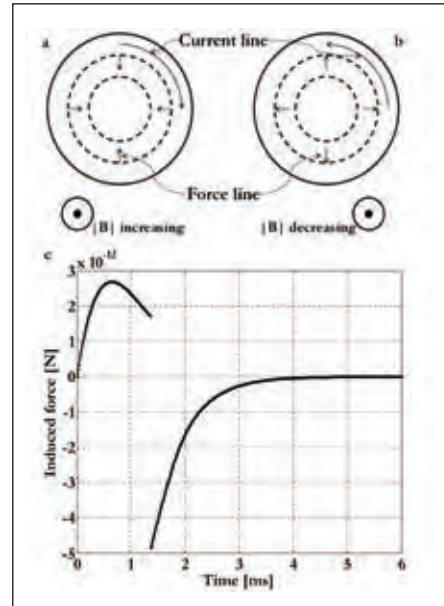


Fig. 12 - Correnti elettriche indotte (in alto) e andamento temporale delle forze meccaniche locali di compressione e trazione in direzione radiale (in basso) (7).

Inoltre, la stimolazione elettromagnetica fa aumentare il grado di calcificazione della matrice extracellulare ossea (aree marroni nelle sezioni istologiche di Figura 10).

Per spiegare i precedenti effetti biologici, è stato realizzato un modello *in silico* del bioreattore elettromagnetico (7). In Figura 11 vediamo il modello dei solenoidi con al centro la geometria di una piastra multiwell per colture cellulari; osserviamo inoltre la distribuzione 3D del campo magnetico nell'istante in cui è massimo.

Gli effetti biologici possono essere spiegati calcolando le correnti elettriche indotte nel medium di coltura (Figura 12): il campo magnetico variabile nel tempo induce correnti elettriche variabili nel tempo, le quali, a loro volta, per la legge di Faraday-Neumann-Lenz, in quanto immerse in un campo magnetico variabile nel tempo, generano forze meccaniche locali di compressione e trazione in direzione radiale, ovvero sia in direzione ortogonale alle membrane delle cellule (7). In altri termini, le cellule all'interno del bioreattore elettromagnetico subiscono una stimolazione meccanica che non è nient'altro che una vibrazione meccanica alla frequenza di 75 Hz e con intensità di forza dell'ordine del pN.

Studio dell'autofagia

Presso il Centro di Ingegneria Tissutale è stato inoltre messo a punto un sistema di analisi di immagini per lo studio delle vescicole autofagiche (autofagosomi) (8).

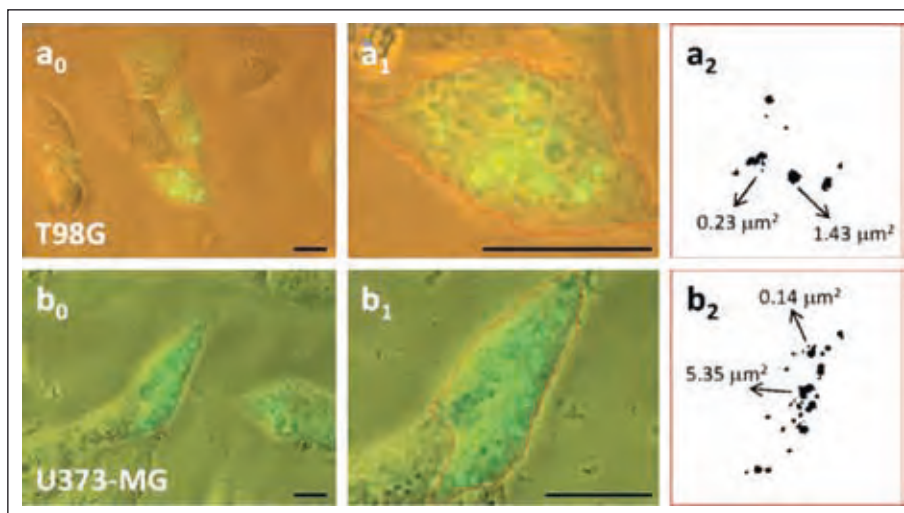


Fig. 13 - Analisi delle aree autofagiche fluorescenti (8).

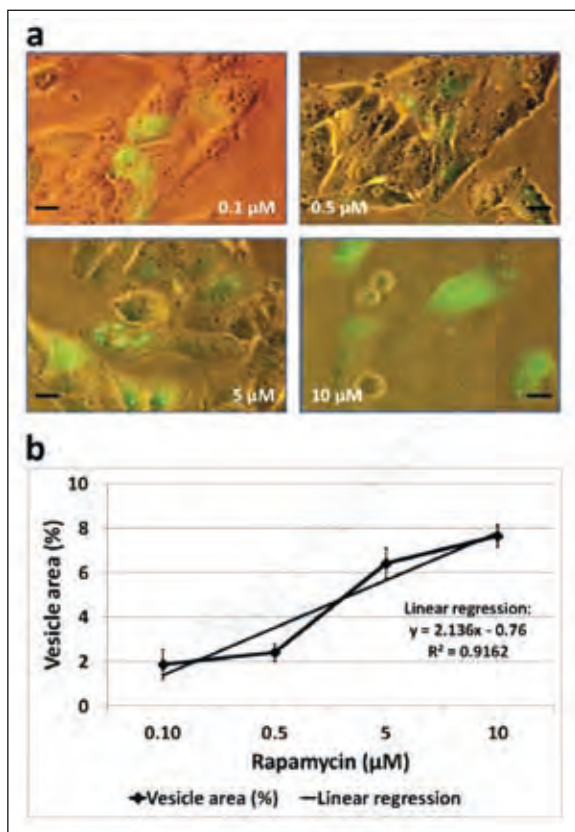


Fig. 14 - All'aumentare della concentrazione di rapamicina aumenta l'area fluorescente occupata dagli autofagosomi (8).

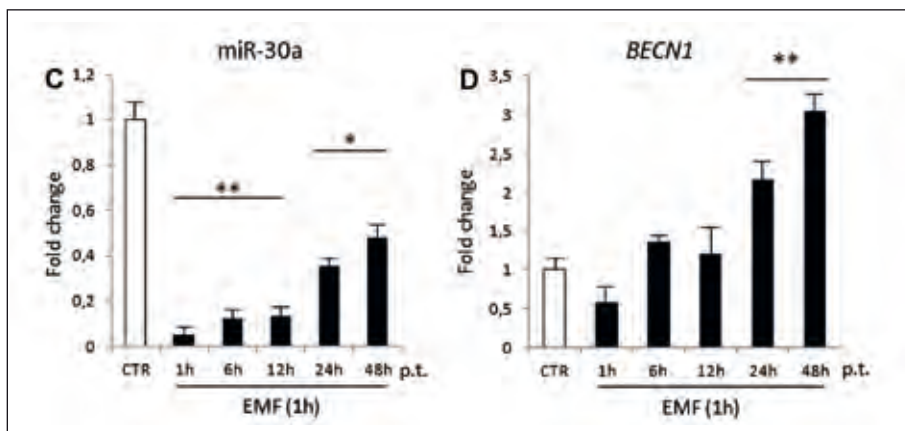


Fig. 15 - Espressione del miR-30a e della relativa proteina beclina 1 (BECN1) dopo l'applicazione della stimolazione elettromagnetica per un'ora (9).

In particolare, il sistema valuta l'estensione delle aree autofagiche che emettono fluorescenza (marcatura basata sull'espressione di LC3B-GFP).

Mediante questo sistema di analisi è stato possibile valutare, in modello di glioblastoma, l'effetto della rapamicina (una molecola che induce l'autofagia): all'aumentare della concentrazione di rapamicina aumenta l'area fluorescente occupata dagli autofagosomi, cioè aumenta l'autofagia.

Infine, è stata studiata, in un modello neuronale, l'autofagia indotta dal bioreattore elettromagnetico (9). Il razionale di tale lavoro era mostrare che il campo elettromagnetico è in grado di migliorare la clearance di accumuli intracellulari (per esempio di β -amiloide in un modello di Alzheimer) mediante il fenomeno dell'autofagia.

In particolare, in Figura 15, si vede come il campo elettromagnetico causa una diminuzione del miR-30a e, di conseguenza, un aumento dell'espressione della beclina 1, proteina fondamentale per l'autofagia nei neuroni. In pratica, il campo elettromagnetico stimola epigeneticamente la produzione di beclina 1, predisponendo così i neuroni a potenziare l'autofagia in vista di una più accentuata rimozione di accumuli intracellulari. Questo risultato potrebbe perciò avere conseguenze positive nella lotta agli accumuli di β -amiloide nella malattia di Alzheimer.

Bibliografia essenziale

1. <https://www.mechanobio.info/topics/genome-regulation/chromatin/>
2. http://onlinehumanbody.blogspot.it/2010_09_01_archive.html
3. Ingber DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 3579-3583.
4. Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, et al. Engineering cell shape and function. Science. 1994; 264: 696-698.

5. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: role of extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989; 109: 317-330.
6. Fassina L, Visai L, Benazzo F, et al. Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1985-1999.
7. Mognaschi ME, Di Barba P, Magenes G, et al. Field models and numerical dosimetry inside an extremely-low-frequency electromagnetic bioreactor: the theoretical link between the electromagnetically induced mechanical forces and the biological mechanisms of the cell tensegrity. *Springerplus.* 2014; 3: 473.
8. Fassina L, Magenes G, Inzaghi A, et al. AUTOCOUNTER, an ImageJ JavaScript to analyze LC3B-GFP expression dynamics in autophagy-induced astrocytoma cells. *Eur J Histochem.* 2012; 56: e44.
9. Marchesi N, Osera C, Fassina L, et al. Autophagy is modulated in human neuroblastoma cells through direct exposition to low frequency electromagnetic fields. *J Cell Physiol.* 2014; 229: 1776-1786.

Methods for the ultrastructural detection of autophagy and phagocytosis

Marco Biggiogera

Laboratorio di Biologia Cellulare e Neurobiologia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Pavia

Over the years, the ultrastructural approach to the study of the cell functions has given proof of its validity either in discovering or in confirming cell processes and mechanisms. Two examples are represented by apoptosis and phagocytosis. In the first case, the very first definition of a new cell death process was provided after seeing the peculiar features of an apoptotic cell and its strange chromatin distribution (1). As for phagocytotic process, including autophagocytosis, electron microscopy (EM) is still invaluable in the demonstration of the occurrence of this mechanism (2).

In general, EM analysis is taken as producing, for granted, a morphological illustration of the tissue, i.e. offering the possibility of observing the presence of the main chemical species (proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids) constituting a cell or a tissue. This is true for the majority of the studies involving the description of endocytic mechanisms; however it is not the only possibility. Here we shall see some approaches to this problem.

Morphology

Classical morphology at EM involves the use of a few chemical reagents standardised over the years. The first fixation is obtained with glutaraldehyde, a strong fixative which due to its two aldehyde groups can create cross-links. Proteins are the first and main targets, although it should not be forgotten that in a second, time-dependent step, DNA and RNA will be fixed and subsequently also phospholipids. The latter, in a cell biologist's mind, mean membranes. This is the reason why one cannot obtain an excellent preservation of membrane structure using formaldehyde instead of glutaraldehyde, even in a double fixation protocol (3).

As a second step, osmium tetroxide is conventionally utilised in order to preserve the lipid component. OsO₄ is a powerful oxidizing agent and its primary targets are lipids, in particular unsaturated ones. As for glutaraldehyde, however, Os can

react with nucleic acids (although weakly) and with proteins. Since membranes contain both lipids and proteins, Os helped the great electron microscopist of the 50s and 60s (4) in describing the formation and structure of the cell membrane. It uses, on the other hand, somehow created a paradox in the interpretation of the membrane structure, leading to the trilaminar model which has been proven to be incorrect.

This was essentially due to the fact that Os binds lipids but also proteins thus creating a black bilayer with a clear zone inside. This was in addition amplified by the fact that heavy metal stains used as contrasting agents have a diabolical ability to “stain” an already-present stain. In brief uranyl and lead stained osmium, increasing the scattering signal of the protein moiety. It must be noted that the series of reactions leading from OsO₄ to the black end precipitate has never been completely clarified, as passing through OsVII, OsVI and “osmium blacks” (3) is still an incomplete cascade.

Cryofixation/cryosubstitution

It is possible to fix cells (and block mechanisms and events) also by rapid cooling down of the specimen. Nowadays the best method involves the use of High Pressure Freezing (HPF). This technique consists of freezing in liquid nitrogen at very high pressure in order to vitrify water and obtain amorphous ice, without ice crystallisation and no increase in volume. This minimises the artefacts and preserves membranes.

The appearance of a vitrified and cryosubstituted specimen strictly depends on the following passages: if Os or uranyl are present in the subsequent steps, they are similar to the classical ones (although it is so far not clear how these chemical work at -80°C); otherwise they appear as negative, white lines. They can still be discernible for detecting endocytic vacuoles or phagosomes but the matter is not trivial.

Immunocytochemistry (ICC)

A biological sample for ICC can be double fixed as already reported in *Morphology*, or more specifically treated to get the best yield of labelling. In the latter case formaldehyde is used, osmium is omitted and, due to alcoholic dehydration, membrane lipids are lost. In some cases, however, this is not as dramatic as it seems (5). When the labelling for autophagic markers is present, for instance, the positive labelling can be as important as the presence of the membranes. Alternatively, the immunolabelling can be carried out *before* embedding thus preventing the above problems (Os fixation can be used).

Photoconversion

An alternative, elegant method, is represented by photoconversion techniques. These rely on the possibilities of visualising a fluorescent molecule at EM. This is

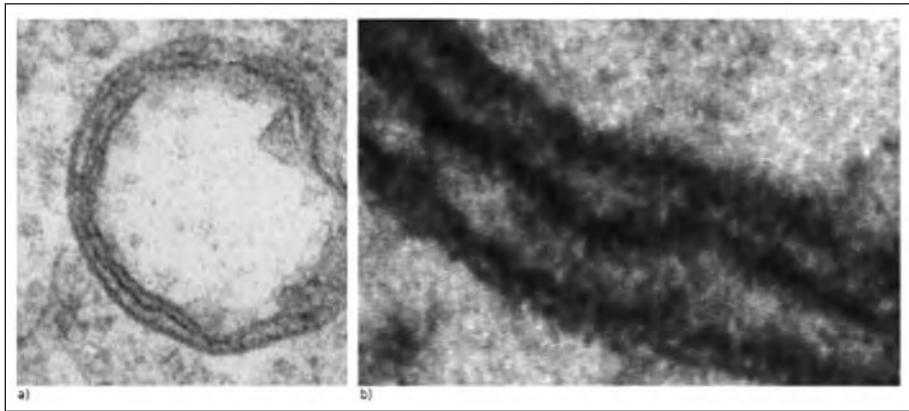


Fig. 1 - a) An autophagosome at low magnification after glutaraldehyde/osmium/ epon preparation. The presence of several membranes is evident. 30000 x. b) High magnification of the same specimen. Within the membranes the apparent trilaminar layer is clearly visible. 120000 x. The sample is part of an ongoing collaboration with Prof. A. Forlino.

not directly possible but only after a particular step described by Maranto (6) and Sandell and Marsden (7).

The method is very interesting since there are more “dedicated” fluorescent molecules than those available for EM. The cells are labelled with the fluorochrome, a marker of autophagocytosis for instance, maybe even *in vivo*, fixed and then reacted with diaminobenzidine (DAB) under the excitation light at the given peak for the fluorochrome. The excited molecule emits light and induces the formation of ROS which oxidize DAB making it precipitate.

The subsequent use of Os makes the DAB black and electron dense. Since the lifespan and movements of ROS are very short, DAB precipitation occurs almost exactly on the site of light emission, thus assuring a very high resolution of the end product. Photoconversion methods can of course be applied only to one fluorochrome at a time.

Electron tomography

A new approach can be utilised when one of the goals is to reconstruct the 3D image of an autophagosome. Electron tomography involves the use of a medium/high voltage TEM thus allowing the use of semithin sections about 2 to 4 μm thick. By tilting the specimen under the electron beam one can obtain dozens of lateral projections of any object contained within the section. High voltage (i.e. highly accelerated electrons) are hence needed to cross the specimen, whose thickness increases up to threefold during the tilting process (8).

A dedicated software can then reconstruct the 3D image, with a final rendering of the object. An interesting modification implies the use of photoconversion to stain a specifically labelled object. In this way the final image will only show the highly contrasted object of interest.

Bibliografia essenziale

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257.
2. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Monitoring Autophagy by Electron Microscopy in Mammalian Cells. *Meth Enzymol*. 2009; 452: 143-164.
3. Hayat MA. Stained and cytochemical methods. New York, Plenum Press. 1993.
4. Murphy DB. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. New York, Wiley Liss. 2001.
5. Martinet W, Timmermans JP, De Meyer GRY. Methods to Assess Autophagy In Situ - Transmission Electron Microscopy Versus Immunohistochemistry. *Meth Enzymol*. 2014; 543: 90-114.
6. Maranto AR. Neuronal mapping: a photooxidation reaction makes Lucifer yellow useful for electron microscopy. *Science*. 1982; 217: 953-955.
7. Sandell JH, Masland RH. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J Histochem Cytochem*. 1988; 36: 555-559.
8. Biazik J, Vihinen H, Anwar T, Jokitalo E, Eskelinen EL. The versatile electron microscope: An ultrastructural overview of autophagy. *Methods*. 2015; 75: 44-53.

Regulation of autophagy

Anna Ivana Scovassi

Istituto di Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pavia

Introduction

Autophagy (from the Greek words *αὐτός* (*autos*) and *φαγέω* (*fageo*) meaning “self-eating”) is an evolutionarily conserved catabolic process in charge for ensuring the regular turnover of cellular components through sequestration, transport to lysosomes and therein degradation of organelles and macromolecules (1-3). The key event in autophagy is the formation of autophagosome and autolysosome, a process that requires several sequential steps schematized in Figure (4, 5).

Autophagy regulation

The first insights into the molecular control of autophagy originated from yeast genetic analysis, leading to the identification of the first autophagy-related gene *atg1*, and of *atg* orthologues in different species, supporting the notion that autophagy is evolutionary conserved (7).

As illustrated in Figure 2, the key negative regulator of autophagy is mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), a Ser/Thr kinase that controls many cellular

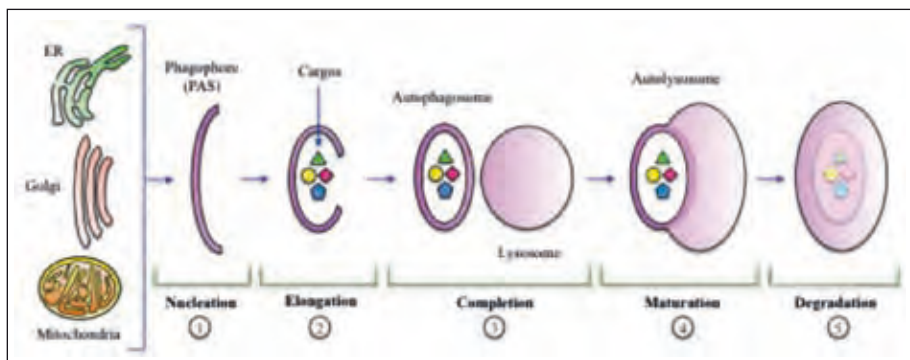


Fig. 1 - Stepwise regulated autophagy. *Nucleation* (1) and *Elongation* (2): the phagophore originated from membranes of organelles encloses the cytosolic cargos (long-lived, misfolded proteins and damaged organelles) leading to the formation of the autophagosome (*Completion*, (3)). *Maturation* (4): the autophagosome fuses with lysosome to form the autolysosome. *Degradation* (5): digestion of autolysosomal content and release of products in the cytosol (6).



Fig. 2 - Main players of the autophagy cascade (6).

processes, including transcription and protein synthesis. Under stress conditions, mTOR is inactivated, thus allowing autophagy to start through the formation of the ULK complex, composed of FIP200 (FAK-family Interacting Protein of 200 kDa), ULK (Unc-51-Like Kinase) and ATG13, followed by the formation of a multimeric PI3K complex including Beclin-1, VPS (Vacuolar Protein Sorting) 15/34 and AMBRA1 (Activating Molecule in Beclin1-Regulated Autophagy). Beclin-1 is positively regulated by AMBRA1, which is phosphorylated and released from the dynein motor complex during autophagy initiation.

The PI3K complex is controlled positively by UVRAG (UV radiation Resistance-Associated Gene) and negatively by Rubicon (8). Signaling and execution of autophagy are mediated by the so-called “Three Musketeers”, *i.e.* phosphorylation, acetylation and ubiquitylation (9) together with the “D’Artagnan” factor Phosphatidylinositol 3-phosphate (10).

The cascade regulation of autophagy can be interrupted at different levels before the non-return point by using chemicals or molecular agents. Many approaches have been used to manipulate (inhibit/stimulate) autophagy, including pharmacological inhibition of mTOR to stimulate autophagy; however, to date the

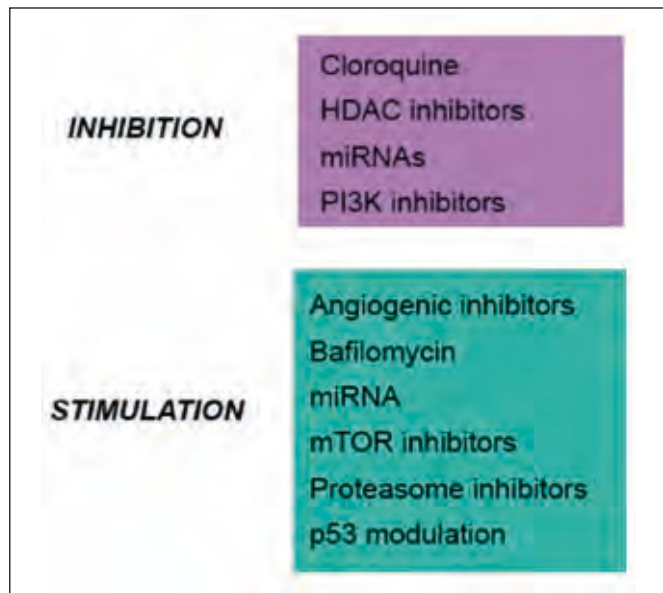
long-term effects of mTOR inhibitors are not fully satisfactory. Conversely, some chemicals can be used to block the unwanted role of autophagy, possibly avoiding off-target effects (11).

New players in the autophagy arena: miRNAs

Searching for the regulators of a so complex process, an active role of miRNAs has been reported. MiRNAs are evolutionary conserved small, non coding endogenous RNAs of about 22 nucleotides in length, encoded by nuclear DNA and transcribed by RNA polymerase II as pri-miRNAs, further converted to pre-miRNAs with short-hairpin structure (<http://microna.sanger.ac.uk>). MiRNAs act as major modulators of posttranscriptional protein-coding gene expression, being involved in many processes. In cancer cells, miRNAs could have opposite roles, given that they function either as tumor suppressors or oncogenes (Figure 4) and regulate not only tumor progression but also treatment sensitivity of patients.

An association between miRNA expression and autophagy in cancer through the regulation of the expression of some autophagy genes, including Beclin-1, ATG2B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG7, LC3-II and SQSTM1 has been reported (12). Thus, miRNA-based strategies able to influence (enhance/inhibit) autophagy could represent an additional strategy to improve the efficiency of cancer treatment (Figure 4) (12). In this respect, more in-depth experiments are needed to discover the mechanisms through which these short RNA could impact the decision between proliferation/death properties of autophagy. Also long non coding RNA (lncRNAs, >200 nucleotides) have been implicated in the signaling pathway leading to autophagy (13).

Fig. 3 - Different approaches to manipulate autophagy (11).



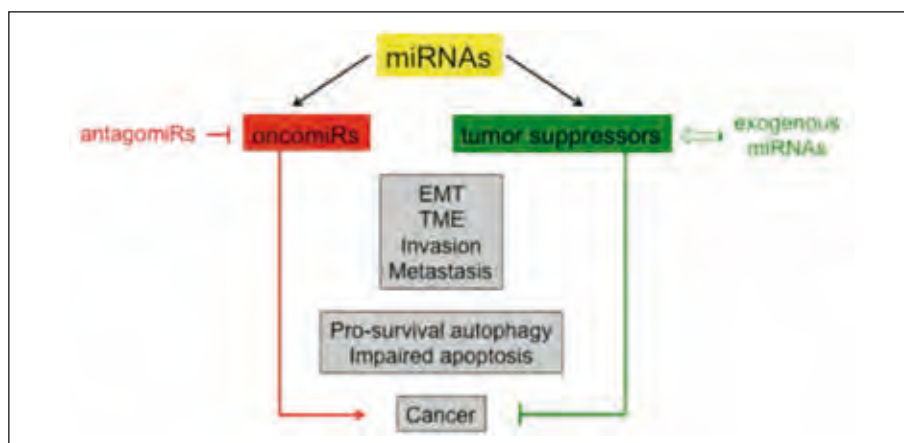


Fig. 4 - MiRNAs could act as oncogenes (oncomiRs) promoting EMT (epithelial to mesenchymal transition), modulating TME (tumor microenvironment), inhibiting apoptosis and providing an advantage to cancer cells turning autophagy to a pro-survival role. On the contrary, they can act as tumor suppressors. The former activity can be counteracted by the so-called antagomiRs, while the latter could be contrasted by miRNA enforced over-expression (12).

Cross talk between autophagy and apoptosis: a complex issue

Apoptosis and autophagy are not governed by hyper-selective functions, having common regulators, so adding a further level of complexity to the elucidation of specific determinants of each pathway (14-16). Thus, apoptosis and autophagy are not independent processes, given that a complex crosstalk between them has been depicted, leading to the notion that they can be triggered by common upstream signals and share molecular switches (17).

For example, the apoptotic executioner caspase-3 cleaves Beclin-1, thus blocking autophagy and producing C-term fragment of Beclin-1 that moves to mitochondria where it acts as a pro-apoptotic protein, thus amplifying the apoptotic cascade. P62, which is in charge for the final targeting of proteins to be discarded through autophagy, regulates the activity of the apoptotic initiator caspase-8 (15). The interconnected signaling between these two basic processes makes difficult the setting of molecular approaches to modulate specifically apoptosis or autophagy, in order to counteract the noxious and dangerous effects of their activation/inhibition. The situation is even more intricate because of the overlapping of the autophagy network with additional, non-canonical programmed cell death paradigms.

Conclusion

Autophagy is a complex process regulated by a number of negative/positive factors and signalling pathways. To address this complexity, updated autophagy guidelines (now 3rd edition, 2016) have defined standardized experimental procedures and approaches to monitor autophagy (18). The *Autophagy Database* (<http://tp-apg.genes.nig.ac.jp/autophagy>) is an invaluable tool for classifying autophagy-related proteins and updating the specific literature. Of note, the

user-friendly *Autophagy Regulatory Network (ARN)*, an interactive interface considering the interconnections of the major signaling pathways regulating autophagy at the post-translational, transcriptional and post-transcriptional levels, provides the access to predicted or validated protein-protein, transcription factor-gene and miRNA-mRNA interactions (ARN; <http://autophagy-regulation.org>).

Bibliografia

1. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007; 21: 2861-2873.
2. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, et al. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med.* 2008; 8: 78-91.
3. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42: 28-41.
4. Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the expanding mechanisms of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2016; 26: 624-635.
5. Reggiori F, Ungermann C. Autophagosome maturation and fusion. *J Mol Biol.* 2017; 429: 486-496.
6. Aredia F, Guamán Ortiz LM, Giansanti V, Scovassi AI. Autophagy and cancer. *Cells.* 2012; 1: 520-534.
7. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 931-937.
8. He, C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43: 67-93.
9. McEwan DG, Dikic I. The three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol.* 2011; 21: 195-201.
10. Giansanti V, Tillhon M, Mazzini G, et al. Killing of tumor cells: A drama in two acts. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 1304-1310.
11. Aredia F, Scovassi AI. Manipulation of autophagy in cancer cells: An innovative strategy to fight drug resistance. *Future Med Chem.* 2013; 5: 1009-1021.
12. Aredia F, Scovassi AI. A new function for miRNAs as regulators of autophagy. *Future Med Chem.* 2017; 9: 25-36.
13. Xu Z, Yan Y, Qian L, Gong Z. Long non-coding RNAs act as regulators of cell autophagy in diseases. *Oncol Rep.* 2017; 37: 1359-1366.
14. Fimia GM, Piacentini M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 1581-1588.
15. Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?" *Apoptosis.* 2011; 16: 321-333.
16. Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol.* 2017 Jan 9. doi: 10.1002/jcp.25785.
17. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 81-94.
18. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12: 1-222.

Autophagy in cancer cells-tumour stroma interaction; a dangerous liaison

Patrizia Agostinis

Cell Death Research & Therapy (CDRT) Laboratory, Department for Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, University of Leuven, Belgium

The increasingly hostile tumour microenvironment, characterized by poor nutrient availability and elevated cellular stress, demands upon the cancer cell an increased capability to adapt and survive. Emerging evidence indicate that autophagy, a major lysosomal degradation pathway, underlies cancer cell's ability to face the stressful tumour microenvironment and survive under conditions of poor nutrients availability. Autophagy is employed by cancer cells as a highly plastic and dynamic mechanism to either repress initial steps in carcinogenesis or support the survival and growth of established tumours. However, autophagy regulation in stromal cells is an emerging feature of the tumour microenvironment and emerging evidence suggest that autophagy regulates the intersection between cancer cell and stromal cells in the tumours. After a brief introduction of the main molecular players of the autophagy pathway, in this essay, I will discuss how autophagy or the endo-/lysosomal system in cancer cells or stromal cells, like endothelial cells, can either offset or facilitate cancer cell-intrinsic and -extrinsic barriers to cancer progression and therapy responses.

Autophagy: ensuring quality of life by self-eating

Macroautophagy (hereafter denoted simply as autophagy) is a process through which cytoplasmic components, including macromolecules such as proteins and lipids as well as whole organelles, are sequestered into double-membrane vesicles called autophagosomes. Autophagosomes subsequently fuse with the lysosomes (forming the autolysosome), where the intracellular material is degraded and recycled in metabolic pathways. Autophagy is thus unique among other lysosomal pathways of degradation because it is the only mechanism that involves the formation of autophagosomes, for cargo delivery to the lysosomes. Although the origin of the autophagosomal membrane (phagophore or isolation membrane) remains unclear, membranes from the endoplasmic reticulum (ER), the outer membrane of mitochondria, the Golgi apparatus and post-Golgi compartments, as well as

the plasma membrane have been shown to contribute to its formation. In healthy cells this catabolic pathway is constitutively active and serves as a key quality control mechanism to preserve the integrity of organelles and the proteome (1-3). However, autophagy can be rapidly stimulated, typically when nutrients or oxygen become scarce, but also in response to a variety of cellular insults including - but not limited to - oxidative and proteotoxic stress, metabolic and organellar stress. Stress-induced activation of autophagy liberates through “self-degradation” the building blocks to support metabolic pathways and preserve energy homeostasis until nutrient availability is restored, while at the same time, removes damaged macromolecules and organelle, thus favoring repair and viability. Autophagy is therefore inherently cytoprotective and several studies have indeed confirmed that pharmacological or genetic inhibition of autophagy curtails the pro-survival ability of autophagy and induces cell demise. Autophagy is a highly-regulated process that involve the coordinated action of a conserved set of genes (more than 30); autophagy-related genes (*Atg*), which control various stages of the process in a hierarchical manner, that is, the initiation of autophagosome formation, its elongation, trafficking, and fusion with the lysosomes [for a complete view of molecular autophagy readers are referred to (1-3)]. Although autophagy was initially thought to be a bulk degradation process, we now know that, depending on the type of initiation stimulus/insult, this catabolic process can be highly specific. Clearance of mitochondria, through mitophagy, and clearance of protein aggregates that cannot be removed by the proteasome, through aggrephagy, are examples of selective autophagy with increasing implications in cancer metabolism and/or neurodegenerative diseases. Also, accumulating evidence implicate various *Atg* genes in broader vesicular trafficking and secretion processes, such as endocytosis, exocytosis and exosomes/nanovesicles extracellular delivery. Autophagy has key roles in development and differentiation, and, not surprisingly, autophagy defects underlie various disorders including neurodegeneration, metabolic disease, infectious diseases, and cancer (1-4).

Autophagy as tumour suppressor mechanism

Several studies have linked defective autophagy to tumorigenesis (4-6). The first evidence supporting a tumour-suppressive role for autophagy during spontaneous carcinogenesis came from the finding that allelic loss of *Beclin 1* in mice (*Beclin 1*^{-/-} animals are not viable) is associated with the development of hepatocellular carcinoma and other types of cancer (4-6). More recently, mice harboring tissue specific deficiency in other key autophagy genes, such as *AMBRA1* (an interactor of Beclin 1) (7), *Atg5* or *Atg7* (4-6) showed the emergence of oncogene-driven pre-malignant lesions and accelerated spontaneous tumours (4-6) supporting the tumour-suppressing role of autophagy during the initial phases of the carcinogenesis process. In humans, haploinsufficiency of *Beclin 1* has been found in breast, ovarian, and prostate tumours (4-6). However, *Beclin1* is adjacent to the known tumour suppressor gene breast cancer 1 (*BRCA1*) on chromosome 17 and is often co-deleted with *BRCA1*, suggesting that loss of *BRCA1* rather than loss

of *Beclin1* may represent the driver mutation in hereditary and sporadic breast cancers. Also, large-scale analysis indicates that several genes belonging to the core autophagy machinery are not targeted by high-frequency somatic single-nucleotide mutations across cancers (6). Thus, a more systematic mutational analysis in human cancers, is needed to unravel and validate the correlation between autophagy defects and tumour susceptibility in humans.

Mechanistically, the tumour suppressor role of autophagy has been ascribed to the vital cell-autonomous functions of autophagy in mitigating damage and maintaining cellular integrity under conditions of metabolic stress. Different mechanisms that have been proposed to account for the tumour suppressing role of autophagy include - but are not limited to:

- maintenance of genetic/genomic stability;
- preservation of bioenergetics;
- reduction and control of (mutagenic/damaging) reactive oxygen species;
- degradation of oncogenic proteins;
- activation of tumour suppressing mechanisms like oncogene-induced senescence and autophagic cell death;
- reduction of chronic inflammation;
- regulation of immunosurveillance mechanisms (4-6).

An interesting example in this context is provided by the ability of autophagy to keep the expression of the cargo receptor and autophagy substrate p62/SQSTM1 in check. In autophagy-compromised cells and mice, the persistence of p62 levels causes cellular damage and its accumulation to aggregate-prone unfolded proteins leads to loss of ER homeostasis and oxidative stress (8). Deregulation of p62 levels due to its lack of degradation, increases the Nrf2-mediated pro-inflammatory NF- κ B signaling, which generate a chronic pro-inflammatory and pro-angiogenic microenvironment thereby assisting tumour initiation and progression (8, 9). Deletion of p62 in mice abolishes RAS-induced lung carcinoma (10), while p62 is upregulated in several human tumours and high expression of p62 in hepatocellular carcinoma is a predictor of poor prognosis (11). On the other hand, reduced expression of p62 in the stroma of several tumours and in particular in cancer associated fibroblasts (CAFs), promotes tumour growth by increasing stromal IL-6 production, indicating an anti-inflammatory function of p62 in stromal cells (12). This example provides evidence for the differential role of autophagy mediators in cancer cell or stromal cells in regulating the tumour microenvironment.

Autophagy as a tumour promoter mechanism

In established tumours elevated levels of autophagy are often found associated to poorly oxygenated regions where the demand for nutrients and the need to withstand several forms of metabolic stress in order to survive, are increased (4-6). Several advanced tumours display an 'autophagy addiction', which appears to

be required to maintain their energy balance, through the recycling of intracellular components into biosynthetic pathways or ATP synthesis and to regulate secretion of pro-tumourigenic factors. In line with this notion, in the context of advanced and aggressive tumours such as pancreatic cancer, autophagy is hijacked by oncogenes to support energy metabolism and allow growth under conditions of energy deficit and metabolic stress (13-15). Moreover, using a mouse model of non-small cell lung cancer (NSCLC) it was shown that tumours harboring concurrent deletion of *Atg7* with activating KRAS mutations accumulate dysfunctional mitochondria, display premature activation of p53 and proliferative arrest. Loss of autophagy in this context reduces malignancy, by inducing a shift from adenoma/carcinoma towards benign oncocytomas, thus pointing to a pro-tumourigenic role of autophagy in this RAS-driven tumour model (16). Another emerging aspect linking autophagy to tumour progression, is the ability of advanced cancer cells to use autophagy as a trafficking and export mechanism of pro-tumourigenic factors, such as pro-inflammatory/pro-angiogenic cytokines or chemotactic/pro-invasive molecules, such as extracellular ATP (4-6).

The recognition of the prevalently cytoprotective and stress adaptation roles of autophagy in advanced cancers has led to the conviction that blocking cancer cell-intrinsic autophagy may curtail cancer cell resistance to chemotherapy, thereby improving therapy outcome. On the basis of this assumption, which has been supported by an avalanche of *in vitro* and preclinical data (4-6) the first-generation autophagy blockers, e.g. chloroquine (CQ) and its derivative hydroxychloroquine (HCQ), are currently being tested in different clinical trials to potentiate patients' response to a variety of anticancer regimens (<https://clinicaltrials.gov/>) (17). Chloroquine (CQ)/HCQ act by blocking fusion of autophagosomes with the lysosomes and cargo degradation through alkalization of the lysosomes. In preclinical studies, the effects of genetic (e.g. ATG-silencing/knockout) or pharmacological inhibition of autophagy (CQ/HCQ) has been analyzed mainly on primary tumour growth (5, 17, 18), whereas very few studies reported the effect of these strategies on metastatic dissemination. This is rather surprising considering that metastatic cancer is the primary cause of cancer-related deaths. To fill this gap in the knowledge, recently, using transplantable melanoma models, which are notoriously known to display an autophagy-addiction for growth and survival (5, 18) we found that while *in vitro* the effects of CQ were indistinguishable from the silencing of ATG5 in melanoma cells, *in vivo* doses of CQ that did not affect primary tumour burden, were still capable to reduce cancer cells' invasiveness and metastatic potential. Further analysis revealed that CQ reduced tumour hypoxia, by improving the structural and functional features of the tumour blood vessels, through the process known as 'vessel normalization' (19). In line with this, CQ reduced vessel density and tortuosity, improved endothelial cell (EC) alignment and tight junction formation, while reducing tumour vessel leakiness and increasing tumour vessel perfusion. Importantly, tumour vessel normalization in response to CQ also enhanced the delivery and efficacy of chemotherapeutic agents

(18). Suppression of ATG5 expression in melanoma cells (by shRNA) reduced primary tumour growth and metastasis, by compromising the ability of the intravasated cancer cell to survive in the bloodstream, but did not normalize the tumour vasculature nor did it prevent cancer cell intravasation. In stark contrast with the tumour vessels-ameliorating effects of CQ, growing melanomas in mice with an EC-specific *Atg5* deletion, induced a tumour stroma hallmarked by increased angiogenesis and vessel abnormalities (18). Thus, tumour vessel normalization by CQ is a process elicited independently of autophagy in the cancer cells or in ECs.

This important finding then raised an obvious question; how does CQ affect EC properties in an autophagy-independent fashion? Apart from the inhibition of autophagosomes degradation, CQ-treatment induced a dramatic enlargement of the late endosomal/lysosomal compartment in the ECs. This caused altered endosomal trafficking of NOTCH1 and increased its signalling, by eliciting the sustained and autophagy-independent generation of its transcriptionally active fragment NICD, leading to a more quiescent EC phenotype. Both the tumour vasculature normalizing- and anti-metastatic effects of CQ were completely blunted when melanoma cells were implanted in mice lacking *Notch1* in ECs. This genetic model validated both the essential role of NOTCH1 for the tumour vessel normalization effect of the CQ treatment and the importance of this process to prevent metastatic dissemination of the melanoma cells. Notably, EC specific deletion of *Atg5* slowed down tumour growth, but did not normalized the tumour vasculature, suggesting a different mechanism of autophagy-mediated regulation in tumour associated ECs that supports tumourigenesis. Instead, by normalizing the abnormal tumour vasculature CQ led to the generation of a more solid barrier that impede cancer cells' in their way to the blood circulation, the main transport system to disseminate in other tissues and metastasize (Figure 1). Tumour vessel normalization, is becoming the preferred therapeutic approach rather than the initial approach of tumour vessel inhibiting, which aims to starve tumours into regression (Figure 2). However apart from several genetic strategies, the only vessel normalizing drug currently available is anti-VEGFA monoclonal antibody based therapy, which has a very limited normalization window and notorious resistance (19, 20).

Can we harness autophagy in anticancer therapy?

As discussed above autophagy has a dynamic and plastic role in cancer initiation and progression and recent evidence delineates a contextual role of autophagy in response to anti-cancer treatments as well; with responses varying from unaffected or increased, to reduced cancer cell killing upon the blockage of autophagy. This implies that harnessing autophagy for therapeutic purposes in cancer treatment will require careful consideration on whether, when, and how autophagy is induced as a cytoprotective mechanism, or is recruited by therapy-induced signaling pathways to promote cancer cell killing. Chloroquine or HCQ are the only autophagy inhibitors whose effectiveness *in vivo* and safety in clinical

trials has been approved by the FDA. Currently, more than 30 clinical trials involving CQ or HCQ for the treatment of refractory malignancies are ongoing with promising results (17, 21). These encouraging preclinical activities support the use of CQ/HCQ as first-generation autophagy blocker in combination with anti-cancer treatments and is therefore necessary to further our knowledge on the mechanism of action of CQ(HCQ) in patient materials, an essential step to optimize its effective dose and therapeutic schedule; parameters that are still highly variable in the different ongoing clinical trials.

The improved perfusion of the tumour achieved by CQ treatment reduces tumour hypoxia, a quintessential property of the aggressive and immunosuppressive tumour microenvironment. Since tumour immunosuppression needs to be reverted for the benefit of all anticancer therapies and tumour vessel normalization has been shown to potentiate the efficacy of immunotherapies (20), while CQ has been shown to synergize with immunotherapies (22, 23), the vessel normalizing effects of CQ are therefore extremely promising.

Systemic inhibition of autophagy/lysosomal degradation by CQ may also affect other tumour stromal cells or residual, drug-resistant cancer cells. For example, besides the described normalization effect on the tumour vasculature, systemic delivery of CQ could inhibit autophagy or lysosomal mediated trafficking in cancer associated fibroblasts (CAFs), which have been shown to support the tumour-promoting microenvironment by providing metabolic fuel to cancer cells (24, 25). Therefore, the potential of CQ to act as cancer cells/stromal cells autophagy-inhibitor and vessel normalizing-agent therefore advocates for a redesign of the therapeutic schedule and dose of CQ-based therapies, along with assessment of potential adverse side-effects, in order to fully exploit the therapeutic potential of this old antimalarial agent in cancer therapy.

Another concern, when thinking about harnessing autophagy in anticancer therapy, is the choice of the co-treatments, since e.g. CQ/HCQ is often combined in clinical settings with radiotherapy or other genotoxic chemotherapies, which are known to increase the immunogenicity of the dying cancer cells (26-28). In line with this, cancer cell-associated autophagy can also influence the interface between dying cancer cells in response to chemo/radiotherapy and the immune system. The main mechanism by which autophagy has been reported to affect this intersection, is by modulating the trafficking and emission of immunostimulatory signals or damage associated molecular patterns (DAMPs) in/from the dying cancer cells (26, 28). DAMPs are essential effectors of a cell death subroutine triggered by an assorted class of anticancer treatments, which elicits effective antitumour immunity, called immunogenic cell death (ICD) (26, 28). The known ICD-associated DAMPs include secreted ATP - a find me signal/inciting the activation of inflammasome-based IL-1 β secretion from dendritic cells (DCs) - surface exposed calreticulin, serving as a potent 'eat me' signal- and the passive release of HMGB1, which by binding to TLR4 on antigen presenting cells (i.e. DCs) assists in proper antigen processing. For example, cancer cells dying

following treatment with epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted diphtheria toxin (DT-EGF) secrete HMGB1 in an autophagy-dependent manner, suggesting a role for autophagosomes as ‘carriers’ of HMGB1 (29). During chemotherapy-induced ICD, as might be caused by mitoxantrone or oxaliplatin, apoptotic ATP secretion (but not ecto-CRT and HMGB1 release) has been shown to be mediated through autophagy and found to be crucial for instigating potent antitumour immunity (27). However, in the context of ICD induced by primarily ER stress autophagy, by mitigating oxidative stress, suppressed pre-apoptotic CRT exposure on cancer cells and reduced phenotypic maturation of interacting DCs, DC-based IL-6 production, and DC-based CD4+/CD8+ T cell stimulation, without affecting pre-apoptotic ATP secretion (30). In this context therefore, cancer cell-associated autophagy assists in evasion from ICD. Thus, depending on the ICD inducer under consideration, the type of cellular stress it elicits, and the autophagic cargo that is selected, cancer cell-associated autophagy might increase the immunogenicity of the dying cancer cell or might help it to evade detection by immune cells, a factor that needs to be considered when combining autophagy inhibitors/targeting strategies with selected ICD-inducing therapies. Finally, autophagy may mobilize and deliver extracellularly ATP not only from dying cells, but also from aggressive, drug-resistant cancer cells. In cancer cells with an acquired or spontaneous resistance to the BRAF-inhibitor Vemurafenib,

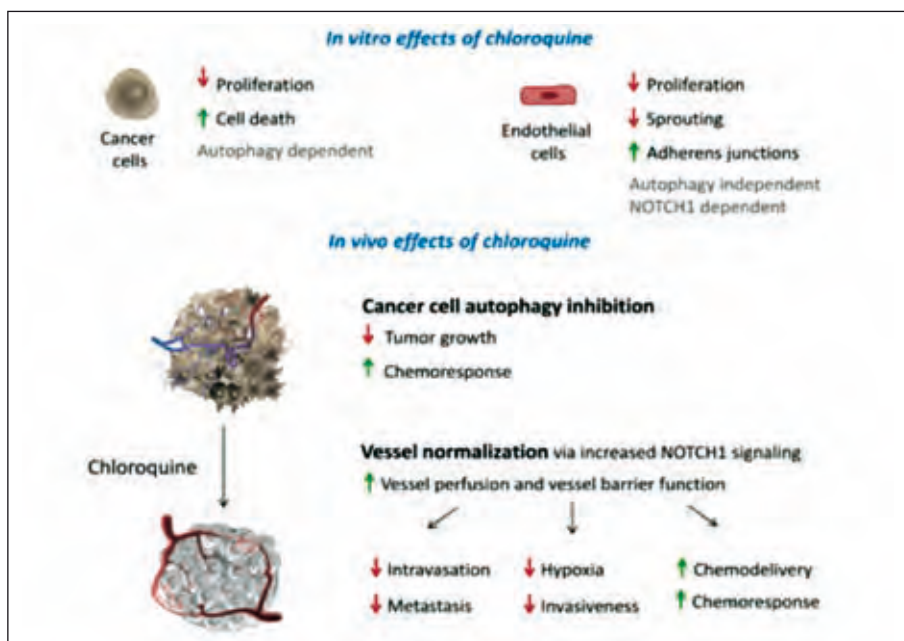


Fig. 1 - Schematic representation of the main findings described in reference (18) (see text for further explanation).

blocking autophagy-mediated ATP release curtailed melanoma cell's migration and invasion, two critical steps of metastatic dissemination [Martin S, Agostinis P, unpublished results]. Also, when thinking about the development of more specific approaches targeting autophagy regulators in cancer cells, we need to consider the emerging autophagy-unrelated functions of several autophagy genes, which, by being recruited to endocytic and other vesicular pathways, may affect different processes involved cancer cell-stromal cell interactions. These considerations pinpoint the challenges that still remain to be faced when considering blockade of autophagy for therapeutic purposes.

Bibliografia

1. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147: 728-741.
2. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008; 132: 27-42.
3. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2012; 11: 709-730.
4. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015; 34: 856-880.
5. Maes H, Rubio N, Garg DA and Agostinis P. Autophagy: shaping the tumour microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 428-446.
6. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*. 2015; 125: 42-46.
7. Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, et al. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol*. 2015; 17: 20-30.

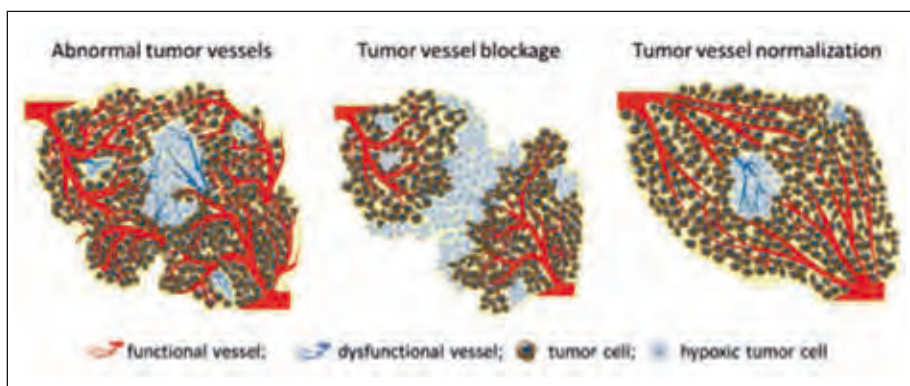


Fig. 2 - Therapeutic targeting of tumour vessels. The two therapeutic strategies targeting the abnormal tumour vasculature; 1) tumour vessel blockage resulting in increased cancer cell death by ischemia and 2) tumour vessel normalization, that aims to re-establish a 'normalized' tumour vessel network hereby reducing hypoxic areas in the tumour.

8. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumourigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137: 1062-1075.
9. Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumourigenesis. *Cancer Cell*. 2008; 13: 343-354.
10. Saito T, Ichimura S, Taguchi K, et al. p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming, *Nature Comm*. 2017; Doi: 10.1038/ncomms12030.
11. Umemura A, He F, Taniguchi K, et al. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells. *Cancer Cell*. 2016; 29: 935-948.
12. Valencia T, Kim JY, Abu-Baker S, et al. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumourigenesis. *Cancer Cell*. 2014; 26: 121-135.
13. Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumour growth. *Genes Dev*. 2011; 25: 717-729.
14. Guo JY, Chen HY, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumourigenesis. *Genes Dev*. 2011; 25: 460-740.
15. Lock R, Roy S, Kenific CM, et al. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell*. 2011; 22: 165-178.
16. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumours to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev*. 2013; 27: 1447-1461.
17. Amaravadi RK, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 654-666.
18. Maes H, Kuchnio A, Peric A, et al. Tumour vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell*. 2014; 26: 190-206.
19. Carmeliet P, Jain RK, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10: 417-427.
20. Huang Y, Goel S, Duda DG, et al. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2013; 73: 2943-2948.
21. Manic G, Obrist F, Kroemer G, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy, *Molecular & Cellular Oncology*. 2014; Vol. 1, Iss. 1.
22. Jiang X, De Vera ME, Buchser WJ, et al. Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumour regression. *Cancer Res*. 2012; 72: 2791-801.
23. Ratikan JA, Sayre JW, Schae D, Chloroquine engages the immune system to eradicate irradiated breast tumours in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 87: 761-768.
24. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumour cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkB activation in the tumour stromal microenvironment. *Cell Cycle*. 2010; 9: 3515-3533.
25. Wang Y, Gan G, Wang B et al, Cancer-associated Fibroblasts Promote Irradiat-

- ed Cancer Cell Recovery Through Autophagy. 2017. *E BioMedicine*, in press.
26. Krysko DV, Garg DA, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 860-875.
 27. Galluzzi L, Pedro JM, Demaria S, et al. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov 15.
 28. Garg A, Vandenberk L, Koks C, et al. Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma. *Science Translational Medicine*. 2016; 8, art. nr. 328ra27
 29. Thorburn J, Horita H, Redzic J, et al. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumour cells that are destined to die. *Cell Death Differ* 2009; 16: 175-183.
 30. Garg A, Dudek A, Ferreira G, et al. ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy*. 2013; 9: 1292-1307.

Autofagia e infezione

Raffaele Bruno, Valentina Zuccaro

U.O. Malattie Infettive, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo- Pavia,
Università degli Studi di Pavia

The term autophagy (from the Greek words auto meaning ‘self’ and phagein meaning ‘to eat’) refers to a several network of processes - including macroautophagy, microautophagy, chaperone-mediated autophagy and non-canonical autophagy - which leading cells to digest their cytoplasmic contents in lysosomes. Autophagy intercepts pathogen invasion.

The antimicrobial functions of autophagy provide a series of barriers against invading microorganisms. The first antimicrobial function is represented by xenophagy, which consists of the uptake of intracellular microorganisms into double-membrane autophagosomes. While the bacterium is confined in the nascent and presumably intact phagosome, through LC3 associated phagocytosis (LAP) autophagic machinery is activated. Finally, a group of autophagic adaptors, known as sequestosome 1 like receptors (SLRs), are involved in eliminating microorganisms from the cytoplasm. SLRs recognize molecular tags (such as ubiquitin, galectin and membrane phospholipid modifications) present on invading microorganisms or on damaged host membranes that are associated with the pathogen and that physically recruit the autophagic machinery. The importance of autophagy in protecting the cytoplasm from microbial invasion is highlighted by the microbial counter measures and adaptations that have evolved to inhibit, to block specific stages or to commandeer autophagy.

Autophagy pathway are several in mammalian cells: the presence, location and extent of the cytoplasmic invasion by a pathogen can launch the process. First, TLRs and NOD-like receptors (NLRs) detect released microbial products (that is, PAMPs) very early following infection and this stimulates autophagy. Second, autophagy can be initiated during adhesion - and pathogen - induced uptake of bacteria by the host cell, or during active phagocytosis of bacteria by macrophages. Third, at stages after bacterial uptake, autophagy is induced following pathogen-inflicted damage to the newly formed parasitophorous vacuoles and on the escape of bacteria into the cytoplasm. Similarly, the initiation of autophagy following virus infection occurs at various stages of the virus life cycle.

The ability to eliminate bacteria by the autophagic pathway was initially demonstrated in *Streptococcus*. *Pyogenes*, also known as Group A *Streptococcus* (GAS). *Streptolysin O* (SLO), a member of the family of cytolysins, which

are pore forming and dependent on cholesterol, is a major virulence mechanism of GAS. SLO allows the bacteria to escape from the endosome and into the cytosol. In 2004, Nakagawa and colleagues showed that in a GAS-infected HeLa cell line, 80% of the bacteria were captured by autophagosomes and were eliminated after the fusion of the autophagosomes with lysosomes. In contrast, in GAS-infected ATG5^{-/-} cells (deficient in autophagy), the bacteria survived and multiplied within the cells. However, it was also demonstrated that SLO was necessary for the autophagic process: assay showed that SLO-mutant bacteria were not sequestered in autophagic structures and survived longer than the wildtype strain did. It was also shown that GAS-infected HeLa cells deficient in SLO remained in endosomes and did not escape to the cytosol, suggesting that bacterial exposure to the cytosol can function as the activation signal for autophagy. Additionally, the researchers demonstrated another pathway by which autophagy is induced: CD46 receptor induces autophagy and, then, GAS removal by activated BECN1 and PtdIns3K.

Autophagy-related genes (ATGs) proteins, members of Rab GTPase family, seems to play an important role in autophagy: they are located in autophagosomes containing GAS and are involved in autophagosome formation. For example, Rab7 mediates late endosome formation, and Rab23 regulates intracellular vesicle transport. Rab9A is required for the fusion of lysosomes with autophagosomes, and this GTPase is involved in the transport of proteins from late endosomes to the trans-Golgi. Rab9A and Rab23 are not involved in autophagy induced by starvation (classical or canonical autophagy), suggesting that they have a unique role in xenophagy.

Studies in human oropharyngeal keratinocytes infected with GAS showed that GAS uses both SLO (required for association with ubiquitin) and streptolysinS (SLS, which is required for association with galectin) to damage the vacuolar membrane; consequently, adapters bind ubiquitin or galectin, and autophagy is induced. However, this study showed that SLO promotes bacterial survival in human oropharyngeal keratinocytes and, together with NAD glycohydrolase (a toxin that is encoded in the same operon), inhibits the fusion of GAS containing autophagosomes with lysosomes. Therefore, in human oropharyngeal keratinocytes, GAS infection does not induce a xenophagic response, and bacterial toxins inhibit the formation of mature autolysosomes and allow bacterial survival. In the keratinocyte, the cell-bacterium interaction is more complex than that observed in HeLa cells, in which autophagy kills most GAS bacteria during early infection.

GAS is a model of intracellular bacteria whose strategy to manipulate the host autophagy pathway is currently under investigation. Recently, Barnett and colleagues provide evidence about the ability of GAS to produce a protease that degrades host proteins that target bacteria to autophagy in order to evade autophagy and replicate efficiently in the cytosol of infected epithelial cells. In the xenophagy, the pathogens elimination is mediated by lysosomal pathway. Some bacterial pathogens, inhibit the autolysosome formation, take advantage of autophagy and use the autophagy machinery to establish a replicative niche in autophagosomes.

Pathogens have developed several mechanisms to avoid autophagy; *M. tuberculosis* is eliminated efficiently when autophagy is induced; other intracellular pathogens have the ability to escape from endosome to cytosol.

In this context, the autophagy can be induced by different signal:

- the bacterial cytosolic location;
- the phagosomal membrane damage;
- the bacterial protein secretion.

In the cytosol, the pathogens as *S. typhimurium* can be a target of autophagy through ubiquitin-dependent mechanism mediated by p62, NDP52 and OPTN or ubiquitin independent process through ATG5-TECPR1 as described to *S. flexneri*. The induction of autophagy results in the clearance of some pathogens, but in other cases, the pathogens evade the autophagy through virulence factors production, which prevent the ubiquitination or degrade key proteins of autophagy. Thus, autophagy plays an important role in the immune response of the infected cells.

Like a coin, autophagy could be showing two faces:

- 1) an efficient;
- 2) a modulated pathway by pathogens to survive and replicate.

Based on these findings, it is evident that autophagy can be an effective immune response for the elimination of intracellular bacteria. Recent studies suggest that induction of autophagy could function as a treatment for certain infectious diseases and could be an effective strategy *in vitro* and *in vivo*.

However, only few pathogenic bacteria have been studied in detail, and it is currently unclear whether this can be widely applied to a variety of different bacteria. It is known that a variety of different stimuli can activate xenophagy, such as treatment with IFN- γ and stimulation of TLRs. Considering the variety of mechanisms that allow certain pathogens to prevent autophagy, it is necessary to better understand these mechanisms to determine an effective strategy for manipulating autophagy to counteract bacterial invasion in different diseases. In summary, there are currently more questions than answers in the field of autophagy, so more research is needed to clarify the role of autophagy in eliminating pathogens.

Autophagy and Viruses

In the past several years, considerable advances have been made in understanding the complex interplay between autophagy and viruses. Autophagy is an ancient conserved cell-autonomous defense mechanism and the autophagy-related genes (ATGs) orchestrate diverse aspects of host antiviral responses. During co-evolution with their hosts, many viruses have developed a variety of strategies to subvert and/or manipulate the autophagy pathway. Some viruses may also exploit components of the autophagy machinery in a 'modular' manner to promote their replication. Moreover, even for the same virus, the interaction between autophagy and viral replication may vary widely depending on the specific cellular target. While considerable advances have been made in understanding the interplay be-

tween autophagy and viruses, many important questions remain to be answered. It is still largely unclear how autophagy is activated during viral infection, how autophagy functions to restrict the replication of some viruses, how autophagy functions to promote the replication of some viruses, and how autophagy proteins are utilized by the host and by the virus in non-canonical autophagy-independent fashions to negatively or positively regulate viral replication. Unraveling the answers to these questions will enhance our understanding of virology, autophagy, and novel autophagy-independent functions of autophagy proteins, as well as potentially identify additional targets that can be used to therapeutically modulate autophagy in the treatment of viral diseases.

Bibliografia essenziale

1. Campoy E., Colombo M.I. Autophagy in intracellular bacterial infection *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793 (2009) 1465-1477.
2. Nayeli Shantal Castrejón-Jiménez¹, Kahiry Leyva-Paredes. The role of autophagy in bacterial infections *BioScience Trends*. 2015; 9: 149-159.
3. William T. Jackson. Viruses and the autophagy pathway *Virology*. 2015; 479-480, 450-456.
4. Jacqueline M. Kimmey and Christina L. Stallings Bacterial Pathogens versus Autophagy: Implications for Therapeutic Interventions *Trends in Molecular Medicine*. 2016; Vol. 22, No. 12.

Autophagy and systemic autoimmune diseases

Guido Valesini, Marta Vomero, Cristiana Barbatì, Tania Colasanti, Cristiano Alessandri
Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, La Sapienza Università di Roma

Autophagy (or macroautophagy) is an evolutionarily conserved lysosomal degradation pathway in eukaryotic organisms. During autophagy, portions of the cytoplasm and intracellular organelles are sequestered within characteristic double-membrane vesicles known as autophagic vacuoles or autophagosomes and are finally delivered to lysosomes for bulk degradation (1). Autophagy is involved in many physiological processes including immune system development and maturation.

Autophagy has emerged indeed as a key mechanism in orchestrating innate and adaptive immune responses to intracellular pathogens and it contributes to MHC class II-mediated presentation of intracellular antigens to CD4⁺ T lymphocytes (2). Recently, aberrant regulation of autophagy has been linked to several autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Rheumatoid Arthritis (RA) (3).

Autophagy in innate and adaptive immunity

Autophagy contributes to innate immunity by protecting the cytosol from colonization by intracellular microbial pathogens and is constitutively activated in antigen-presenting cells (APCs), such as DCs, macrophages, and B cells taking part in antigen presentation (4). Extracellular antigens captured by APCs are delivered to autophagosomes, which utilize hydrolases from endosomes (such as cathepsins) to generate immunogenic peptides and load them onto MHC class II molecules for presentation to CD4⁺ T cells (5). Autophagy-dependent antigen presentation has a crucial role also in the maintenance of immunological tolerance (6). B and T lymphocytes are key players in autoimmune disease pathogenesis and they seem to be particularly dependent on autophagy for their development, survival and proliferation (7).

Role of autophagy in rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disorder that affect particularly the joints but it can displayed extra-articular manifestations including cardiovascular disease (CVD). Genetics and environmental factors lead to the onset of the disease that takes place far from the synovium (8). In this pre-artic-

ular phase, the signs of loss of self-tolerance are already displayed by the presence of anti-citrullinated protein antibody (CCP) and rheumatoid factor (RF). Next, without clear clinical articular manifestations, several poorly understood events drive to the articular phase that is characterized by the progressive joint destruction as the result of the combined effects of innate and adaptive immune cells responses (9). In fact, a complex cell to cell interaction (T and B cells, macrophages, synovial fibroblasts, chondrocytes and osteoclasts) and activation of several inflammatory signalling pathways sustain the chronic stage of the disease. TNF- α , by orchestrating many aspects of the disease including production of pro-inflammatory molecules, release of metalloprotease and recruitment of immune cells to inflammatory site, have a pivotal role in RA pathogenesis (10). Therefore, TNF- α -targeted therapies represent a good weapon of defense in patients non responding to conventional disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs).

Osteoclastogenesis

Zhao and colleagues (11) found an increase in autophagic flux during hypoxia-induced osteoclastogenesis in mouse monocyte macrophages cell line and more recently it has been demonstrated that the knockdown of p62, a substrate of autophagy, inhibited osteoclastogenesis (12). As far as RA is concerned, a significant recent work has shown not only an increased levels of autophagy protein Atg7 and Beclin1 in osteoclasts of RA patients compared with osteoarthritis (OA) samples, but also a direct relation between autophagy activation and differentiation of monocytes into mature osteoclasts *in vitro*, suggesting a key role of autophagy in the degradation of bone tissue (13). Also *in vivo* experiments confirmed that the inhibition of autophagy significantly reduces bone erosion in arthritis mouse model (14).

Autophagy and citrullination

Citrullination is a post-translational modification catalyzed by peptidylarginine deiminases (PAD) enzymes which convert arginine to citrulline and autoantibodies to citrullinated proteins represent fundamental diagnostic and predictive marker of RA (15). It has been demonstrated that PAD is located in autophagosomes and serum starvation, a classical pro-autophagy stimuli, induce presentation of citrullinated peptides by B-cells (16). This route seems to be autophagy-specific since the inhibition of the autophagy process, by atg5 knockdown or 3-methyladenine treatment, arrested the presentation of citrullinated antigens by antigen-presenting cells. On the basis of these finding, the authors considered citrullination as a "biochemical marker of autophagy". In a more recent study we deepened the role of autophagy in the generation of citrullinated peptides, demonstrating that, after incubation with rapamycin, fibroblast-like synoviocytes from RA patients showed increased levels of the citrullinated form of proteins including vimentin, a common autoantigen in RA (17). Moreover, in monocytes isolated from early-active RA patients, an interesting direct correlation between LC3-II and anti-CCP levels was found. Taking together these data suggest that citrullination occurs in autophagy-related compartments and autophagy activation causes the generation

of citrullinated peptides and their presentation to lymphocytes, determines the breach of tolerance and the production of anti-CCP.

Targeting autophagy in RA therapy

Autophagy modulation might be an attractive therapeutic choice in RA. One of the most deepened aspects consists on autophagy-mediated presentation of citrullinated antigens; in this regard, more than three decades ago Ziegler and Unanue (18) demonstrated that chloroquine (CQ) inhibited antigen presentation to T cells, suggesting that this molecule is able to transfer fragments to accessible sites at the cell surface, process in which autophagy is actively involved. CQ and hydroxychloroquine (HCQ; plaquenil™), drugs that cause autophagosomes accumulation by increasing lysosomal pH, are currently in use in the clinical practice showing a high effectiveness in RA. In a more recent papers, it has been demonstrated that CQ reduced the differentiation of osteoclast precursors into mature osteoclast both in vitro and in vivo and it inhibited the release of TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages (19, 20). Despite the wide use of TNF antagonists in the clinical practice, the exact mechanism of action of these drugs has not yet been completely understood. They might indirectly inhibit autophagy by blocking proautophagic cytokines such as TNF- α .

mTOR inhibition could be another approach to modulate autophagy in RA, although at present the studies are limited. In a multi-centre study involving 121 RA patients, it has been demonstrated that response to therapy was significantly higher in the group of patients treated with the mTOR inhibitor everolimus plus MTX than with MTX alone (21). This results were corroborated by Cejka and colleague (22) who found a reduction in osteoclast number and bone erosions in TNF-transgenic mice treated with sirolimus or everolimus.

Role of Autophagy in SLE

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial and highly polymorphic systemic autoimmune disorder that affects multiple organs, including skin, muscles, joints, kidneys and heart. The etiology of SLE remains still unknown. However, it is likely that the complex interaction between genetic, environmental (e.g., infectious agents, UV light, drugs), and hormonal factors promotes the immune dysfunction underlying the pathogenesis of the disease. SLE is characterized by autoantibody production, deregulated B cells, target organ infiltration by inflammatory T cells and aberrant immune cell activation due to abnormal antigen-presenting cell function. Among the cells that participate in the initiation, progression, and perpetration of the disease, T lymphocytes play a key role in all stages. This is at least partially due to the production of pathogenic autoantibodies in a T-cell-dependent process. However, as major contributors to the disease, T cells also display multiple abnormalities, such as increased cell activation and abnormal cell death by apoptosis (23).

More recently, autophagy has been reported to play a key role. In fact, genetic studies have linked some mutations of autophagy regulators with SLE disease,

and a deregulation of autophagy has been described either in T cells from lupus-prone mice or from patients with SLE. In addition, the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a metabolic regulator of autophagy, has been documented in SLE T cells, and its blockade with rapamycin improved the clinical conditions of these patients. We added further insights in this scenario, since we discovered that serum IgG from patients with SLE were able to induce autophagy in T lymphocytes from healthy donors, suggesting a role for anti-lymphocyte antibodies as autophagy inducers. We investigated the spontaneous and induced autophagic behavior of T lymphocytes from patients with SLE, compared with that of T lymphocytes from healthy donors, by measuring the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II. No significant differences in spontaneous autophagy were found between T lymphocytes from patients with SLE and from healthy donors, apart from CD4⁺ naive T cells from patients with SLE in which constitutively higher levels of autophagy were detected. At variance, whereas treatment of T lymphocytes from healthy donors with serum IgG from patients with SLE resulted in a 2-fold increase in LC3-II levels, T lymphocytes from SLE patients were resistant to autophagic induction and also displayed an up-regulation of genes negatively regulating autophagy, e.g., α -synuclein (23).

Alpha-synuclein is primarily found in neuronal tissue, and its involvement in some neurodegenerative diseases include the ability of hindering autophagy in neuronal cells (24). Alpha-synuclein exists in monomers and oligomers that, in neurodegenerative disorders such as Parkinson's Disease (PD), dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy, have been demonstrated to form insoluble fibril aggregates. In these disorders, known as synucleinopathies, autophagy seems to have a key pathogenetic role. In particular, it has been suggested that the complex framework of events leading to autophagic process could be defective in these diseases, so that abnormal α -synuclein protein aggregates are formed and accumulate. Since α -synuclein can be also found in other cell types, including peripheral blood lymphocytes, we investigated the implication of α -synuclein in the autophagic process in primary human T lymphocytes. In our study, we provided evidence that:

knocking down of the α -synuclein gene resulted in increased autophagy; autophagy induction by energy deprivation was associated with a significant decrease of α -synuclein levels;

autophagy inhibition by 3-methyladenine or by ATG5 knocking down led to a significant increase of α -synuclein levels;

autophagy impairment, constitutive in T lymphocytes from patients with SLE, was associated with abnormal accumulation of α -synuclein aggregates.

Considering all these results, α -synuclein could be considered as an autophagy-related marker of peripheral blood lymphocytes, potentially suitable for use in the clinical practice (24).

All together, these findings could open new perspectives in the search for pathogenetic determinants of SLE progression and in the development of therapeutic strategies aimed to recover T-cell compartment homeostasis by restoring autophagic susceptibility.

Even though it is well known that the majority of patients with SLE develop autoantibodies to lymphocyte surface antigens able to inhibit T-cell activation and proliferation, few data are available so far as concerns the antigenic target of these antibodies. In another our study (25), we investigated the mechanism underlying autophagy modulation in SLE patients. We identified the small GTPase family inhibitor D4GDI as a possible key antigenic determinant implicated in the pathogenesis of the disease. In this study we characterized D4GDI as a peripheral blood lymphocyte antigen recognized by serum autoantibodies from a large percentage of patients with SLE. We found a significant association between the presence of anti-D4GDI Abs and hematologic manifestations (i.e., leukopenia and thrombocytopenia) occurring in SLE patients. The mechanisms underlying the activity of these autoantibodies appeared associated with:

- increased levels of the GTP-bound form of Rac and Rho small GTPases, i.e. their activation,
- increased activity of Rho GTPases on their subcellular target, i.e. triggering actin filament polymerization.

In order to assess the possible implication of these autoantibodies in the pathogenic mechanisms of SLE, T lymphocytes were analyzed for their susceptibility to autophagy, previously demonstrated as defective in T cells from these patients. We found that only T cells from healthy subjects and from patients that were negative for autoantibodies specific to D4GDI appeared as susceptible to autophagy induction by anti-D4GDI Abs, whereas those obtained from patients that were positive to these antibodies were refractory. We hypothesized that D4GDI specific autoantibodies could be capable of triggering important responses in T cells such as cytoskeleton remodeling and autophagy pathway and that, in SLE patients, the chronic exposure to these specific autoantibodies could lead to the selection of autophagy-resistant T cell clones contributing to the pathogenesis of the disease (25).

Pharmacological regulators of autophagy in SLE

Several drugs that have been demonstrated to act as autophagy modulators are already used or are under preclinical development in SLE. Notably, among these drugs, hydroxychloroquine, the first line-treatment for patients with mild SLE, has been shown to interfere with the acidification of lysosomes and to inhibit the phagosome function. Moreover, this drug binds directly to nucleic acids, thereby inhibiting TLR9 activation, leading to a downregulation of IFN- α production. Rapamycin (sirolimus) is a lipophilic macrolide, isolated from a strain of *Streptomyces hygroscopicus*. It binds the small protein 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12) and, in turn, rapamycin-FKBP12 binds and inhibits mTORC1. Prolonged treatment with rapamycin can also inhibit mTORC2 in a subset of tissues and cell lines. Rapamycin is a U.S. Food and Drug Administration (FDA)-approved immunosuppressive agent in solid organ transplantation. Its immunosuppressive properties have been attributed to the blocking of mTORC1, which is required for transducing T-cell activation. Rapamycin has been demonstrated as an effective therapeutic treatment, both in animal models of lupus and in patients with SLE. In NZB x NZW F1 female mice (a model of SLE), administration of

rapamycin decreased the production of autoantibodies, the glomerular deposits of immunoglobulins, and the development of proteinuria, and prolonged survival²⁶. Similarly, in MRL/lpr lupus mouse model, rapamycin prevented rise in anti-double-stranded DNA antibody and urinary albumin levels, and prolonged survival, suggesting its usefulness as a therapeutic agent in patients with SLE. Building on these reports, Fernandez et al. (27) applied rapamycin off-label to patients with SLE refractory to standard treatments, and they observed that this drug led to a decrease in disease activity and prednisone requirement.

In this regard, the spliceosomal P140 peptide (IPP-201101), a 21-mer fragment of the spliceosomal U1-70K small nuclear ribonucleoprotein protein, has recently been demonstrated to display protective properties in patients with SLE and MRL/lpr mice by decreasing the stability of MHC class II molecules in antigen-presenting B cells in association with a downregulation of autophagic flux. These data reveal a very unique property of P140 peptide that alters the autophagy pathway, leading to a defect of endogenous autoantigen processing in MRL/lpr antigen-presenting B cells and a decrease of T-cell priming and signaling. So this molecule could be an interesting candidate as therapeutic target in SLE.

Bibliografia

1. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004; 6: 463-477.
2. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 767-776.
3. Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2017; 176: 55-62.
4. Schmid D, Pypaert M, Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007; 26: 79-92.
5. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*. 2013; 39: 211-227.
6. Kasai M, Tanida I, Ueno T, et al. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J Immunol*. 2009; 183: 7278-7285.
7. McLeod IX, Jia W, He YW. The contribution of autophagy to lymphocyte survival and homeostasis. *Immunol Rev*. 2012; 249: 195-204.
8. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017; 46: 183-196.
9. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 201; 365: 2205-2219.
10. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 63-68.
11. Zhao Y, Chen G, Zhang W, et al. Autophagy Regulates Hypoxia-Induced Osteoclastogenesis Through the HIF-1a/BNIP3 Signaling Pathway. *J Cell Physiol*. 2012; 227: 639-648.

12. Li RF, Chen G, Ren JG, et al. The Adaptor Protein p62 Is Involved in RANKL-induced Autophagy and Osteoclastogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2014; 62: 879-888.
13. Lin NY, Beyer C, Giessel A, et al. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: 761-768.
14. DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Dev Cell.* 2011; 21: 966-974.
15. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 490-497.
16. Ireland JM, Unanue ER. Processing of proteins in autophagy vesicles of antigen-presenting cells generates citrullinated peptides recognized by the immune system. *Autophagy.* 2012; 8: 429-430.
17. Sorice M, Iannuccelli C, Manganeli V, et al. Autophagy generates citrullinated peptides in human synoviocytes: a possible trigger for anti-citrullinated peptide antibodies. *Rheumatology.* 2016; 55: 1374-1385.
18. Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 175-178.
19. Xiu Y, Xu H, Zhao C, et al. Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation. *J Clin Invest.* 2014; 124: 297-310.
20. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology.* 2006; 45: 703-710.
21. Bruyn GA, Tate G, Caeiro F, et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 1090-1095.
22. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 2294-2302.
23. Alessandri C, Barbati C, Vacirca D, et al. T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J.* 2012; 26: 4722-32.
24. Colasanti T, Vomero M, Alessandri C, et al. Role of alpha-synuclein in autophagy modulation of primary human T lymphocytes. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1265.
25. Barbati C, Alessandri C, Vomero M, et al. Autoantibodies specific to D4GDI modulate Rho GTPase mediated cytoskeleton remodeling and induce autophagy in T lymphocytes *J Autoimmun.* 2015; 58: 78-89.
26. Ramos-Barrón A1, Piñera-Haces C, Gómez-Alamillo C, et al. Prevention of murine lupus disease in (NZBxNZW) F1 mice by sirolimus treatment. *Lupus.* 2007; 16: 775-781.
27. Fernandez D, Bonilla E, Mirza N, Niland B, Perl A. Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 2983-2988.

Autofagia e supporto nutrizionale nel paziente critico

Danilo Radrizzani

Unità Operativa Anestesia e Rianimazione, ASST Ovest Milano, Legnano (MI)

I pazienti settici, traumatizzati e più in generale i pazienti critici ricoverati in terapia intensiva sono affetti da una reazione infiammatoria sistemica (Systemic Inflammatory Response Syndrome- SIRS), determinata da un elevato livello di catecolamine, cortisolo e ridotta sensibilità insulinica. Questi pazienti mostrano un aumento del dispendio energetico e un aumentato catabolismo proteico (1). La perdita proteica può arrivare anche a 2 g/kg di peso corporeo (10 g di massa magra), le richieste energetiche possono aumentare del 10-30% (2). In assenza di un supporto nutrizionale questo assetto metabolico porta rapidamente a significative alterazioni della composizione corporea con riduzione delle proteine del 13-16% (circa 2/3 di origine muscolare), aumento dell'acqua totale corporea fino a 12 l ed aumento del rapporto fra acqua extra-cellulare e acqua totale (3). La dispersione muscolare è un fattore importante della malattia critica come recentemente confermato da Puthuchery (4) ed è in grado di influenzare l'outcome (5).

Il supporto nutrizionale è in grado di invertire parzialmente la dispersione proteica e tutte le linee guida consigliano la somministrazione di una nutrizione enterale precoce in questi pazienti, qualche discordanza esiste nel caso che la nutrizione enterale non sia praticabile, sulla efficacia di una nutrizione parenterale precoce (48-72 h) rispetto ad una tardiva (7 gg).

Dagli albori della nutrizione artificiale è in corso un dibattito sulla quantità di nutrienti necessari per un adeguato supporto metabolico a questi pazienti. Ormai sono tutti concordi nell'individuare un apporto massimo pari al fabbisogno. Tuttavia ancora si dibatte su quando iniziare questo apporto e con quale gradualità procedere.

Numerosi studi osservazionali dimostrano un'associazione fra deficit calorico e outcome negativi. In particolare un grosso studio multicentrico ha dimostrato una correlazione inversa fra apporto calorico e mortalità (6). Allo stesso modo altrettanti studi osservazionali che confrontano un inizio precoce della nutrizione enterale rispetto ad uno tardivo hanno dimostrato un effetto positivo sulla mortalità nei pazienti con inizio precoce.

Per quanto riguarda le meta-analisi di studi un po' datati, va detto che sostanzialmente nessuno degli studi più vecchi era disegnato per confrontare condizioni di

digiuno o di digiuno parziale verso un apporto pieno, comunque in queste meta-analisi si evidenziano outcome surrogati (e.g. incidenza di infezioni) e solo raramente effetti sulla mortalità.

Studi randomizzati più recenti hanno mostrati risultati controversi, acuendo il dibattito.

All'interno di questo dibattito ha fatto irruzione l'autofagia (7). Il rationale per il suo coinvolgimento, deriva principalmente da studi di laboratorio su animali in cui si dimostra che l'inibizione del processo autofagico indotto dalla nutrizione artificiale, porterebbe, in seguito alla soppressione del ruolo di scavenging autofagico, all'accumulo di prodotti tossici per la cellula. Ciò spiegherebbe alcuni studi clinici randomizzati che mostrano un outcome peggiore per i pazienti trattati con nutrizione precoce.

Per chiarire questi aspetti è necessario comprendere quale sia il ruolo dell'autofagia nella malattia critica e quale sia il ruolo della nutrizione rispetto all'autofagia. L'autofagia è un processo che garantisce l'omeostasi e probabilmente la funzione primigenia dell'autofagia consisteva nel garantire l'apporto di energia e substrati in condizioni di digiuno. Da questo punto di vista l'autofagia avrebbe un ruolo chiave nella genesi del "muscle wasting" del paziente critico.

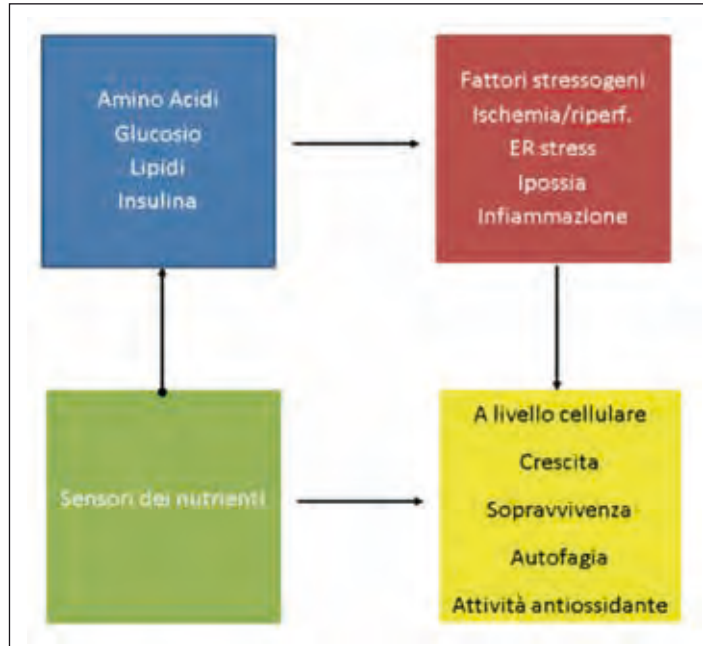
Accanto a questo ruolo primigenio la funzione autofagica è andata sviluppandosi svolgendo una azione modulante sulla risposta infiammatoria. Inoltre l'autofagia può essere indotta attraverso molte altre vie, diverse dalla carenza di nutrienti ed energia, quali ad esempio le condizioni di stress del reticolo endoplasmico, la presenza di pattern molecolari espressivi della presenza di patogeni (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) o di danno cellulare (damage-associated molecular patterns - DAMPs), danno mitocondriale, stress ossidativo e ipossia (8). Questi fattori stimolanti utilizzano diversi tipi di segnali che in qualche modo si sovrappongono con altri sistemi cellulari coinvolti nello stress. La complessità di questa risposta non è ancora ben definita e sono attesi molti contributi in grado forse anche di sconvolgere l'attuale inquadramento (Figura 1).

Tutte le cellule sono in grado di riconoscere e rispondere adeguatamente all'ingresso dei nutrienti, carboidrati, lipidi e amino acidi per garantirne l'utilizzo. Le vie in grado di fare ciò sono critiche per l'omeostasi cellulare, per la gestione del digiuno e di un eccesso di substrati. Queste vie agiscono anche come regolatori della crescita e proliferazione cellulare, della funzione mitocondriale e dell'autofagia.

Le vie più note di sensing dei nutrienti sono l'mTOR (mammalian target of rapamycin), l'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), e le SIR2 (sirtuine). In condizioni di deprivazione energetica AMPK e SIR2 sono attivate dalla elevata disponibilità intracellulare rispettivamente di AMP e NAD⁺. Quando invece è presente un eccesso di nutrienti attiva l'mTOR.

Per quanto riguarda lo specifico aspetto nutrizionale si potrebbe inquadrare l'autofagia come un processo in grado di generare energia e nutrienti a supporto del metabolismo in momenti in cui, per la gravità delle condizioni, i soggetti colpiti dalla malattia critica non sono in grado di alimentarsi. Gli amino acidi derivanti dal catabolismo proteico un eccesso di possono essere utilizzati per generare ATP

Fig. 1 - Interazioni fra nutrienti, stress e meccanismi cellulari.



attraverso il ciclo di Krebs, tuttavia la resa energetica di questo processo è relativamente scarsa. In condizioni di digiuno la mobilizzazione dei lipidi di deposito è molto più redditizia dal punto di vista energetico. Esiste una particolare forma di autofagia, la macrolipofagia in grado di mobilizzare i lipidi fornendo FFA per la beta ossidazione. La macrolipofagia è attiva in molti tipi di cellule e soprattutto nel fegato è un fenomeno sovraregolato in condizioni di digiuno, ma anche in condizioni sovraccarico dietetico da lipidi (9).

Un altro particolare aspetto dell'attivazione dell'autofagia è dato dalla somministrazione di glutammina, probabilmente attraverso l'attivazione delle heat shock proteins. Inquadrando l'autofagia come fattore protettivo ci si aspetterebbe un effetto marcatamente positivo dalla somministrazione di glutammina, al contrario quattro studi relativamente recenti hanno riportato effetti negativi in termini di mortalità.

Quindi l'effetto dell'autofagia sulla malattia critica è complesso ed interconnesso con molti altri meccanismi fisiopatologici, allo stesso modo l'interazione autofagia/nutrizione è altrettanto complessa al punto che eccessi e carenze possono determinare gli stessi effetti.

Perciò, accettare che l'inibizione dell'autofagia sia il meccanismo fisiologico responsabile di un possibile effetto negativo dovuto alla terapia nutrizionale, implica una visione dell'autofagia come un effetto tutto o nulla ed un ruolo totalizzante dell'autofagia, al punto che la gestione dei pazienti critici dovrebbe essere dominata dal controllo di questo processo fisiologico. Come in molti aspetti della clinica il potersi muover accortamente tra più meccanismi fisio-patologici con-

correnti consente di ottenere i migliori risultati bilanciando gli interventi e titolandoli in accordo alle variazioni delle condizioni dei pazienti. La terapia intensiva è ricca di situazioni contraddittorie apparentemente irriducibili, solo per fare alcuni esempi apporto di fluidi per mantenere la volemia e sovraccarico, ventilazione a pressione positiva e barotrauma polmonare, impiego di vasocostrittori e perfusione degli organi.

Possiamo quindi concludere che l'autofagia è un processo fisiologico affascinante, chiaramente operativo nella malattia critica. L'interazione con alimentazione è complessa e non ben definita. L'autofagia può aggravare o migliorare l'infiammazione, il suo ruolo nello stimolare o sopprimere le risposte immunitarie e l'estensione della protezione o promozione della morte cellulare, sono collegati al momento temporale della malattia critica e alla gravità dello stress ossidativo. L'iperglicemia e l'impiego non appropriato della nutrizione parenterale possono essere due dei fattori più importanti e assolutamente evitabili, in grado di sopprimere l'autofagia. Imparare a navigare tra i concorrenti processi fisiologici di autofagia e del sensing mTOR, continuando a somministrare la nutrizione enterale, può fornire le strategie più efficaci e una migliore esito clinico. Allo stato attuale ci sembra difficile sostenere che l'autofagia sia un buon argomento per astenersi dal nutrire i pazienti critici.

Bibliografia essenziale

1. Radrizzani D, Iapichino G, Cambisano M, et al. Peripheral, visceral and body nitrogen balance of catabolic patients, without and with parenteral nutrition. *Intensive Care Med.* 1988; 14: 212-216.
2. Kreyman G, DeLegge MH, Luft G, et al. The ratio of energy expenditure to nitrogen loss in diverse patients groups - A systematic review. *Clinical Nutrition.* 2012; 31: 168-175.
3. Monk DN, Plank LD, Franch-Arcas G, et al. Sequential Changes in the Metabolic Response in Critically Injured Patients During the First 25 Days After Blunt Trauma. *Annals of surgery.* 1996; 223: 395-405.
4. Puthuchery ZA, Rawal J, Acute, McPhail M, et al. Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness. *JAMA.* 2013; 310: 1591-1600.
5. Kress JP, Hall JB. ICU-Acquired Weakness and Recovery from Critical Illness. *N Engl J Med.* 2014; 370: 1626-1635.
6. Alberda C, Gramlich L, Jones N, et al. The relationship between nutritional intake and clinical outcome in critically ill patients: results an international multicenter observational study. *Intensive Care Med.* 2009; 35: 1728-1737.
7. Schetz M, Casaer MP, Van den Berghe G. Does artificial nutrition improve outcome in critical illness? *Critical Care.* 2013; 17: 302-308.
8. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell.* 2010; 40: 280-293.
9. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009; 458: 1131-1135.

Autofagia nelle plasmacellule normali e neoplastiche

Enrico Milan

San Raffaele Scientific Institute, Division of Genetics and Cell Biology, Milano

Autofagia e recettori autofagici

La macroautofagia (convenzionalmente chiamata autofagia) è un processo altamente conservato di auto-degradazione di componenti cellulari. Essa consiste nel sequestro di macromolecole e organelli in vescicole a doppia membrana, chiamate autofagosomi, che fondono con il lisosoma (nelle cellule animali) o il vacuolo (nei lieviti e nelle piante) per la degradazione e il riciclo. Oltre al principale ruolo nel garantire l'omeostasi energetica in condizioni di mancanza di nutrienti, l'autofagia è coinvolta in un gran numero di processi biologici, come il controllo di qualità del proteoma e degli organelli, la regolazione dei processi di differenziamento, risposta allo stress e l'invecchiamento. Inoltre, recentemente sono state scoperte numerose funzioni dell'autofagia in molti aspetti dell'immunità innata e adattativa, tra i quali la distruzione di microrganismi intracellulari, l'infiammazione, il differenziamento dei linfociti e la presentazione degli antigeni. Il concetto di autofagia come degradazione non-selettiva di materiale citoplasmatico indotta dalla deprivazione di aminoacidi, si è rapidamente evoluto quando è stata dimostrata la sua capacità di degradare specifici substrati. Autofagia selettiva è stata infatti descritta per aggregati dannosi (aggrephagy), microrganismi (xenophagy), mitocondri danneggiati (mitophagy), ribosomi (ribophagy), reticolo endoplasmatico (ER-phagy) e perossisomi (pexophagy) (1).

La selettività è garantita dalla presenza di recettori/adattatori del carico che riconoscono il substrato da degradare e ne mediano l'inglobamento nell'autofagosoma. I recettori autofagici devono possedere tre principali caratteristiche:

- 1) un dominio PB1 per l'oligomerizzazione;
- 2) una LC3-interacting region (LIR) per legare l'autofagosoma;
- 3) un dominio UBA per il legame con l'ubiquitina legata al substrato da degradare (2).

È interessante notare che il segnale di degradazione, l'ubiquitinazione, è in comune con il proteasoma; tuttavia, si pensa che le catene di poli-ubiquitina di tipo K48 vengano direzionate al proteasoma mentre le catene di tipo K63 siano preferibilmente degradate dall'autofagia (3).

Il più studiato recettore autofagico è p62/SQSTM1 ed è stato associato a numerosi tipi di autofagia selettiva. Altri recettori includono NBR1, optineurin, NDP52 e TAX1BP1 (2). Oltre a i domini necessari per la sua funzione autofagica p62 possiede: uno ZZ-type zinc finger domain, TRAF6 interacting domain, due segnali di localizzazione nucleari (NLS), un nuclear export signal (NES), e un dominio d'interazione con KEAP1 (KIR) (2). Mediante questi domini p62 modula numerosi pathway di segnale come Nrf2, NF- κ B e mTOR (4). In particolare Nrf2 è uno dei pathway principali contro lo stress ossidativo. P62 regola l'attivazione di Nrf2 distruggendo la sua interazione inibitoria con KEAP1. In condizioni normali Keap1 è legato a Nrf2 e ne causa la sua rapida ubiquitinazione e degradazione attraverso il proteasoma, mentre sotto uno stress che porta all'accumulo di p62, quest'ultimo lega KEAP1 liberando e attivando Nrf2 (5, 6). Così p62 funge da base e adattatore per differenti vie di segnale integrando numerosi stimoli per coordinare l'omeostasi proteica e ossidativa. Inoltre sia il metabolismo del glucosio che dei lipidi dipendono da p62 (5-8), infatti, il topo KO per p62 sviluppa in fase adulta obesità resistente all'insulina.⁷ Nei disordini neurodegenerativi, p62, legata a aggregati di proteine poli-ubiquitinate, è presente nei corpi di inclusione come i corpi di Lewy, gli aggregati di huntingtin e negli ammassi neurofibrillari, rispettivamente nelle malattie di Parkinson, Huntington e Alzheimer (9). Mutazioni di p62, generalmente localizzate nell'UBA domain, sono invece associate ad alterata osteoclastogenesi nella malattia ossea di Paget, una malattia cronica dello scheletro caratterizzata da un non regolato aumento focale del turnover osseo (10).

Autofagia nelle plasmacellule

Le plasmacellule (PC) sono gli effettori terminali dei linfociti B e sono responsabili della produzione e della secrezione delle immunoglobuline (Ig), costituendo la parte umorale della risposta immune. La maggior parte delle PC hanno un'emivita molto breve e muoiono in pochi giorni dopo aver fornito una difesa immediata contro i patogeni (11). Durante le risposte immunitarie dipendenti dai linfociti T, le cellule B follicolari sono attivate nella milza e nei linfonodi e vanno incontro all'"affinity maturation" e alla "class switch recombination" nei centri germinativi. Qui si generano plasmablasti long-lived capaci di popolare una specifica nicchia del midollo osseo dove sopravvivono e garantiscono la memoria sierologica contro i patogeni (12, 13). Dopo l'attivazione da parte dell'antigene, il differenziamento da linfocita B a PC comporta un profondo rimodellamento genetico e cellulare con conseguente elevato stress ossidativo e proteico che deve essere controbilanciato da fondamentali strategie adattative. Infatti, durante il differenziamento i geni tipici dei linfociti B vengono spenti, mentre sono attivati geni responsabili dello speciale fenotipo secretorio delle PC come Blimp-1, IRF4 e XBP1 (14). Codificato dal gene *Prdm1*, Blimp-1 reprime i fattori di trascrizione specifici delle cellule B come Pax5 e Bcl-6 (15). Inoltre Blimp-1 non è solo un repressore dei geni legati all'identità B cellulare, ma anche un attivatore trascrizionale (16). Infatti Blimp-1 promuove la sintesi di immunoglobuline e la loro conversione dalla

forma di membrana a quella secreta (17). Per di più Blimp-1 induce XBP1 un fattore di trascrizione chiave dell'Unfolded Protein Response (UPR) necessario per il differenziamento plasmacellulare (18, 19).

Abbiamo recentemente dimostrato un ruolo cruciale dell'autofagia nell'ontogenesi plasmacellulare (20). Avendo trovato un aumento concertato dell'espressione di geni autofagici durante il differenziamento plasmacellulare *ex vivo*, e una notevole attività autofagica sia in PC short-lived che in long-lived *in vivo*, abbiamo investigato il ruolo dell'autofagia in topi in cui questo processo era assente nei linfociti B (*Atg5^{fl/fl} CD19-Cre* mice). Questi topi *Atg5^{fl/fl} CD19-Cre* hanno ridotte risposte IgM e IgG dopo immunizzazione sia T-dipendenti sia T-indipendenti. Sebbene PC long-lived siano normalmente presenti nel midollo di questi topi, la loro analisi genetica evidenzia che in esse non è avvenuta la ricombinazione del gene floxed *Atg5*, rivelando un'efficiente selezione darwiniana per le cellule ancora capaci di fare autofagia e dimostrando che l'autofagia è assolutamente necessaria per il mantenimento delle PC del midollo (20). Inoltre i topi *Atg5^{fl/fl} CD19-Cre* mostrano un profondo difetto di PC long-lived specifiche per un antigene, evidenziando l'importanza dell'autofagia anche per la memoria sierologica. Una conferma indipendente è arrivata da un lavoro recente che ha identificato e caratterizzato il trascrittoma delle PC midollari umane (21). In questo studio la popolazione di PC CD19⁻ CD38^{hi} CD138⁺, che rappresenta un sottogruppo di PC a lunghissima emivita, mostrava elevata attività autofagica e una distintiva aumentata espressione dei geni autofagici.

Per capire perché le PC hanno bisogno di questo processo cellulare, abbiamo sviluppato un'analisi di proteomica comparativa delle PC di topi wild-type e *Atg5^{-/-}* utilizzando la metodica SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) (20). Il proteoma delle plasmacellule può essere interamente marcato con nuovi aminoacidi in appena 3 giorni, dimostrando lo straordinario e totale rimodellamento del proteoma durante questa metamorfosi cellulare. L'analisi del proteoma ha rivelato che nelle plasmacellule *Atg5^{-/-}* vi è un aumento del reticolo endoplasmatico, che è stato confermato poi con tecniche di microscopia elettronica sia qualitative che quantitative, scoprendo un'autofagia selettiva del reticolo nelle PC. Senza autofagia le PC mostrano anche una maggior espressione di Blimp-1 e XBP1 e un'aumentata produzione e secrezione di Ig (20). Di conseguenza queste PC hanno una carenza di ATP e muoiono prematuramente spiegando perché l'autofagia è necessaria per una normale risposta anticorpale *in vivo*. Di nota, l'autofagia recentemente è stata dimostrata essere essenziale anche per la sopravvivenza delle cellule B memoria (22).

Il nostro studio ha numerose implicazioni. Primo, scopre un nuovo meccanismo dipendente dall'autofagia nella regolazione del differenziamento plasmacellulare. Imprevedibilmente, l'autofagia non è responsabile della degradazione delle immunoglobuline non ripiegate correttamente, suggerendo che un ruolo diretto dell'aumento del reticolo sull'aumentata espressione di XBP1 è da escludere. Secondo, il nostro lavoro svela per la prima volta un inaspettato livello di plasticità tra la biologia delle plasmacellule e la risposta anticorpale, il cui significato funzionale nelle patologie immunitarie dovrà essere delucidato.

Autofagia e cancro

Il ruolo dell'autofagia nel cancro è complesso e molto dibattuto. L'autofagia è un processo omeostatico che ricicla le proteine e gli organelli danneggiati, mantenendo così l'omeostasi cellulare e quindi prevenendo l'accumulo di ROS, l'infiammazione e l'insorgenza di mutazioni oncogeniche (23). In linea con questo ampio ruolo citoprotettivo, difetti genetici dell'autofagia nei topi sono stati associati con maggiore suscettibilità allo stress metabolico, al danno genomico e alla tumorigenesi, suggerendo che l'autofagia è oncosoppressiva nelle cellule sane (24). Delezioni monoalleliche del gene autofagico essenziale beclin-1 sono state trovate nel 40-70% dei tumori al seno, alla prostata e ovarici; tuttavia, la localizzazione genica di beclin-1 vicino al noto oncosoppressore BRCA1 sul cromosoma 17 suggerisce un'ipotesi alternativa al ruolo diretto delle mutazioni di beclin-1 nella tumorigenesi (25). In assenza di autofagia, l'incapacità di pulire gli aggregati contenenti p62 aumenta i livelli di ROS, il danno al DNA e la morte cellulare (26-27). Inoltre l'accumulo di p62 è stato mostrato indurre direttamente il cancro mediante l'alterata attivazione dei pathway di NF- κ B e Nrf2 (28, 29). D'altra parte, la mancanza di autofagia nel fegato murino causa lo sviluppo solo di epatomi benigni suggerendo che l'autofagia potrebbe essere protettiva nei confronti della trasformazione neoplastica, ma anche coinvolta nell'acquisizione delle caratteristiche tipiche dei tumori maligni, promuovendo la crescita tumorale e la metastatizzazione (30).

Questo è in linea con il concetto che le cellule maligne subiscono più stress a causa della crescita deregolata, dell'ipossia, della mancanza di nutrienti e dello stress ossidativo e quindi hanno maggior dipendenza dalle risposte adattative rispetto alle cellule normali.

L'autofagia così potrebbe essere essenziale per le cellule cancerose per resistere allo stress metabolico e ambientale. Infatti, molti tipi di cancro mostrano aumentati livelli di autofagia rispetto alle normali controparti. Inoltre, alcuni tipi di tumori sono estremamente dipendenti dall'autofagia per l'omeostasi mitocondriale a causa di particolari caratteristiche metaboliche, come nel caso della ridotta sintesi di acetyl-CoA in tumori causati dalla mutazione di RAS.

D'interesse terapeutico, l'autofagia è molto spesso accentuata dalla chemioterapia, suggerendo un possibile bersaglio per superare la resistenza ai farmaci primaria e secondaria (23).

L'autofagia nel mieloma multiplo

Il mieloma multiplo (MM), la controparte maligna delle PC long-lived nel midollo osseo, è un tumore frequente e incurabile che causa circa il 2% delle morti per tumore. La particolare biologia del MM lo rende un modello unico per studiare la funzione dell'autofagia nel cancro. L'intensa produzione di Ig è associata con un grande carico per il proteasoma. Di conseguenza il MM è estremamente vulnerabile agli inibitori del proteasoma, sfortunatamente però inevitabilmente insorge la resistenza a questa categoria di farmaci (31). Alcuni studi hanno dimostrato che l'autofagia coopera con il proteasoma in modelli animali e cellulari

di proteotossicità, suggerendo che potrebbe essere un ottimo bersaglio terapeutico per aumentarne l'efficacia e superare la resistenza (32, 33). Con questo razionale e visto il ruolo essenziale dell'autofagia nelle PC (20) abbiamo deciso di investigare il ruolo costitutivo dell'autofagia nel MM (34).

Abbiamo scoperto che il MM ha altissimi livelli basali di autofagia rispetto a altri tumori, come i linfomi, e che l'autofagia è necessaria per la sopravvivenza delle cellule di MM (34). Nel MM l'autofagia ha due principali compiti: il controllo della dimensione dell'apparato secretorio, come osservato nelle PC (20), e una stretta collaborazione con il proteasoma per la degradazione delle proteine ubiquitinate attraverso un meccanismo dipendente da p62. Nonostante questa collaborazione il trattamento combinato di inibitori dell'autofagia e del proteasoma ha avuto risultati discrepanti negli studi preclinici, andando dal sinergismo all'antagonismo (34-36). Inoltre, aggiungendo complessità, eccessiva e deregolata autofagia è stata vista promuovere la morte del MM attraverso un meccanismo dipendente dalla caspasi 10 (37). Questa complessità è probabilmente dovuta alle molteplici e integrate funzioni cellulari controllate dall'autofagia. Quindi, dissezionare i ruoli tessuto e cancro-specifici, i substrati e i recettori autofagici sarà necessario per scoprire e disegnare nuove strategie terapeutiche.

Il nostro studio ha identificato p62 come nuovo e specifico target contro il mieloma (34). Abbiamo documentato che l'ablazione genetica di p62 induce una massiccia e rapida morte delle cellule di MM, ma non dei linfomi (34). Inoltre, p62 fornisce al MM una maggior resistenza agli inibitori del proteasoma attraverso una duplice risposta adattativa (34). Primo, gli inibitori inducono una rapida espressione *de novo* di p62 ma non di altri recettori autofagici. Secondo, gli inibitori del proteasoma modificano totalmente l'interattoma di p62, con una rapida nucleazione di p62 sugli aggregati di proteine poli-ubiquitinate a discapito di molti interattori coinvolti nelle vie di segnale. Sotto gli inibitori del proteasoma, il MM intensifica la degradazione autofagica via p62 per compensare l'insufficienza proteasomale, ma facendo ciò rinuncia ad altre funzioni citoprotettive. Così, capire totalmente il ruolo integrato di p62 nel garantire la sopravvivenza del MM potrebbe essere cruciale per scoprire nuovi bersagli terapeutici. Di nota, abbiamo trovato che i MM in cui p62 è silenziato perdono rapidamente le riserve di ATP intracellulare prima della loro morte, suggerendo un ruolo di p62 nell'omeostasi mitocondriale (34). Una possibile spiegazione è che il mantenimento di mitocondri funzionali è ottenuto attraverso la mitofagia dei mitocondri danneggiati, della quale però i meccanismi sono ancora dibattuti.

Uno dei possibili meccanismi coinvolge le proteine PINK e Parkin. La prima è una chinasi a rapida emivita che si localizza sui mitocondri durante il danno mitocondriale. Infatti, quando avviene la depolarizzazione mitocondriale, PINK si stabilizza sul mitocondrio e recluta dal citosol l'ubiquitina-ligasi Parkin. Parkin ubiquitina alcune proteine sulla superficie esterna del mitocondrio segnalando così i mitocondri danneggiati per l'eliminazione. Il recettore autofagico coinvolto in questo processo è ancora dibattuto, tuttavia un recente lavoro coinvolge NDP52 e optineurin ma non p62 nella mitofagia mediata da PINK e Parkin (38). Quindi

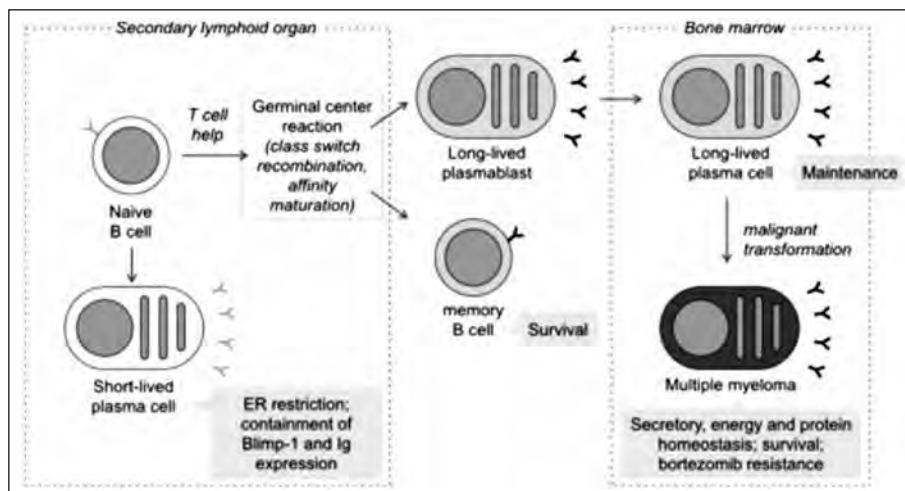


Fig. 1 - Funzioni dell'autofagia nelle PC e nel MM (39).

probabilmente la funzione omeostatica dell'autofagia nel mitocondrio potrebbe estendersi oltre alla mitofagia come suggerito dall'intensa relazione tra p62 e il network mitocondriale. Definire in dettaglio tutte le funzioni di p62 nel MM dovrebbe svelare il motivo dell'estrema dipendenza di questo tumore da questo recettore autofagico con possibili importanti implicazioni terapeutiche.

Bibliografia

1. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011; 7: 279-296.
2. Birgisdottir ÅB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif-crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*. 2013; 126: 3237-3247.
3. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology. 2004; 24: 8055-8068.
4. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem. Sci*. 2012; 37: 230-236.
5. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature*. 2010; 12: 21-223.
6. Lau A, Wang X-J, Zhao F, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol*. American Society for Microbiology. 2010; 30: 327-385.
7. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, et al. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab*. 2006; 3: 211-222.

8. Durán A, Serrano M, Leitges M, et al. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev. Cell.* 2004; 6: 303-309.
9. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015; 16: 345-357.
10. Goode A, Layfield R. Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J. Clin. Pathol.* BMJ Publishing Group Ltd and Association of Clinical Pathologists; 2010; 63: 199-203.
11. Oliva L, Cenci S. Autophagy in plasma cell pathophysiology. *Front Immunol.* Frontiers; 2014;5:103.
12. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 741-750.
13. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 429-457.
14. Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin. Immunol.* 2011; 23: 341-349.
15. Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 133-169.
16. Tellier J, Shi W, Minnich M, et al. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat Immunol.* 2016.
17. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol.* 2016.
18. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 2001; 412: 300-307.
19. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity.* 2004; 21: 81-93.
20. Pengo N, Scolari M, Oliva L, et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol.* 2013; 14: 298-305.
21. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, et al. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-) CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity.* 2015; 43: 132-145.
22. Chen M, Hong MJ, Sun H, et al. Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection. *Nat Med.* 2014; 20: 503-510.
23. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest.* 2015; 125: 42-46.
24. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group. 2012; 12: 401-410.
25. Laddha SV, Ganesan S, Chan CS, White E. Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Mol. Cancer Res.* American Association for Cancer Research. 2014; 12: 485-490.
26. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cy-

- toplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007; 131: 1149-1163.
27. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137: 1062-1075.
 28. Durán A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2008; 13: 343-354.
 29. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*. Rockefeller Univ Press. 2011; 193: 275-284.
 30. Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab. 2011; 25: 795-800.
 31. Auner HW, Cenci S. Recent advances and future directions in targeting the secretory apparatus in multiple myeloma. *Br. J. Haematol*. 2015; 168: 14-25.
 32. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007; 447: 859-863.
 33. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med*. 2013; 368: 1845-1846.
 34. Milan E, Perini T, Resnati M, et al. A plastic SQSTM1/p62-dependent autophagic reserve maintains proteostasis and determines proteasome inhibitor susceptibility in multiple myeloma cells. *Autophagy*. 2015; 11: 1161-1178.
 35. Hoang B, Benavides A, Shi Y, Frost P, Lichtenstein A. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research. 2009; 8: 1974-1984.
 36. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, et al. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int. J. Oncol*. Spandidos Publications. 2011; 38: 643-654.
 37. Lamy L, Ngo VN, Emre NCT, et al. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013; 23: 435-449.
 38. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015; 524: 309-314.
 39. Milan E, Fabbri M, Cenci S. Autophagy in Plasma Cell Ontogeny and Malignancy. *J Clin Immunol*. 2016; 36 (Suppl. 1): 18-24.

Autophagy in muscle diseases

Paolo Bonaldo

Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova;
Centro Interdipartimentale di Biotecnologie Innovative (CRIBI), Università degli Studi di Padova

Skeletal muscle is the most abundant tissue of human body, playing essential roles in body movement and breathing. Muscles are characterized by a high degree of plasticity, as they promptly respond and adapt to a range of physiological conditions, such as physical exercise, loading, hormonal stimulation, nutrient availability and aging. Muscle size and activity are regulated by the balance between anabolic and catabolic processes, and proper regulation of autophagy is essential for the maintenance of muscle homeostasis during physiological conditions and in response to stress (1).

A broad number of studies have established the critical role of autophagy for health and disease (2). Many neurodegenerative conditions, for instance, can be traced back to defective autophagy as the main cause of the failure to clear aggregates of mutated toxic proteins. Autophagy has also been identified as crucial in cancer progression. Furthermore, antigen presentation, innate immunity and pathogen degradation involve autophagosome recruitment and activity (3). While a role of autophagy was also recognized in heart failure and cardiovascular diseases, surprisingly relatively little was known until recently about autophagy and skeletal muscle diseases, in particular muscular dystrophies (4).

The involvement of the autophagy-lysosome system in inherited diseases affecting muscles was initially restricted to some disorders characterized by mutations of genes coding for proteins involved in lysosomal function, such as Pompe disease, Danon disease and X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA). Work carried out in the last few years has revealed an unexpected correlation between autophagy and congenital muscular dystrophies linked to mutation of genes coding for extracellular matrix (ECM) proteins (4). The ECM is a dynamic structure that provides support and anchorage for cells, segregates tissues from one another and initiates signal transduction pathways. The ECM is composed by a complex and specialized set of glycoproteins, collagens and proteoglycans that are secreted and assembled locally into an organized network. An ECM is present in the mammalian embryo already from the two-cell stage and is a component of the microenvironment of all cell types, although the composition of the ECM and the spatial relationship between cells and the ECM differ between tissues. Apart from providing tissue architecture, the ECM plays crucial roles in a number of

cell processes, including differentiation, migration, proliferation and survival (5). As a consequence, defects in specific ECM components are causative for various inherited human diseases. In skeletal muscle, mutations of genes encoding for ECM proteins or their receptors are responsible for different forms of congenital muscular dystrophies (CMDs). CMDs represent a heterogeneous group of progressive genetic diseases primarily affecting skeletal muscles and displaying a broad range of clinical symptoms, ranging from severe and lethal forms to milder types compatible with normal life span (6).

In a pioneering study in the field of muscular dystrophies, our team found that a major impairment of the autophagic process has a key role in the pathogenesis of CMDs linked to collagen VI deficiency (7). This work revealed that autophagy plays a protective role against muscle fiber death in Bethlem myopathy and Ullrich congenital muscular dystrophy, the two major forms of CMDs linked to mutations of collagen VI genes (8). Studies in collagen VI null (*Col6a1*^{-/-}) mice, the best characterized animal model of collagen VI myopathies (9), showed that a failure of the autophagic machinery is responsible for the inefficient removal and persistence of altered organelles in muscle fibers (7). The ensuing accumulation of dysfunctional mitochondria triggers myofiber apoptosis, which in turn leads to the development of the myopathic phenotype (10). In *Col6a1* null mice, the critical consequences of the autophagic failure are even more evident in conditions of muscle stress, such as physical exercise. When *Col6a1*^{-/-} mice are subjected to exercise, a condition in which autophagy is required for the continuous energy need and the rapid clearance of exhausted organelles, the inefficient autophagic flux determines a massive degeneration of myofibers with a marked exacerbation of the myopathic phenotype (11). Notably, forced activation of autophagy by either genetic, nutritional or pharmacological tools is capable to remove altered organelles and restore muscle homeostasis in *Col6a1*^{-/-} mice, with a remarkable recovery from the myopathic phenotype, thus opening a promising therapeutic venue for counteracting muscle atrophy and weakness in these diseases (7). The autophagy failure of *Col6a1* null mice relies upon an impairment of the on-rate of the autophagic flux, which in turn determines a decrease in autophagosome formation. Lack of collagen VI has a remarkable impact on molecules involved in the regulation of autophagy, with decreased levels of Beclin 1 and Bnip3 and persistent activation of the Akt/mTOR pathway even during starvation (7). Although the molecular pathways transducing collagen VI signals from the ECM to the autophagy machinery remain to be elucidated, the Beclin 1 complex and the Akt/mTOR pathway are markedly affected by lack of collagen VI and these alterations appear to be the main cause for the impaired autophagy activity. Notably, Beclin 1 levels are also lower in muscle biopsies of patients affected by collagen VI myopathies, and the amount of Beclin 1 seems to correlate with the severity of the clinical phenotype, being much lower in the severe Ullrich CMD than in the milder Bethlem myopathy (7).

The work carried out in *Col6a1* null mice and in Bethlem/Ullrich patients represented the first evidence that an impairment of the autophagic flux plays a crucial role in the pathogenesis of muscular dystrophies, and paved the way

for investigating autophagy defects in other muscular dystrophies (4). Further studies revealed that the dy^{3K}/dy^{3K} mouse, which represents a model of human MDC1A, another form of CMD caused by mutations of the gene coding for laminin $\alpha 2$ (6), also display a marked alteration of autophagy. Interestingly, and at difference from $Col6a1^{-/-}$ animals, dy^{3K}/dy^{3K} mice display a general upregulation of the autophagic machinery and inhibition of autophagy significantly ameliorates their dystrophic phenotype (12). The increased autophagic flux of dy^{3K}/dy^{3K} muscles is due to inactivation of Akt, which in turn determines the enhanced transcription of several autophagy genes. Altogether, these studies are of high interest in the field of autophagy and muscular dystrophies, since they demonstrate that an incorrect activity of autophagy plays a key pathogenic role in two of the most common forms of CMDs, both linked to deficiency of ECM proteins (4). How the absence of two different ECM proteins results in such opposing effects on autophagy is still unknown. Although much work remain to be done in order to elucidate in detail the molecular mechanisms that connect ECM to the autophagy machinery, it is evident that in both $Col6a1^{-/-}$ and dy^{3K}/dy^{3K} animals it is possible to rescue the dystrophic phenotype and reestablish myofiber homeostasis by modulating autophagy. Interestingly, recent work on proteoglycans further supports the novel concept that different ECM components play instructive roles in finely tuning autophagy (13). Similarly to what found for collagen VI and laminin-2 in skeletal muscle and muscular dystrophies, studies in different cell types revealed opposing roles for decorin and perlecan, two main ECM proteoglycans, in activating and inhibiting autophagy respectively (14).

The involvement of autophagy deregulation in the pathogenesis of muscle diseases is not limited to CMDs caused by mutations of collagen VI or laminin-2 genes. Indeed, studies by different teams demonstrated an impairment of autophagy in muscles of patients affected by Duchenne muscular dystrophy (DMD) and in *mdx* mice, the animal model of DMD, pointing at autophagy as a promising therapeutic target also for these muscle diseases (15, 16). Unbalanced regulation of autophagy was also reported in other forms of muscular dystrophies and myopathies, such as X-linked myotubular myopathy, Emery-Dreifuss muscular dystrophy and FHL1-linked rigid spine syndrome.

The most powerful and better characterized stimulus able to induce autophagy is aminoacid starvation. In addition, different naturally occurring compounds contained in food are emerging as potent autophagy inducers (17). Considering the increasing number of muscle diseases that are being correlated with defective autophagy, there is a growing interest in formulating diet-based, rather than pharmacological, therapeutic approaches aimed at restoring a proper autophagic flux in these pathological contexts. Based on the remarkable findings obtained with *Col6a1* null mice, where feeding with a specifically designed low-protein diet was capable to activate autophagy, leading to a striking amelioration of the myopathic phenotype and a significant improvement of the structural and functional muscle parameters (7), a pilot clinical trial was recently carried out in Bethlem and Ullrich patients (ClinicalTrials.gov NCT01438788). This study demonstrated

that 1-year low-protein diet was effective in restoring autophagy in muscles of Bethlem/Ullrich patients, with a corresponding decrease of myofiber apoptosis and improved metabolic parameters (18). This clinical study has provided a direct proof of the validity of autophagy as a therapeutic target in muscular dystrophies, showing that autophagy can be successfully activated in muscles of patients affected by collagen VI myopathies, and confirming that autophagy modulation is a suitable target to improve muscle homeostasis. On the other side, a profound modification of food habits may be quite challenging for the patients, and therefore further approaches are desirable towards the refinement of autophagy-modulating strategies. In a recent work in the collagen VI-deficient animal model, our team showed that spermidine, a naturally occurring non-toxic autophagy inducer enriched in several foods, is capable to reactivate autophagy in a dose-dependent manner and is beneficial for *Col6a1*^{-/-} mice, leading to amelioration of the muscle structural and functional defects (19).

In conclusion, a growing body of experimental studies by different teams indicates that proper regulation of autophagy is fundamental for the homeostasis of skeletal muscles during physiological conditions and in response to stress. The critical importance of a proper tuning of the autophagic machinery is clearly demonstrated by the fact that defective autophagy as well as excessive autophagy are both harmful for muscle health and plays a major pathogenic role in several forms of muscle diseases. In the near future, studies aimed at understanding in more detail the contribution and extent of autophagy deregulation in different types of muscle disorders will not only allow shedding further light on the pathomolecular mechanisms underlying disease onset and progression, but will also help paving the way for the design of novel therapeutic strategies.

Bibliografia

1. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of atrophy. *Dis Model Mech.* 2013; 6: 25-39.
2. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011; 147: 728-741.
3. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132: 27-42.
4. Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci.* 2013; 126: 5325-5333.
5. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 786-801.
6. Collins J, Bönnemann, CG. Congenital muscular dystrophies: toward molecular therapeutic interventions. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010; 10: 83-91.
7. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, Bertaggia E, Blaauw B, Urciuolo A, Tiepolo T, Merlini L, Maraldi NM, Bernardi P, Sandri M, Bonaldo P. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med.* 2010; 16: 1313-1320.

8. Bönemann CG. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7: 379-390.
9. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*. 2015; 128: 3525-3531.
10. Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*. 2003; 35: 367-371.
11. Grumati P, Coletto L, Schiavinato A, Castagnaro S, Bertaggia E, Sandri M, Bonaldo P. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy*. 2011; 7: 1415-1423.
12. Carmignac V, Svensson M, Körner Z, Elowsson L, Matsumura C, Gawlik KI, Allamand V, Durbeek M. Autophagy is increased in laminin $\alpha 2$ chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 4891-4902.
13. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Instructive roles of extracellular matrix on autophagy. *Am J Pathol*. 2014; 184: 2146-2153.
14. Gubbiotti MA, Iozzo RV. Proteoglycans regulate autophagy via outside-in signaling: an emerging new concept. *Matrix Biol*. 2015; 48: 6-13.
15. De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M, Clementi E. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1363.
16. Spitali P, Grumati P, Hiller M, Chrisam M, Aartsma-Rus A, Bonaldo P. autophagy is impaired in the tibialis anterior of dystrophin null mice. *PLoS Curr*. 2013; 5.
17. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest*. 2015; 125: 85-93.
18. Castagnaro S, Pellegrini C, Pellegrini M, Chrisam M, Sabatelli P, Toni S, Grumati P, Ripamonti C, Pratelli L, Maraldi NM, Cocchi D, Righi V, Faldini C, Sandri M, Bonaldo P, Merlini L. Autophagy activation in COL6 myopathic patients by a low-protein-diet pilot trial. *Autophagy*. 2016; 12: 2484-2495.
19. Chrisam M, Pirozzi M, Castagnaro S, Blaauw B, Polishchuck R, Cecconi F, Grumati P, Bonaldo P. Reactivation of autophagy by spermidine ameliorates the myopathic defects of collagen VI-null mice. *Autophagy*. 2015; 11: 2142-2152.

Autofagia e neurodegenerazione nelle malattie del motoneurone

Angelo Poletti

Centro di Eccellenza sulle Malattie Neurodegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano

Le malattie del motoneurone comprendono una grande varietà di malattie neurodegenerative in cui sono affetti i motoneuroni corticali e/o spinali. Le malattie del motoneurone possono apparire in forma sporadica o familiare, ma molto poco sulle alterazioni che causano le forme sporadiche, per quelle familiari vi è una specifica mutazione genica responsabile della variazione di una o più funzioni della proteina codificata. Queste mutazioni possono portare alla perdita della funzione proteica o all'acquisto di una funzione neurotossica. Esempi tipici della malattia del motoneurone associate a proteine mutate neurotossiche sono la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e la atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA). Molte delle proteine mutate legate a queste due patologie non riescono a raggiungere la giusta conformazione, o diventano instabili, dando origine a forme aberranti o "misfolded". Queste proteine "misfoldate" generano uno stress proteotossico e hanno una forte tendenza ad aggregare, accumulandosi a livello neuronale, con un notevole impatto su diverse funzioni cellulari che possono causare la morte del neurone. Al fine di contrastare questo stress proteotossico, le cellule e i neuroni hanno sviluppato il sistema di controllo di qualità proteico (PQC) che comprende i chaperones molecolari e i sistemi degradativi del proteasoma e dell'autofagia. Lavorando sinergicamente queste vie mantengono una corretta omeostasi cellulare proteggendo dalla tossicità di proteine mal ripiegate che tendono ad aggregare. Sfortunatamente, lo stress proteotossico può esso stesso alterare le funzionalità del sistema PQC (a causa di livelli di chaperones insufficienti, eccessivo caricamento o blocco delle vie degradative) e questo può originare un circolo vizioso che accentua la tossicità delle proteine "misfoldate". Pertanto, gli approcci finalizzati a potenziare l'attività del sistema PQC a livello neuronale può avere una rilevanza per eventuali futuri approcci terapeutici.

La SLA e la SBMA come modello di malattie del motoneurone

La SLA è una tipica malattia che colpisce i motoneuroni corticali e spinali, ma con una notevole variabilità tra i vari pazienti affetti e ciò spiega le diverse manifesta-

zioni cliniche. Oltre ai motoneuroni possono essere colpiti i neuroni dell'area frontotemporale (Robberecht and Philips, 2013) causando un fenotipo misto motorio e cognitivo (sono riportati casi di SLA con demenza frontotemporale). Inoltre anche cellule gliali, come gli astrociti (Nagai et al., 2007, Boillée et al., 2006, Trotti et al., 1999), gli oligodendrociti (Philips et al., 2013), le cellule di Schwann (Lobsiger et al., 2009, Turner et al., 2010), la microglia (Philips e Robberecht, 2011), e le cellule muscolari (Dobrowolny et al., 2005, Dobrowolny et al., 2008, Musarò, 2010, Galbiati et al., 2014, Crippa et al., 2013, 2013, Onesto et al., 2011) possono in varia misura contribuire alla malattia, alterando la capacità di sopravvivenza dei motoneuroni. Molti casi di SLA sono sporadici (sSLA) e solo il 15% dei casi è familiare (fSLA), ma non distinguibili clinicamente dalle sSLA. Le fSLA sono associate a mutazioni di geni che codificano per proteine quali SOD1, TDP-43, FUS/TLS, SQSTM1/p62, optineurina, ubiquilina, VCP e altre (Taylor et al., 2016). Molte di queste proteine sono direttamente o indirettamente coinvolte nel sistema PQC e spesso nella regolazione della via autofagica (Taylor et al., 2016). Inoltre, quando mutate, queste proteine tendono a dare misfolding (Seetharaman et al., 2009) e ad aggregare, accumulandosi nelle cellule. Le mutazioni sembrano solo incrementare una tendenza naturale di queste proteine a dare forme alterate, dato che ciò accade, anche se con minor frequenza, anche con le loro forme non mutate (wild type). Infatti, nelle sSLA spesso si trovano inclusioni contenenti le forme normali di TDP-43, FUS, SQSTM1/p62, optineurina, ubiquilina (tipiche della fSLA quando mutate) (Bosco et al., 2010, Neumann et al., 2006, Daoud et al., 2009), suggerendo l'esistenza di un meccanismo comune tra le fSLA and le sSLA.

La SBMA differisce dalla SLA perchè è una malattia con una progressione più lenta, in cui sono colpiti i motoneuroni spinali (e non corticali) e i sensoriali neuroni dei gangli dorsali. Nella SBMA non c'è coinvolgimento di cellule gliali o massiva risposta microgliale, mentre anche in questo caso le cellule muscolari sembrano essere direttamente affette (Boyer et al., 2013, Cortes et al., 2014, Lieberman et al., 2014, Rinaldi et al., 2014). Inoltre, nella SBMA sono colpite diverse cellule responsive agli androgeni (e.g.: cellule del Sertoli e di Leydig) (La Spada et al., 1991, Fischbeck, 1997, Kennedy et al., 1968, Atsuta et al., 2006, Malena et al., 2013, Soraru et al., 2008). La SBMA è una malattia ereditaria legata al cromosoma X in quanto la mutazione avviene nel gene del recettore degli androgeni (AR). La mutazione consiste in una espansione di un tratto CAG presente nell'esone 1 che codifica la regione N-terminale della proteina AR. La ripetizione CAG da quindi origine ad un tratto poliglutamminico (polyQ) espanso che conferisce tossicità alla proteina mutata perché ne previene il corretto folding (La Spada et al., 1991, Poletti, 2004). Particolarità della SBMA è che la tossicità di ARpoliQ è indotta dal legando testosterone (Stenoien et al., 1999, Simeoni et al., 2000, Katsuno et al., 2002, Katsuno et al., 2003).

Il ruolo dell'autofagia nel sistema PQC nelle malattie del motoneurone

Molti studi degli ultimi 15 anni hanno chiaramente dimostrato che l'accumulo delle proteine misfoldate nella fSLA, sSLA o SBMA correla con alterazioni del

sistema PQC (Ciechanover and Kwon, 2015, Rusmini et al., 2015). Infatti, il proteasoma può essere bloccato da particolari conformazioni proteiche (Ciechanover and Kwon, 2015, Holmberg et al., 2004), mentre studi effettuati con un reporter dell'attività del proteasoma, la proteina GFP fusa ad una piccola sequenza "degron" di indirizzamento al proteasoma (GFPu), hanno mostrato che questo può essere saturato da un eccesso di proteine misfoldate (Rusmini et al., 2015, Crippa et al., 2010, Crippa et al., 2016). Tuttavia il proteasoma viene desaturato quando si formano aggregati della proteina misfoldata, perchè questi la sequestrano, prevenendone l'indirizzamento a questa via degradativa (Rusmini et al., 2013, Giorgetti et al., 2015). Sfortunatamente, anche il flusso autofagico può essere bloccato dalla presenza di particolari forme aggregate delle proteine misfoldate, come evidenziabile dal grande accumulo di autofagosomi positivi per LC3-II e dalla formazione di aggregati di SQSTM1/p62, due marcatori dell'attività autofagica. Ad oggi i meccanismi alla base di queste alterazioni sono in parte sconosciuti. In queste condizioni l'equilibrio tra le due vie degradative risulta essere molto importante. Tra i vari meccanismi molecolari coinvolti in questa regolazione, quelli basati sull'indirizzamento basato su alcuni "nucleotide exchange factors" (NEF), co-chaperones molecolari (che comprendono alcune proteine BAGs) hanno ricevuto attenzione negli ultimi anni. Alcuni BAGs, interagendo specificamente con proteine della famiglia delle HSP70 (e la E3 ubiquitina ligasi CHIP), possono indirizzare le proteine misfoldate al proteasoma (BAG1) o all'autofagia (BAG3 associata a HSPB8) (Crippa et al., 2013, Crippa et al., 2010, Minoia et al., 2014, Crippa et al., 2010, Carra et al., 2008, Arndt et al., 2010, Gamerding et al., 2011, Cristofani et al., 2017). Se le proteine misfoldate della fSLA, sSLA o SBMA sfuggono alla prima linea di difesa costituita dai chaperone molecolari, che tentano il re-folding, un secondo controllo basato sui BAGs ne determina il destino ad una particolare via degradativa. Questo equilibrio è quindi finemente orchestrato a impedisce l'accumulo delle proteine misfoldate in aggregati intracellulari. La presenza di questi aggregati è quindi un indice di una scarsa efficienza del sistema PQC ad uno di questi livelli. (Rusmini et al., 2015, Minoia et al., 2014, Gamerding et al., 2011, Cristofani et al., 2017, Lilienbaum, 2013, Behl, 2011, Behl, 2016, Charmpilas et al., 2017, Amor et al., 2016, Balchin et al., 2016). Tra i vari chaperones, la HSPB8, che appartiene alla famiglia delle piccole HSPs (small HSPs), sembra avere un ruolo molto importante per ripristinare l'attività del sistema PQC quando il flusso autofagico è alterato. HSPB8 ha un potente effetto di chaperone ed antiaggregante su un numero elevato di proteine misfoldate (Crippa et al., 2010, Rusmini et al., 2013, Carra et al., 2008, Carra et al., 2005, Carra et al., 2008, Carra, 2009, Carra et al., 2012, Carra et al., 2013). È rilevante inoltre il fatto che, a livello del midollo spinale, la HSPB8 viene espressa specificamente nei motoneuroni delle corna anteriori, e che questa espressione diminuisce con l'età (Crippa et al., 2010) suggerendo che queste cellule possano diventare più vulnerabili nel tempo all'azione delle proteine misfoldate. Inoltre, in caso di blocco del proteasoma (una condizione che può essere presente nelle malattie del motoneurone) in motoneuroni in coltura l'espressione di HSPB8 aumenta per attivazione trascrizionale (Crippa et al., 2010). In linea con questi dati, i livelli di HSPB8

sono aumentati nel midollo spinale di reperti autoptici di pazienti con SLA (Anagnostou et al., 2010). Nelle fasi finali della malattia, i motoneuroni spinali di topi modello di fSLA presentano un'espressione di HSPB8 molto elevata che correla con la presenza di elevati livelli di proteina SOD1 mutata non aggregata (Crippa et al., 2010), e lo stesso aumento si verifica nel tessuto muscolare di topi SLA (Crippa et al., 2013, Crippa et al., 2013) e di topi SBMA (Rusmini et al., 2015). Questo aumento di HSPB8 probabilmente è il tentativo della cellula di ridurre la tossicità delle specie misfoldate proteiche responsabili di queste malattie. Infatti, in un modello di SLA di *Drosophila melanogaster*, la sovraespressione dell'ortologo di HSPB8 (HSP67Bc), previene le alterazioni tipicamente osservabili per la proteina della SLA TDP-43, aumentando la sopravvivenza dell'animale (Crippa et al., 2016), mentre l'effetto opposto si verifica con il silenziamento della proteina (Crippa et al., 2016). Infine, mutazioni di HSPB8 (la K141E o K141N), che determinano la perdita di funzione di HSPB8, correlano con alcune forme di malattia del motoneurone (Charcot-Marie-Tooth type 2L disease o hereditary distal motor neuropathy type II (dHMN-II)) (Fontaine et al., 2006, Irobi et al., 2010)).

A livello cellulare, l'effetto protettivo della HSPB8 è mediato dalla sua capacità di facilitare la degradazione autofagica delle proteine misfoldate, rimuovendo il blocco di flusso autofagico descritto in molte malattie neurodegenerative (Rusmini et al., 2015, Crippa et al., 2016, Rusmini et al., 2013, Giorgetti et al., 2015). Sino ad ora, HSPB8 si è mostrata attiva sulle proteine con polyQ (ARpolyQ, mutant huntingtin, mutant ataxin-3), sulla beta-amyloid, sull'alpha-synuclein e sulle proteine della SLA (SOD1 mutata e TDP-43 intero o frammentato o i dipeptidi prodotti da C9ORF72) (Crippa et al., 2010, Crippa et al., 2016, Rusmini et al., 2013, Carra et al., 2008, Chavez Zobel et al., 2003, Wilhelmus et al., 2006, Bruinsma et al., 2011, Seidel et al., 2011).

Il meccanismo molecolare della HSPB8 nella facilitazione del flusso autofagico, prevede la sua associazione con BAG3 (Carra et al., 2008) e successivamente con HSP70 e CHIP. La HSPB8 sembra essere un fattore limitante di questa via (Crippa et al., 2010). Quando il complesso viene attivamente trasportato alla sede di formazione degli autofagosomi, la proteina misfoldata, dopo essere stata ubiquitinata da CHIP, viene inserita tramite il recettore autofagico SQSTM1/p62. (Crippa et al., 2010, Arndt et al., 2010). BAG3 è una proteina scaffold che tiene uniti i componenti del complesso e lega la proteina 14-3-3 per potersi associare alla dineina, proteina motrice fondamentale per il trasporto del complesso all'autofagosoma nascente (Crippa et al., 2010, Arndt et al., 2010, Merabova et al., 2015). Se il trasporto mediato dalla dineina viene alterato geneticamente (siRNA) o farmacologicamente (EHNA), la via autofagica non può più essere utilizzata in modo efficace (Cristofani et al., 2017). In tal caso, fattori sconosciuti portano all'induzione dell'espressione di un fattore alternativo, BAG1, che lega anch'esso HSP70/CHIP-1, ma direziona la degradazione delle proteine misfoldate al proteasoma (Gamerding et al., 2011, Cristofani et al., 2017, Behl, 2011, Behl, 2016). Infatti, la sovraespressione esogena di BAG1 facilita la rimozione per via proteasomiale di proteine misfoldate, mentre se la dineina è bloccata, l'azione prodegradativa di BAG1 è inibita dai bloccanti del proteasoma (MG132), ma non dell'autofagia (3-MA) (Cristofani et al., 2017).

Conclusioni

Queste evidenze testimoniano che l'induzione farmacologica di HSPB8 potrebbe servire a mantenere un corretto funzionamento della via autofagica, limitando l'indirizzamento di proteine misfoldate alla meno efficace via degradativa del proteasoma. Esistono farmaci (colchicina) o composti naturali (trealosio) che si sono dimostrati efficaci nell'induzione dell'espressione di HSPB8 e che potrebbero avere un impiego terapeutico se la loro efficacia verrà confermata in modelli sperimentali di SLA o SBMA

Bibliografia

- Amor, et al. *CNS Neurol. Dis. Drug Targets*. 2016.
Anagnostou, et al. *Neurobiol. Aging*. 2010; 31: 969-985.
Arndt, et al. *Curr. Biol*. 2010; 20: 143-148.
Atsuta, et al. *Brain*. 2006; 129: 1446-1455.
Balchin, et al. *Science*. 2016 Jul 01;353(6294):aac4354.
Behl, et al. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 May 6.
Behl. *Autophagy*. 2011; 7: 795-798.
Boillée, et al. *Neuron*. 2006; 52: 39-59.
Bosco, et al. *CNS Neurol. Dis. Drug Targets*. 2010; 9: 779-790.
Bosco, et al. *Hum. Mol. Genet*. 2010; 19: 4160-4175.
Boyer, et al. *Front. Physiol*. 2013; 4: 356.
Boyer, et al. *Skeletal Muscle*. 2013; 3: 24.
Bruinsma, et al. *Proteins*. 2011; 79: 2956-2967.
Carra, et al. *Autophagy*. 2008; 4: 237-239.
Carra, et al. *Hum. Mol. Genet*. 2005; 14: 1659-1669.
Carra, et al. *J Biol. Chem*. 2008; 283: 1437-1444.
Carra, et al. *Philos. Trans. Royal Soc. London B, Biological Sciences*. 2013; 368: 20110409.
Carra, et al. *Progr Neurobiol*. 2012; 97: 83-100.
Carra. *Autophagy*. 2009; 5: 428-429.
Charmpilas, et al. *Cell Stress Chaperones*. 2017.
Chavez Zobel, et al. *Hum. Mol. Genet*. 2003; 12: 1609-1620.
Ciechanover, et al. *Exp. Mol. Med*. 2015; 47: e147.
Cortes, et al. *Neuron*. 2014; 82: 295-307.
Crippa, et al. *Autophagy*. 2010; 6: 958-960.
Crippa, et al. *Biochem. Soc. Trans*. 2013; 41: 1598-1604.
Crippa, et al. *Front. Cell. Neurosci*. 2013; 7: 234.
Crippa, et al. *Hum. Mol. Genet*. 2010; 19: 3440-3456.
Crippa, et al. *Hum. Mol. Genet*. 2016; 25: 3908-3924.
Cristofani, et al. *Autophagy*. 2017; in press.
Daoud, et al. *J. Med. Genet*. 2009; 46: 112-114.
Dobrowolny, et al. *J Cell Biol*. 2005; 168: 193-199.
Dobrowolny, et al. *Neurol Res*. 2008; 30: 131-136.
Dobrowolny, et al. *Cell Metab*. 2008; 8: 425-436.

- Fischbeck, J *Inher Metab Dis.* 1997; 20: 152-158.
- Fontaine, et al. *FASEB J.* 2006; 20: 2168-2170.
- Galbiati, et al. *Neurochem Int.* 2014; 79: 70-78.
- Gamerding, et al. *EMBO Rep.* 2011; 12: 149-156.
- Gamerding, et al. *J. Mol. Med.* 2011; 89: 1175-1182.
- Giorgetti, et al. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24: 64-75.
- Holmberg, et al. *Embo J.* 2004; 23: 4307-4318.
- Irobi, et al. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 3254-3265.
- Katsuno, et al. *Nature Med.* 2003; 9: 768-773.
- Katsuno, et al. *Neuron.* 2002; 35: 843-854.
- Kennedy, et al. *Neurology.* 1968; 18: 671-680.
- La Spada, et al. *Nature.* 1991; 352: 77-79.
- Lieberman, et al. *Cell Rep.* 2014; 7: 774-784.
- Lilienbaum, et al. *Int J Biochem Mol Biol.* 2013; 4: 1-26.
- Lobsiger, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 4465-4470.
- Malena, et al. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 109-121.
- Merabova, et al. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 831-841.
- Minoia, et al. *Autophagy.* 2014; 10.
- Musarò, *World J Biol Chem.* 2010; 26: 62-68.
- Nagai, et al. *Nature Neurosci.* 2007; 10: 615-622.
- Neumann, et al. *Science.* 2006; 314: 130-133.
- Onesto, et al. *J. Neurochem.* 2011; 118: 266-280.
- Philips, et al. *Brain.* 2013; 136: 471-482.
- Philips, et al. *Lancet Neurol.* 2011; 10: 253-263.
- Poletti, A. *Front. Neuroendocrinol.* 2004; 25: 1-26.
- Rinaldi, et al. *Neuron.* 2014; 82: 251-253.
- Robberecht, et al. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 248-264.
- Rusmini, et al. *J. Mol. Neurosci: MN.* 2015; in press.
- Rusmini, et al. *Neurobiol. Aging.* 2013; 34: 2585-2603.
- Rusmini, et al. *Sci Rep.* 2015; 5: 151-174.
- Seetharaman. *Exp Biol. Med.* 2009; 234: 1140-1154.
- Seidel, et al. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011; 38: 39-53.
- Simeoni, et al. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 133-144.
- Soraru, et al. *J. Neurol. Sci.* 2008; 264: 100-105.
- Stenoien, et al. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 731-741.
- Taylor, et al. *Nature.* 2016; 539: 197-206.
- Trotti, et al. *Nature Neurosci.* 1999; 2: 848.
- Turner, et al. *Hum Mol. Genet.* 2010; 19: 815-824.
- Wilhelmus, et al. *Acta Neuropathol.* 2006; 111: 139-149.

Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times

Luca Scorrano

Dulbecco-Telethon Institute at the Venetian Institute of Molecular Medicine, Padova;
Department of Biology, University of Padova

Abstract

Mitochondrial morphological and structural changes play a role in several cellular processes. We discovered that mitochondrial shape is also critical to sustain cell viability during macroautophagy, when unopposed fusion leads to mitochondrial elongation in vitro and in vivo. These longer mitochondria are protected from degradation, possess more cristae and optimize ATP synthesis when nutrients are restricted.

The term autophagy, derived from the Greek and meaning “self-eating”, was first introduced by de Duve, to describe a catabolic process that allows the recycling of intracellular components under conditions of nutrient depletion. Thus, breakdown of cytosolic macromolecules or even entire organelles occurs in response to starvation, a process now called macroautophagy (1).

Mitochondria are known to be central organelles in energy dynamics and in the regulation of several signaling cascades. Mitochondrial dynamics, i.e. the mitochondrial membrane shape changes controlled by mitochondria-shaping large dynamin-related GTPases, is involved in these processes. Mitochondrial division is regulated by Dynamin related protein (Drp) 1, mitochondrial fission factor (Mff) and fission (Fis) 1. Mitofusins (Mfn) 1 and 2 in the outer membrane and Optic Atrophy 1 (Opa1) in the inner membrane control mitochondrial fusion. Independently from its role in mitochondrial fusion, Opa1 is required for cristae biogenesis and remodeling (2).

We participated in the analysis of the functions mitochondria play during macroautophagy. Mitochondria-derived reactive oxygen species contribute to the amplification of autophagy. Moreover, mitochondria participate in the formation of the autophagosomal membrane, in a process that depends on the tethering of mitochondria to the endoplasmic reticulum. Selective degradation of mitochondria, mitophagy, is preceded by mitochondrial fragmentation associated with dysfunction of the organelle (3, 4). But what happens to mitochondrial morphology when

macroautophagy is induced? Do they fragment to be engulfed and degraded? Wouldn't degradation of mitochondria early during macroautophagy be paradoxical given their functions in energy conversion?

We addressed these questions and unexpectedly we found that mitochondria elongate early during induction of autophagy. In cell culture, mitochondrial elongation was observed as soon as 1 hour after starvation and maintained for 48 hours. Mitochondrial elongation in response to starvation was observed in several cell lines and in primary mouse hepatocytes. Moreover, mTOR inhibition, another classical stimulus of autophagy, also resulted in mitochondrial elongation. Notably, elongation of the mitochondrial network upon induction of autophagy was also observed *in vivo*: muscle and liver from mice fasted for 12 hours presented elongated mitochondria.

How does induction of autophagy trigger mitochondrial elongation? Starvation leads to an increase in cAMP levels and subsequent activation of protein kinase A (PKA). Active PKA phosphorylates the cytosolic pro-fission protein Drp1 at Ser637. When phosphorylated, Drp1 doesn't translocate to the mitochondria, which is an essential step in mitochondrial fragmentation. Accordingly, during starvation, less Drp1 is associated with mitochondria, that consequently elongate because of unopposed fusion. Indeed, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking Mfn1 and Mfn2 or Opa1 don't display mitochondrial elongation in response to starvation.

Both starvation and mTOR silencing induce macroautophagy. Even if mitochondrial fragmentation precedes their degradation, mitochondria paradoxically elongate in response to these stimuli. Obviously, many questions emerge from this finding. Are mitochondria randomly targeted to the autophagosomes even if they are elongated? Does mitochondrial shape affect their rate of degradation during macroautophagy? To address these questions we followed the rate of degradation of mitochondrial proteins versus other proteins, in wt MEFs compared with cells unable to elongate mitochondria in response to starvation. MEF cells knock out for the mitochondrial fusion proteins lose mitochondria faster than their wt counterparts. Moreover, degradation of mitochondrial proteins can be pharmacologically blocked using an autophagy inhibitor. Thus, we demonstrated that mitochondrial elongation during starvation protects mitochondria from autophagic degradation (5, 6). Our results raise the question of whether macroautophagy is a truly unselective process. In accordance, it has been previously reported that degradation of organelles in response to starvation is not random, but occurs in an ordered fashion. A simply steric limitation could explain why elongated mitochondria are excluded from autophagosomes. Alternatively, elongated mitochondria lack the signal that targets them to autophagy. During starvation short mitochondria which lack mitochondrial fusion proteins display a latent dysfunction. An appealing hypothesis would be that a signal responsible for targeting the organelle to autophagy like Parkin, re-localizes to these dysfunctional mitochondria, prompting their degradation.

Why should mitochondria be spared from macroautophagy? During nutrient deprivation, cells need to maximize energy production, that under these conditions

relies mainly on internal substrates, like amino acids resulting from protein catabolism. In eukaryotic cells this task is optimally performed by mitochondria. Elongated mitochondria have an increased number of cristae per surface, where higher levels of ATP synthase dimers assemble to produce ATP more efficiently. Optimizing ATP production when cells have a limited access to substrates must have a major impact in cell viability. Indeed, we found that MEFs unable to elongate mitochondria die faster in response to starvation. As mentioned before, shorter mitochondria are not only less efficient in producing ATP, but they also display a latent dysfunction, consuming cytosolic ATP to maintain their membrane potential. Consumption of ATP leads to a bioenergetic crisis that contributes to the faster cell death observed.

The role of mitochondrial elongation during macroautophagy illustrates another cellular process regulated by this organelle. It would be interesting to further analyze the physiological significance of mitochondrial elongation during nutrient depletion *in vivo*. Is this a stereotypical response of all tissues? How do individuals that present mutations in the mitochondrial-shaping machinery deal with neonatal starvation? Similarly, our results can contribute to clarify why the heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are not efficiently removed by the mitophagy machinery: if mitochondria are still able to elongate, they could be spared from autophagic degradation. Given that the fusion proteins are GTPases amenable of being drugged, one could envision the possibility of inducing efficient mitophagy by combining inhibition of fusion with limited starvation. Hopefully, this could be a possible treatment to ameliorate the load of mutated mtDNA in patients with mitochondrial diseases.

Bibliografia essenziale

1. Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *BiochimBiophysActa*. 2012.
2. Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol*. 2016; 78: 505-531.
3. Gomes LC, Scorrano L. High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1777: 860-866.
4. Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*. 2010; 29: 1774-1785.
5. Gomes LC, Di BG, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 589-598.
6. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 10190-10195.

Autophagy and cancer

Alessia Ciarrocchi

Laboratory of Translational Research, Arcispedale S. Maria Nuova-IRCCS, Reggio Emilia

Cancer progression can be regarded as a multistep evolutionary process through which cancer cells acquire competences to survive in severely unfavorable microenvironmental conditions. At each step of progression, cancer cells acquire new abilities to overcome physiological barriers restraining growth. Autophagy is a catabolic process that mediates degradation of unnecessary or dysfunctional cellular components (1, 2). Through this mechanism cells eliminate damaged (and potentially dangerous) molecules or organelles, thus ensuring maintenance of cellular homeostasis. Owing to this key role, autophagy constitutes a barrier against various degenerative processes that may affect healthy cells, including malignant transformation. However, autophagy is also used as a cellular strategy to overcome intracellular or environmental stress, including nutrient deprivation, hypoxia and drugs effects (3-5). Degradation of cellular components may be an alternative mechanism to provide energy supplies and basic metabolites to cells. Thus, autophagy acts as a 'Janus-faced' player in cancer development and progression (Figure 1). In the early phases of cancer development, autophagy plays oncosuppressive functions protecting healthy cells from the accumulation of potentially harmful components. Later once tumor is established autophagy mainly supports progression by helping cancer cells to overcome the adverse conditions of cancer microenvironment (6). Niels Bohr once said "A great truth is a truth whose opposite is also a great truth".

Autophagy and malignant transformation

Accumulating evidence indicates that autophagy in healthy cells inhibits malignant transformation, restraining accumulation of potentially harmful alterations and performing a tumor suppressive function (7). Therefore, it's not surprising that genetic inactivation of essential autophagy genes has been associated with an increased incidence of tumors in various mouse models, or that the expression of key components of the autophagic machinery like Beclin-1 is repressed in human tumors (8-10). Autophagy protects against malignant transformation in several ways.

First, it reduces the number of damaged mitochondria and redox-active protein aggregates, which may promote genotoxic damages to DNA causing cancer leading mutations. It also allows the degradation of damaged and misfolded proteins preventing their aberrant function.

Apoptosis and senescence are among the most important oncosuppressive processes that occur in cells. Under certain circumstances, autophagy constitutes a stress adaptation that avoids apoptosis, whereas in other cellular settings, it constitutes an alternative cell-death pathway. In case of severe cell damages, these two cell death processes may be activated by common upstream signals and cooperate to escape cell transformation. In this setting, the activation of massive autophagy leads to cell death through apoptosis (11). Senescence was originally identified in the context of the limited lifespan of replicating somatic cells but it is now clear that oncogene activation also promotes a form of senescence that presumably acts as a barrier to cell transformation (12).

A number of studies support the collateral activation of autophagy during senescence and demonstrate that interfering with autophagy concurrently compromises the acquisition of the senescent phenotype (13). Tumor initiation can also rely on oncogenic infective agents, like some Human Papillomaviruses (HPVs) strains. HPV enters an epithelial cell and virus proteins are encoded, some of those interfere with cell functions that normally prevent excessive growth, helping the cell to grow in an uncontrolled manner and to avoid cell death. Autophagy helps to prevent this process providing a mechanism for the elimination of intracellular microorganisms (14).

Chronic inflammation has been shown to play a fundamental role in tumorigenesis. Several convergent reports show that autophagy restrains inflammation through many regulatory interactions with innate immune signaling pathways, by removing endogenous inflammasome agonists and through effects on the secretion of immune mediators. By restraining chronic inflammation autophagy may contribute to subtract to cancer cells relevant survival signals (15).

Autophagy and cancer progression

In spite of its tumor suppressive function in the early stages of tumor transformation and development, Autophagy has been shown to support cancer survival and the acquisition of aggressive features once the tumor is formed. Indeed, autophagy inhibition by genetic and pharmacological strategies has been shown to restrain tumor expansion in mice with previously established lesions. Autophagy executes its cancer supporting function in several ways.

First of all, autophagic degradation of unnecessary and redundant cellular organelles and macromolecules fuels cancer cells providing energetic supplies and components necessary for their growth. Furthermore, autophagy promotes resistance to the cytotoxic effects of many anti-cancer therapies including chemotherapy and radiation.

Beside the direct effect on cancer cells, autophagy plays a crucial role in conditioning microenvironment to support cancer growth, progression, adaptation and survival to the adverse conditions (like oxygen and nutrients deprivation) that characterize cancer microenvironment.

Increased evidences indicate that components of the microenvironment including stromal and endothelial cells support the survival and proliferation of tumor cells. Interestingly, autophagy was found to be part of a precise metabolic circuit that

allows these cells to support proliferation and expansion of cancer through an autocrine mechanism (16).

Another way to sustain tumor progression and metastatic spreading for autophagy is to promote escape to immune-surveillance and resistance to cytotoxic T-lymphocytes by degrading crucial protein for immune activation. Akalay and colleagues showed that acquisition of the EMT phenotype in MCF7 breast cancer cells is associated with attenuation in the formation of CTL-mediated immunologic synapse, increased autophagy and resistance to immune cells. Silencing of Beclin1 and inhibition of the autophagic machinery restore susceptibility to T-cell cytotoxicity, suggesting that autophagy has a relevant function in helping EMT cancer cells to overcome the hostility of immune system during spreading (17).

Autophagy and EMT: an intricate interplay in cancer

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a biological process that allows epithelial cells to transiently assume mesenchymal features by undergoing profound molecular and biochemical changes. As a consequence of this process, epithelial cells shed their differentiated characteristics, including cell-cell adhesion, polarity and lack of motility to acquire more immature features, including high cellular plasticity, motility, invasiveness and resistance to apoptosis. EMT is the leading process of metastasis during cancer progression since it confers to cancer cells the ability to move from the original site to colonize adjacent or distant sites (18).

While autophagy is primarily a metabolic process, EMT can be considered a morphological reprogramming of the cellular architecture, which is guided by changes in the interaction properties of the cells with the surrounding microenvironment and is supported by a profound reorganization of cell cytoskeleton. For this functional diversity, autophagy and EMT have been regarded for long time as too distant to be connected. However, recent observations indicate that these two important processes in cancer are linked by an intricate relationship. Several works reported a direct effect of autophagy on EMT regulation in cancer cells.

In accordance with its dual role in cancer, the effect of autophagy on EMT appears intricate and likely dependent on the cellular type and/or on stage of tumor progression (6).

For its effect of improving resistance to unfavorable conditions, autophagy represents a powerful survival strategy for cells that are exposed to cell-intrinsic or environmental stressful stimuli. Indeed, several works show that defects in the autophagic machinery restrain cancer dissemination and metastasis. During EMT and metastatic spreading, reorganization of the interaction properties and loss of adhesion with the extracellular matrix leave cells without an effective anchorage and induce the activation of cell death pathways exposing cancer cells to potent demise stimuli. Autophagy induces resistance to cell death, providing a survival strategy for cells that are spreading outside the tumor mass. Fung and colleagues show that RNA interference-mediated suppression of autophagic factors inhibits

detachment-induced autophagy and enhances apoptosis in non-tumoral and primary mammary epithelial cells (19). In accordance with these observations, it has been recently reported that induction of autophagy is required for metastasization of several types of cancer in mice models. A number of additional evidence indicates that autophagy acts to prevent EMT and that the activation of the autophagic machinery may determine reversion of the EMT phenotype in cancer cells. Activation of the autophagic process leads to reduced stability and consequent down-regulation of SNAIL and SLUG, two of the major transcription factors implicated in the EMT process. This change in the transcriptional program determines the re-expression of adhesion molecules and reversion of the EMT phenotype. We recently identified CDH6 as a master regulator of the interplay between EMT and autophagy. Cadherin 6 (CDH6), a TGFβ-target gene in the EMT process, is a major switch of the transition from the epithelial to the mesenchymal phenotype and a marker of metastatic potential in thyroid cancer. We recently identified GABARAP, a protein necessary to autophagic initiation, as interactor of the cytoplasmic domain of CDH6. We showed that CDH6 silencing reverts the EMT phenotype by reducing proliferation and migration of thyroid cancer cells. The effect of CDH6 silencing is accompanied by induction of autophagy and alteration of mitochondrial dynamics (20).

The negative effect of autophagy on the acquisition of the EMT phenotype is also supported by the observation that lysosomal dysfunction leads to enhanced EMT, deficiency of the autophagic flux and results in decreased expression of epithelial markers and increased expression of mesenchymal protein (21).

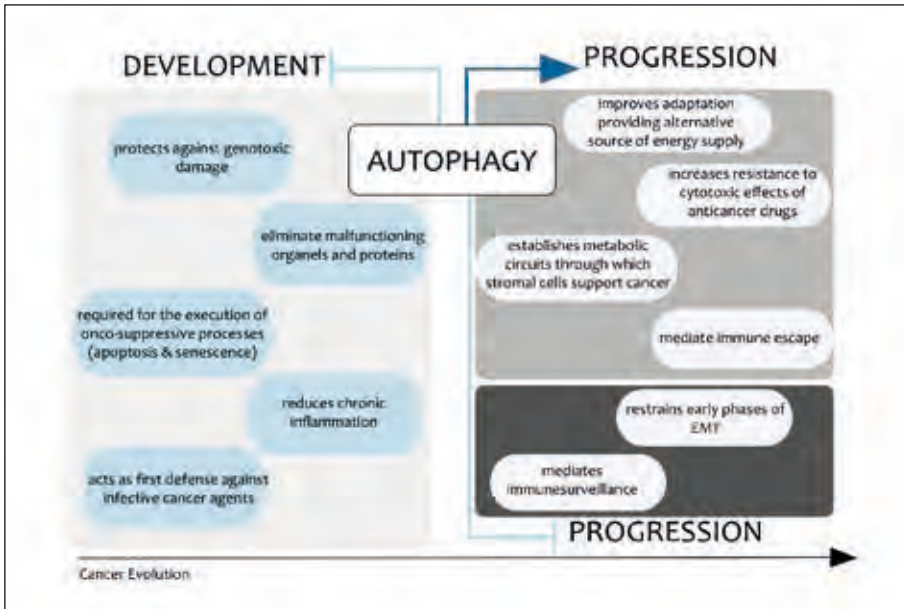


Fig. 1

Targeting autophagy in cancer

During the past decades, the growing body of evidences highlighting the relevance of autophagy in supporting cancer progression has nurtured the hypothesis that targeting autophagy could work as effective anti-cancer strategy. However, the functional complexity played by autophagy in cancer prevented so far a definitive conclusion on the effectiveness of these strategies. Moreover, whether therapeutic approaches in patients with cancer should aim to inhibit or activate autophagy remain controversial (22).

Autophagy operates as a cell-intrinsic mechanism to maintain cancer cell homeostasis providing survival support in adverse condition. Thus, inhibiting autophagy should result in anti-cancer effects and improved efficacy of chemotherapy and or radiation.

Indeed, experimental data from different mice models showed that single-agent pharmacological inhibition of autophagy can inhibit tumor growth. Furthermore, a combination of autophagy inhibitors (like cloroquine or hidrocloroquine) with a number of standard or targeted anti-cancer drugs in the same models showed significant improvement of the effectiveness of these drugs (23). However, clinical trials in which autophagy inhibitors were employed as single agents or in combination with standard chemotherapy regimens results were disappointing. When used as stand-alone therapy autophagy inhibition had negligible effects while, when used in combination, only a very limited number of patients showed improved response. The reason of this failure is still unclear and strongly debated. A large part of it may be likely attributed to the controversial and complex role of autophagy in cancer. Beside affecting the homeostasis of cancer cells, autophagy also affects cancer microenvironment and influences immune system and its ability to counteract cancer. Thus, if data gathered in the past 5 years challenge the idea that inhibition of autophagy should be considered as a strategy to treat cancer, increasing evidences indicate that activation of autophagy improve efficacy of multiple anticancer regimens, especially in the presence of a functional immune system. Genetic ablation of autophagy-crucial genes, like Atg5 and Atg7 have been shown to compromise response to several anti-cancer drugs and to radiation (24). Starvation causes drop of energetic intake and is a potent pro-autophagic stimuli. A single 48 hours fasting episode has a beneficial effect on survival of immunocompetent mice bearing metastatic tumors and improves response to combination therapy in syngeneic immunocompetent mouse models.

Alternate-day feeding regimens as well as 30% reduction in daily calories intake, both of which are associated with dramatic weight loss, improve the effectiveness of local radiation in immunocompetent mice.

The positive effects of starvation and other forms of calories reduction on therapy response have been associated with reduced levels of IGF1, a growth factor that sustains cancer cells. This restriction would exacerbate the cytotoxic effect of therapies. Indeed, inhibition of the IGF1 Receptor signaling has been shown to be crucial in mediating the positive effect of starvation on therapy response (25). While severe starvation may be difficult to persecute in advanced cancer patients

affected by cachexia, short term fasting or the employment of calories reducing pharmacological approaches, which is usually not associated with profound weight loss, can be effective and safe strategies to pursue autophagy activation in cancer patients. Indeed, data from a pilot study evaluating the safety of short-term fasting in HER2- breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy have been shown to reduce the hematological toxicity of chemotherapy (26).

Conclusion

Autophagy is a versatile and multifunctional catabolic process that targets to degradation many cellular components. In cancer, autophagy plays multiple and often contradictory functions. While we have come a long way in the understanding of the relevance of this process in cancer, we still have to fully define the implication of this interplay. In particular, we need to decipher the multiple and intricate networks of molecular mechanisms that control the activation and mediate the downstream effects of autophagy in cancer. The balance between selective and unselective autophagy is likely a major determinant in this context.

References

1. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 713-720.
2. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010; 40: 280-293.
3. Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H. Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res* 2000; 60: 6201-6207.
4. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 961-967.
5. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 38-47.
6. Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, Gandolfi G, Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death and Disease* 2016; 7: e2520.
7. Galluzzi L, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015; 34: 856-880.
8. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999; 402: 672-676.
9. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 15077-15082.
10. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med.* 2011; 208: 455-467.

11. M. Chiara Maiuri, Einat Zalcvar, Adi Kimchi & Guido Kroemer. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8, 741-752.
12. Vargas J, Feltes BC, Poloni Jde F, Lenz G, Bonatto D. Senescence; an endogenous anticancer mechanism. *Front Biosci*. 2012; 17: 2616-2643.
13. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy*. 2013; 9: 808-812.
14. Vojo Deretic, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira. Autophagy in infection, inflammation and immunity *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13: 722-737.
15. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011; 469: 221-225.
16. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*. 2013; 39: 211-227.
17. Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, André F, De Cremoux P, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res*. 2013; 73: 2418-2427.
18. Kalluri R EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009; 119: 1417-1419.
19. Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell*. 2008; 19: 797-806.
20. Gugnoni M, Sancisi V, Gandolfi G, Manzotti G, Ragazzi M, Giordano D, et al. Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy. *Oncogene*. 2016; doi:10.1038/onc.2016.237.
21. Li G, Li CX, Xia M, Ritter JK, Gehr TW, Boini K, Li PL. Enhanced epithelial-to-mesenchymal transition associated with lysosome dysfunction in podocytes: role of p62/Sequestosome 1 as a signaling hub. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 35: 1773-1786.
22. Galluzzi L, Bravo-S. pedro JM, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 doi:10.1038/nrclinonc.2016.183.
23. Yang, A. et al. Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov*. 2014; 4: 905-913.
24. Ko A, et al. Autophagy inhibition radiosensitizes *in vitro*, yet reduces radio-responses *in vivo* due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ*. 2014; 21: 92-99.
25. Pietrocola F, et al. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell*. 2016; 30: 147-160.
26. de Groot S, et al. The effects of short-term fasting on tolerance to (neo) adjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients: a randomized pilot study. *BMC Cancer*. 2015; 15: 652.

To survive or to die: the eternal dilemma of the “autophagic cell”

Sergio Comincini

Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an evolutionarily conserved vacuolar and molecular pathway for the degradation of long-lived proteins, functionally damaged organelles and protein aggregates, fundamental for the homeostatic anabolic/catabolic balance of the functionality of the cell. The discovery of the autophagy-related genes (*ATGs*) recently awarded with the Medicine Nobel Prize, has provided key information about the formation of the specific autophagic vesicles (autophagosomes), and about the role of autophagy in allowing cells to survive during nutrient depletion and/or in the absence of growth factors. In fact, one of the main function of autophagy is the maintenance of cell survival when modifications occur in the cellular environment. However, a considerable body of literature reports that autophagy is also a cell death mechanism that can occur either in the absence of detectable signs of apoptosis (via autophagic cell death) or concomitantly with apoptosis. Accordingly, the interest in autophagy has been raised by the fact that manipulation of this process holds great promise for improving treatment of different pathologies, in scenarios where cells have to be killed (e.g. cancer) and diseases where cells need to acquire additional mechanisms of survival (e.g. neurodegenerative disease).

Autophagy involvement in death processes

Autophagic cell death or type-II programmed cell death is distinct from apoptosis, or type-I programmed cell death. However, the relationship between autophagy and apoptosis is actually probably more complex, because autophagy is not only able to collaborate with apoptosis to produce cell death but, as discussed in a next section, it can also act as a survival mechanism.

Despite the growing number of scientific reports associating autophagy to cell death fate, the critical problem in understanding how autophagy modulates and is regulated by cell death mechanisms is to understand how the sequestration and degradation of cellular components in autophagosomes and next in autolysosomes affects death pathways or, *vice versa* how these pathways, mainly apoptotic-dependent or independent-, may influence autophagy (1).

Mammalian cell death occurs by different mechanisms some of which are clearly programmed or “suicide” while others seem to be indirect or accidental; however, the borderline dividing these behavior is clearly not well defined as stated above (2).

The first link between autophagic and cell death was based on the evidences that cell death is often accompanied by high levels of autophagosomes and with molecular and cellular features of active autophagy status. However, this doesn't necessarily implicate a causal relationship between the autophagy and cell death. Indeed, high levels of autophagy could be an indication that the cell is attempting to survive by inducing autophagy and that it is only when this effort fails, that death occurs.

Different studies have documented that one situation where autophagy may cause cell death is in when the cell has no ability to activate canonical apoptosis, which is usually the preferred mechanism of death. For instance, in BAX and BAK double knockout mice, two main proteins that regulate the release of mitochondrial proteins during apoptosis, cells are defective in apoptosis and but they are extremely sensitive to stimuli such as DNA damaging agents, undergoing a non-apoptotic death (3). At a deeper molecular level, this activated death pathway was dependent on autophagy regulators Atg5 and Beclin-1 and knockdown of these genes was sufficient to provide long term protection to the cells after treatment with death stimuli. This implies that in the absence of apoptosis, the DNA damage activates autophagy that kills the cells (3). Similarly, pharmacological inhibition of caspases induced a non-apoptotic but autophagic death in human fibroblasts (4), through the autophagic degradation of catalase that ultimately led to increased reactive cytotoxic oxygen species (5).

Furthermore, the autophagy process is also able to promote cell death under normal physiological situations. For instance, during *Drosophila* oogenesis, autophagy controls developmental cell death by selectively degrading the protein dBruce, a negative regulator of caspase activation, stimulating higher levels of apoptosis (6).

To enhance the complexity of the dissection of the autophagy process, autophagosomes per se can induce apoptosis by serving as a platform upon which caspases (specifically caspase-8) can be activated. This death activation cascade does not necessarily require any actual degradation of autophagosome cargo and so may not indicate a need for autophagic flux in order to get induction of apoptosis and cell death (7).

Autophagy as a survival lifebelt

Although autophagy has been widely associated to a death mechanism, the current consensus is that autophagy's role is instead primarily protective or pro-survival (8, 9).

In principle all eukaryotic cells are able to carry out autophagy; however, their autophagic capacity varies. It has long been assumed that autophagy is a nonspecific process, in which cytoplasmic structures and macromolecules are randomly

sequestered in order to generate recyclable molecules (e.g. amino acids) that are essential for cell survival in different environmental conditions. However, this concept probably reflected the fact that substrate recognition had not been studied in great detail and, on the other hand, it is emerging that autophagy can be very specific under certain conditions (10).

Autophagy has been reported to protect against a plethora of different physical and chemical treatments. In oncology, for example, a multitude of different chemotherapeutic agents have been reported to increase their efficacy by means of autophagy inhibition (11). Since these agents are effective using different mechanisms (e.g. DNA damage, interference with metabolic pathways, inhibition of steroid receptors, disruption of cytoskeleton, interference with growth promoting kinase pathways, activation of cell surface death receptor signaling, inhibition of the proteasome etc.), it is unlikely that autophagy could always be effective simply by removing a toxic stimulus, as in the case of aggregated proteins in neurodegenerative disease. Differently, the large spectrum of induced damages suggested that the synergic effect of autophagy inhibition would be directed to promote the apoptotic machinery therefore resulting in a death process for the malignant cell (1). The conclusion that autophagy protects against death, and therefore assumes a pro-survival function, is based on experiments where autophagy is blocked either pharmacologically or genetically. To date, the most common pharmacological inhibitor that has been employed is chloroquine, affecting the lysosome fusion with autophagosome, therefore acting on the final step of the autophagy process (12). However, the results of different studies using such inhibitors might also take in account that these drugs are well known to be non-specific and the function of lysosomes is not exclusive in support of the autophagy process. According to this criticism, it was also demonstrated that chloroquine can sensitize cancer cells to anti-cancer drugs in an autophagy-independent manner (13).

In addition, autophagy regulatory and executor *Atg* genes can also affect other processes, especially apoptosis. In fact it was reported that Atg7 protein, involved in the maturation of the autophagosome, interacts with and regulate p53 function (14): similarly, Atg12 can regulate apoptosis by two quite separate autophagy-independent mechanisms (15) and, Atg5 modulates apoptosis independently of autophagy (16). In addition, another gene involved in autophagosome formation, i.e. UV radiation resistance-associated gene (UVRAG) (17) can also regulates BAX activation at the mitochondrial membrane to induce the activation of the intrinsic apoptosis pathway (18). Conversely, well known apoptosis regulators also control autophagy. This is particularly evident for members of the BCL family of proteins. Anti-apoptotic BCL-2 and BCL-xL proteins do not just regulate apoptosis; they also inhibit autophagy (19). Particularly, the core autophagy regulator Beclin 1 has a BH3 domain also conserved within BCL family (20). Moreover, many BH3-only proteins that work in concert with BCL-2, BCL-xL and BAX and BAK to regulate mitochondrial permeability can modulate the autophagy process (21). A specific and physiological condition where a pro-survival modality of autophagy is activated is when nutrients are deficient, a condition defined as “energy starvation”. In general, when cells lack essential nutrients, autophagy is activated

to supply the missing metabolic components. Remarkably, in the mammalian liver following a dietary starvation, autophagy is induced to produce amino acids used to primarily meet the energy requirements of the brain and erythrocytes. Even in muscle tissue, although not as active as in hepatocytes, autophagy is upregulated to produce extra energetic supplements (22, 23).

Furthermore, in a peculiar developmental context, it was reported that in neonates mice the interruption of the supply of nutrients via the placenta was temporary adjusted by an a transient upregulation of autophagy, not only in the liver, but also in many other tissues (22).

Another context where autophagy is required to provide metabolites to the cells is that of cancer. Although suppression of autophagy may contribute to the initial rapid growth of tumors, due to a proliferation burst, in more malignant stages of cancer autophagy may be required to provide essential nutrients to the cells in the inner part of a solid tumor that do not have direct access to the circulation (24). In these contexts, autophagy can prevent cells from undergoing apoptosis by maintaining an adequate intracellular supply of substrates despite nutrient depletion or when the uptake of extracellular nutrients is inhibited by a lack of growth factor (25, 26).

In the complex and variable tumor microenvironment, autophagy can absolve dual roles, acting as both a tumor suppressor by preventing the accumulation of damaged proteins and organelles and as a mechanism of cell survival that can promote the growth of established tumor (27).

In the first scenario, autophagy acts primarily as a tumor suppression mechanism by removing damaged organelles and misfolded or toxic proteins, also reducing cell growth rate and possible related genomic instability (28). Originally, *Beclin 1*^{+/-} mice were shown to be tumor inducible, demonstrating that Beclin 1 gene, coding for a protein involved in autophagy induction, is a haplo-insufficient tumor suppressor gene (29). In contrast, Beclin 1 overexpression can inhibit tumor development (30). A potential molecular link between defective autophagy and tumorigenesis involves the accumulation of p62/SQSTM 1 protein aggregates that, together with the release of not functional mitochondria, originated the production of reactive oxygen species (ROS). ROS, in turn produces DNA damage that can lead to chromosomal instability, one of the main typical hallmarks of cancer. As a proof of this molecular concept, silencing of p62/SQSTM 1 in autophagy-defective cells prevented ROS and the DNA damage accumulation (28). The functional relationship between loss of autophagy with tumorigenesis was also reported in an elegant study where p62/SQSTM 1^{-/-} mice resulted resistant to the *Ras*-mediated induced lung carcinomas compared to untreated controls (31). Autophagy may also protect against tumorigenesis by limiting necrosis and chronic inflammation, which are associated with the release of proinflammatory HMGB1 (32). These molecular interplay in the described biological contexts, as many others described in the literature, pointed for a specific role for autophagy in tumor suppression.

Different studies suggested that the predominant role of autophagy in cancer cells is to confer stress tolerance, which serves ultimately to guarantee tumor

cell proliferation and its overall success (33). It is also well established in different *in vitro* and *in vivo* cancer models that the genetic or pharmacological suppression of essential autophagy genes has been shown to activate or potentiate the induction of cell death processes (34). This behavior is mainly associated with the high metabolic demands due to increased cellular proliferation of cancer cells (30).

On the other hand, cytotoxic and metabolic stresses, such as hypoxia and nutrient deprivation, can activate autophagy for supply energy request and to finally sustain cell survival under stressful conditions. In particular, it has been reported that autophagy is activated in hypoxic tumor cell subpopulations relatively distal to blood vessels circulatory torrent, regardless of HIF-1 α - activation. HIF-1 α can also increase the expression of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and nitric oxide synthase, all of them relevant for tumorigenesis (35).

Importantly from a therapeutic point of view, cancer cells resistant to chemotherapy and/or radiation schemes, often display an activation of autophagy process that may contribute to tumor recurrence and progression (36). Furthermore, inhibition of autophagy in tumor cells has been shown to enhance the efficacy of several anticancer drugs, supporting the general role of autophagy in cytoprotection within the tumor environment.

Another context where autophagy is involved is aging. Aging is the complex result deriving from the gradual decline in cellular repair and housekeeping mechanisms, which leads to an accumulation of damaged cellular and molecular constituents and as final irreversible steps to the degeneration of entire tissues and organs. Importantly, the cell's capacity for autophagic degradation also declines with age, and this in itself may contribute to the aging process (37).

Genes controlling metabolic functions have been shown to influence aging in multiple model organisms including *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and many mouse models. In the nematode *C. elegans*, the *age-1* gene encoding phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (38), and the *daf-2* gene encoding the insulin/IGF-1-like receptor (39) were found to significantly extend the lifespan. In the search for novel regulators of longevity in *C. elegans* many of them were related to endocrine and metabolic signaling pathways. Noticeably, the most effective longevity-associated pathways resulted associated with the insulin/IGF-1 and TOR signaling cascades, which play critical roles in nutrient sensing and metabolism.

TOR is a conserved member of the PI3K-related kinase family, and its nutrient-dependent sensor capability can shift towards cell growth or blockage. In particular, TOR can be considered the main negative regulator of the autophagy process: hence, TOR inhibitors generally promote autophagy. The protein TOR was experimentally identified as the cellular target of rapamycin (in mammals, mTOR=mammalian target of rapamycin) (40), a drug isolated in a soil bacterium (41). TOR exists in two complexes, TORC1 and TORC2, which mediate distinct functions by signaling through different effector pathways. TORC1, which is inhibited by rapamycin, integrates nutrient-derived and mitogenic signals to regu-

late cell proliferation and cell size. In contrast, TORC2 is unaffected by rapamycin and controls cell morphology (40).

TORC1 (hereafter referred to as TOR) signaling has been shown to influence aging in many organisms. Reduced TOR activity extends lifespan in yeast, worms, flies, and mice (42). Two processes regulated by TOR have been strongly linked to longevity. The first is protein synthesis regulated by the ribosomal protein S6 kinase (S6K), a downstream target of TOR. S6K inhibition reduces protein synthesis and has been shown to extend lifespan in yeast, worms, flies, and female mice (43). The second TOR-regulated process involved in lifespan extension is the cellular recycling process of autophagy.

From analogous studies in higher organisms, evidence is mounting that aging and autophagy are also linked in mammals, in agreement with the results reported in invertebrate model organisms. Of note, autophagy function has been shown to decrease with age in rodent livers (44) and autophagic activity decreases with age in hypothalamic neurons in mice (45).

Related to aging, neurodegenerative disease is ultimately caused by neurons dying, therefore autophagy might in principle prevent neurons from dying. In addition, it is important to mark that the rate of neurological degeneration, and therefore dysfunction, increases with age. One of the hallmarks of neurodegenerative diseases is the accumulation of aggregated proteins. For example, in Alzheimer's disease (AD), tau fibrillary tangles and amyloid beta ($A\beta$) plaques are caused by an accumulation of not catabolizable tau and $A\beta$ proteins, while α -synuclein protein originates Lewy bodies in Parkinson's disease (PD), and polyQ expansion in specific proteins causes protein aggregation in Huntington's disease (HD) (46). Preclinical studies, using well established *in vitro* and *in vivo* models, documented that autophagy activation can effectively contribute to a cellular proper turnover of these complex protein aggregates (47-49). Moreover, induction of autophagy by TOR-dependent and -independent mechanisms in mammalian cell culture and mouse models can reduce the toxicity of proteins and prevent irreversible aggregation processes (50, 51). As a confirmation of a functional role of autophagy in these protein-accumulation diseases, Beclin1 mRNA and protein levels are reduced in a mouse AD model in which neuronal populations are specifically affected by the AD pathology. In addition, overexpression of Beclin1 in this model reduces $A\beta$ accumulation (52). Importantly, Beclin 1, a protein with a key role in autophagy, was decreased in affected brain regions of patients with AD early in the disease (52); in addition, elevated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling has been found in AD patients and is linked to diabetes and aging, two known risk factors for AD. Genetically reducing mTOR signaling in the brains of transgenic mice, reduced amyloid- β deposits and rescued memory deficits. Mechanistically, the reduction in mTOR signaling led to an increase in autophagy induction and restored the hippocampal gene expression signature (53).

Autophagy has also been investigated in a peculiar neurodegenerative disease, involving uniquely defined biological entities named prions, raising fatal disorders linked to the misfolding of native cellular PrP^C into the disease-associated form

PrP^{Sc} that accumulates in the brain as disease progresses, thus producing the typical spongiform histopathological hallmark (54).

The appearance of multi-vesicular bodies and autophagic vacuoles in both prion-infected, neuronal cells in culture and in brain biopsies from prion-infected patients suggested a protective role in the disease (55, 56).

Accordingly, increasing evidence indicates that autophagy has a crucial ability of eliminating pathological PrP^{Sc} accumulated within neurons. In contrast, autophagy dysfunction in affected neurons may contribute to the formation of spongiform changes. Thus, different therapeutic strategies (i.e. lithium, rapamycin, Sirtuin 1 and resveratrol) are currently investigated to mitigate the neurotoxic effects of prions on brain function (57). Alternatively, it was proposed that autophagy may contribute to the spongiform changes that are a pathological hallmark of prion-affected brains, and may be activated by apoptosis (58). Despite the increase in autophagic flux, other contributions observed that PrP^{Sc} was mostly absent from autophagic vesicles, even when lysosomal degradation was impaired. This raised the possibility that PrP^{Sc} was not processed by the autophagic machinery (59, 60).

The variability of these conclusions, documented the still not deciphered complexity of the role of autophagy in prion diseases (61) and that prions may also represent a special case and may require different pharmacological interventions than other proteinopathies (62).

Conclusions

There remain specific challenges to our understanding of autophagy particularly in mammalian cells, including how the cell is able to direct a typical physiological process of recycling into a death executory death fate, and in this shift how are orchestrated the other death programs like apoptosis. On the other hand, the significance of defects in autophagy for disease and ageing is enforced from growing evidence linking mutation or loss of function of key autophagy genes in cancer, neuropathies, heart disease, auto-immune disease and other conditions. From the perspective of a cancer biologist, it remains to be establish in every context examined whether autophagy is tumor suppressive or oncogenic. In other diseases, particularly in neurodegenerative ones, autophagy is widely accepted as beneficial given its role in eliminating toxic protein aggregates and promoting cell viability. Finally, due to its ubiquity presence in the different cited contexts, autophagy has emerged as a new and potent modulator of disease progression that is both scientifically intriguing and clinically relevant.

Bibliografia

1. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. *Essays Biochem.* 2013; 55: 105-117.
2. Green DR, Victor B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? *Trends Cell Biol.* 2012; 22: 555-556.

3. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell. Biol.* 2004; 6: 1221-1228.
4. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science.* 2004; 304: 1500-1502.
5. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 4952-4957.
6. Nezis IP, Shrivage BV, Sagona AP, Lamark T, Bjørkøy G, Johansen T, Rusten TE, Brech A, Baehrecke EH, Stenmark H. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell. Biol.* 2010; 190: 523-531.
7. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu C-D, Zhang J, Kester M, Wang H-G. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular deathinducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 12455-12468.
8. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2679-2688.
9. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008; 9: 1004-1010.
10. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 1509-1518.
11. Levy JM, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol. Ther.* 2011; 131: 130-141.
12. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73: 985-1001.
13. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy.* 2012; 8: 200-212.
14. Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJR, Motoyama N, Cao L, Finkel T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science.* 2012; 336: 225-228.
15. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell.* 2011; 44: 698-709.
16. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 1124-1132.
17. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 688-698.
18. Yin X, Cao L, Kang R, Yang M, Wang Z, Peng Y, Tan Y, Liu L, Xie M, Zhao Y, Livesey KM, Tang D. UV irradiation resistance-associated gene suppresses apoptosis by interfering with BAX activation. *EMBO Rep.* 2011; 12: 727-734.
19. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M,

- Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122: 927-939.
20. Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 13123-13132.
 21. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SWG, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell*. 2011; 44: 517-531.
 22. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T and Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036.
 23. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T and Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell*. 2004; 15: 1101-1111.
 24. Ogier-Denis E and Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer? *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1603: 113-128.
 25. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P and Kroemer J. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 1025-1040.
 26. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005; 120: 237-248.
 27. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 2011; 10: 1533-1541.
 28. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137: 1062-1075.
 29. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1809-1820.
 30. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999; 402: 672-676.
 31. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2008; 13: 343-354.
 32. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell. Biol.* 2010; 190: 881-892.
 33. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006; 10: 51-64.
 34. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 5308-5316.

35. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010; 20: 51-56.
36. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 3917-3929.
37. Gelino S, Hansen M. Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism. *J. Clin. Exp. Pathol.* 2012; (Suppl. 4): pii: 006.
38. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics.* 1988; 118: 75-86.
39. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 1993; 366: 461-464.
40. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994; 369: 756-758.
41. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot (Tokyo).* 1975; 28: 721-726.
42. Hansen, M.; Kapahi, P. TOR Signaling and Aging. In: Hall, MN.; Tamanoi, F., editors. *The Enzymes.* Burlington: Academic Press. 2010; 279-299.
43. Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, et al. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell. Metab.* 2010; 11: 453-465.
44. Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G, Masini M, et al. The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 1999; 54: B318-B323.
45. Kaushik S, Arias E, Kwon H, Lopez NM, Athonvarangkul D, et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Rep.* 2012; 13: 258-265.
46. Braak H, Del Tredici K. Potential Pathways of Abnormal Tau and α -Synuclein Dissemination in Sporadic Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016; 8: pii: a023630.
47. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 2004; 36: 585-595.
48. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature.* 2007; 447: 859-863.
49. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15: 433-442.
50. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell. Biol.* 2005; 170: 1101-1111.

51. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alphasynuclein. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 5641-5652.
52. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2190-2199.
53. Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, Barc-Pain S, Perault-Pochat MC, Gil R, Pradier L, Hugon J. mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2005; 94: 215-225.
54. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 13363-13383.
55. Sikorska B, Liberski PP, Giraud P, Kopp N, Brown P. Autophagy is a part of ultra- structural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004; 36: 2563-2573.
56. Liberski PP, Brown DR, Sikorska B, Caughey B, Brown P. Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol.* 2008; 46: 1-25.
57. Yao H, Zhao D, Khan SH, Yang L. Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013; 45: 494-502.
58. Marzo L, Marijanovic Z, Browman D, Chamoun Z, Caputo A, Zurzolo C. 4-hydroxytamoxifen leads to PrPSc clearance by conveying both PrPC and PrPSc to lysosomes independently of autophagy. *J. Cell. Sci.* 2013; 126: 1345-1354.
59. Mitra S, Tsvetkov AS, Finkbeiner S. Protein turnover and inclusion body formation. *Autophagy.* 2009; 5: 1037-1038.
60. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* 2012; 44: 89-98.
61. Heiseke A, Aguib Y, Schatzl HM. Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2010; 12: 87-97.
62. Browman D, Zurzolo C. Not on the menu: autophagy-independent clearance of prions. *Prion.* 2013; 7: 286-290.

Druggability of autophagy

Stefano Govoni, Marialaura Amadio, Alessia Pascale

Department of Drug Sciences, Section of Pharmacology, University of Pavia

Autophagy is an evolutionary conserved catabolic process that facilitates nutrient turnover and plays a role in the quality control of the cytoplasm by removing protein aggregates, damaged organelles (i.e. defective mitochondria) and intracellular pathogens (bacteria and viruses).

In mammalian cells, the most investigated mechanism for autophagy induction occurs through inhibition of the mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine/threonine kinase, along with the suppression of mTOR complex 1 (mTORC1). This inhibition allows the phosphorylation of Beclin 1 (BECN1) protein by the ULK (UNC51-like kinase 1) complex and finally the formation of a “crescent-shaped” phagophore. Nucleation of the phagophore is thought to occur following phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) generation of phosphatidylinositol 3-phosphate signaling molecules; while its membrane elongation is regulated by the ATG12-ATG5-ATG16L1 complex and the LC3 proteins. The expanding phagophore membrane incorporates *de novo* synthesized lipids and lipidated proteins, and possibly also existing membranes (i.e. from endoplasmic reticulum, Golgi), originating a double-membrane vesicle, the autophagosome, which encloses the autophagic substrates for sequestration. Then, the autophagosome fuses with lysosomes, rich of acid hydrolases and protons, to form an autolysosome where the autophagosome inner components are degraded (1).

Rationale for targeting autophagy alterations

Autophagy is an essential pathway for the organism survival since it maintains cellular homeostasis and acts as a major cytoprotective mechanism upon different stress conditions, such as starvation, amino acid depletion, hypoxia, cell overcrowding, oxidative stress, pathogens insult. Therefore, it is not surprising that alterations within the autophagy process can contribute to a variety of pathologies (2, 3); hereafter and in Box 1 some examples are briefly illustrated.

Several reports describe the accumulation of autophagosomes in the brains of patients and model organisms with various neurodegenerative disorders; moreover, mice lacking ATG7 or ATG5 show symptoms of neurodegeneration in the central

nervous system. Specifically, proteinopathies are late-onset neurodegenerative diseases characterized by the accumulation of protein aggregates, and autophagy has been documented to be crucial for the clearance of those cytosolic aggregate-prone proteins underlying the symptoms of such pathologies. For example, Alzheimer's disease (AD) is linked to an altered autophagy due to disrupted autolysosomal proteolysis that produces an accumulation of autophagosomes. This inhibition has been shown to exacerbate the accumulation of beta-amyloid peptides in AD mouse models (1). Parkinson's disease (PD) is accompanied by the intracellular accumulation of mutant α -synuclein protein, and its elevated levels hinder autophagosome formation both in fruit fly and in cell culture, due to mislocalization of ATG9 (2). As a surveillance mechanism, autophagy contributes to the maintenance of cellular homeostasis in pancreatic β -cells. Consistently, ATG7 deletion leads to diabetes-like symptoms in mice. Furthermore, in a mouse model of diabetic cardiomyopathy, a significantly reduced 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) activity was found, resulting in decreased autophagy and cardiac dysfunction (2).

Under physiological conditions, autophagy participates to the maintenance of normal cardiovascular function; however, it plays a dual role during ischemia/reperfusion. In fact, during ischemia it protects tissues by removing damaged mitochondria and providing metabolic precursors upon low nutrient levels, while during reperfusion its activation may be detrimental. A similar controversial role of autophagy has been described in heart failure, where excessive autophagy may exacerbate the symptoms of cardiac hypertrophy and heart failure (2).

The role of autophagy in cancer is complex, since autophagy is considered to possess a tumor-suppressive function in healthy cells, but to promote malignancy or drug-resistance in tumor cells. Indeed, in healthy cells, it inhibits tumorigenesis, for example through degradation of mutagenic compounds thus preventing DNA damage and genetic instability; however, during advanced stages of tumor progression, autophagy can provide nutrients to cancer cells highly dividing or localized within poorly vascularized tumors. Within this context, several point mutations of mTOR have been identified in a variety of human cancers, some of them resulting in a constitutive kinase activation and, as a consequence, in inhibition of autophagy (4).

Moreover, loss of BECN1 favors tumorigenesis in mice, thus pointing at BECN1 as a tumor suppressor (1). Furthermore, several well-known tumor suppressor proteins (i.e. PTEN and LKB1) operate as positive regulators of autophagy (2). On the other hand, autophagy can also modify the prognosis of certain chemotherapy regimens by facilitating tumor cell survival and metastasis, preventing apoptosis and promoting drug resistance (1). Accordingly, in biopsy samples from metastatic melanoma patients, high indices of autophagy were suggested as prognostic for chemotherapy resistance, invasiveness, and duration of survival (5). Some pharmacological modulators of autophagy currently in clinical trials for cancer treatment are reported in Table 1 that witness a rather intense area of investigation. Finally, it should be mentioned the role of autophagy dysregulation in macular degeneration (see Box 1).

Tab. 1 - Some “old” and new pharmacological modulators of autophagy currently in clinical trials for cancer treatment. For further details, see Morel (3).

Drug	Effect on autophagy	Class/mechanism of action	Targeted phase of autophagy	Clinical trial phase
Sirolimus, everolimus, temsirolimus, AZD8055	↑	mTOR inhibitor	Initiation	I-II
Perifosine, triciribine, NVP BEZ235, PF-04691502, CAL-101, GDC-0941, GDC-0068, MK-2206, LY294002,	↑	PI3K inhibitor	Initiation	I-II-III
Metformin, resveratrol, enzalutamide	↑	AMPK activator	Initiation	II
Lithium	↑	Depletion of free inositol, decrease of IP3 levels, increase of BCN levels	Initiation	I
Nicardipine	↑	Ca ²⁺ channel antagonist	Initiation	I
Verteporfin	↓	Interference with LC3-interacting region motifs	Recruitment of cargoes	III
Chloroquine, hydroxychloroquine	↓	Inhibitor of autophagosome and lysosome fusion	Autophagosome maturation	I-II-III
Vinblastine	↓	Disruptor of microtubules	Autophagosome maturation	II
Lucanthone	↓	Disruptor of lysosomal membrane	Lysosomal degradation	II

Potential drugs targeting the autophagic pathway

The awareness and growing knowledge on the contribution of autophagy to diseases has stimulated the development of pharmacological approaches aimed to enhance or inhibit this pathway; although only some examples are reported in this paragraph, the reader can find more details in some recent comprehensive reviews (3, 6). Within this general context, an interesting strategy is represented by drug re-positioning, that is the use of “conventional”/known agents to treat new indications. Indeed, this therapeutic approach has attracted growing attention since the “old” drugs are less expensive and their safety profiles are well known.

Pharmacological inducers

The activation of autophagy via mTORC1 inhibitors (i.e. rapamycin and its analog CCI-779) has been shown to prevent neurodegeneration in *Drosophila* and in mouse models of Huntington’s disease (HD). Other rapamycin analogs (RAD001 and AP23573) successfully attenuate medical symptoms in patients with different tumor types including sarcoma (7). In principle, a general issue that should be also taken into account is that most autophagy-modulating drugs likely affect other molecular cascades as well, and hence give rise to other biological events, and in some cases to unwanted side effects. For example, the above-mentioned rapamycin (Sirolimus) also represses protein translation and mitochondrial biogenesis, and acts as an immunosuppressant following long-term exposure (8).

The non-mammalian disaccharide trehalose has promise as a safe treatment for neurodegenerative diseases. For example, it has been reported to have a beneficial effect on the clearance of mutant α -synuclein associated with PD and to protect cells against apoptosis in a HD model (9).

As autophagy inducers, classic examples of drug re-positioning are lithium chloride (commonly used to treat bipolar disorders) and the mood stabilizers carbamazepine and valproic acid that promote autophagy by depleting inositol levels. Another example of drug re-positioning is metformin that lowers insulin resistance and constitutes a cornerstone in the treatment of diabetes mellitus type 2. Metformin acts inhibiting the complex 1 of the mitochondrial respiratory chain, driving a decreased synthesis of ATP and thus the activation of AMPK, producing as a consequence an inhibition of hepatic gluconeogenesis and lipogenesis, key factors for the treatment of type 2 diabetes (10). Metformin-mediated activation of AMPK also promotes autophagy, an effect that may be useful for cancer therapy. Specifically, in pancreatic cancer cells, metformin has been proposed to inhibit tumorigenesis via blocking of the mTOR signaling not only through AMPK-dependent but also through AMPK-independent pathways. Of interest, retrospective studies carry out in diabetic patients with several solid tumors, including pancreatic cancer, have documented a survival benefit following metformin with respect to insulin or sulfonylureas treatment (10). These data also suggest that metformin may contrast tumorigenesis at doses similar to those employed clinically for type 2 diabetes treatment. This last consideration is very important since, when translating research from bench to bedside, the dosage is a critical issue.

Pharmacological inhibitors

As previously mentioned, in some cases inhibition of autophagy is needed. Lysosomes are the final destination of the autophagy process, suggesting the lysosome as a key target for therapeutic intervention. In particular, lysosomotropic agents, because of their protonation, accumulate inside the lysosome and cause an increase in lysosomal pH. Chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) are lysosomotropic compounds that prevent autophagosome-lysosome fusion and degradation of their cargo. They are commonly used to treat malaria and autoimmune disorders (i.e. systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis) and are additional examples of drug re-positioning. Both CQ and HCQ have potential in cancer therapy, particularly in cases of chemotherapy resistance. Indeed, they both showed synergistic effects with certain anticancer drugs employed for melanoma, lung, breast, glioma, multiple myeloma, colorectal, kidney, and advanced/refractory solid tumors with limited side effects (see also Box 1) (11). Notably, the doses used in the different clinical trials are rather variable even if not very far from those employed for malaria prevention (6).

Azithromycin, a broad-spectrum antibacterial, in fibroblasts and human macrophages blocks autophagy by reducing acidification of autophagosomes and lysosomes. Of interest, azithromycin, together with clarithromycin and erythromycin, was recently found to sensitize to cytotoxic and pro-apoptotic effects of bortezomib, the first proteasome inhibitor anticancer drug, by blocking the au-

tophagic flux in myeloma cells (12), thereby suggesting a potential use for macrolides in oncology.

Overall, the reported data suggest that autophagy is a process that may be targeted using various drugs and either promoted or inhibited, that means that autophagy is a druggable process. However, several problems are still to be solved, among which the critical issue of tissue selectivity.

The possibility to target autophagy relies also on the development of techniques able to follow dynamically the process during the disease, to establish whether and at which stage to stop or to promote the process.

Box 1

Autophagy and AMD. In general, autophagy dysregulation has been related to physiological aging; increasing evidence suggest that autophagy impairment plays a role also in the pathogenesis of various elderly diseases, including Age-related Macular Degeneration (AMD) and other ocular pathologies.^{13,14} AMD is a severe neurodegenerative disease and a major cause of blindness among individuals over 65 years in developed Countries. One of the early triggering factors is the degeneration of retinal pigment epithelium (RPE), primarily responsible for photoreceptor homeostasis through phagocytosis of photoreceptor outer segments. In AMD, RPE shows increased susceptibility to oxidative stress, reduced mitochondrial activity, autophagy impairment, increased protein aggregation, higher levels of reactive oxygen species (ROS) and inflammation.¹⁵ Hallmarks of AMD are the detrimental accumulation of lipofuscin within RPE due to its incomplete lysosomal degradation, and the deposition of extracellular drusen containing lipids, carbohydrates, non-functional or toxic proteins (including lipofuscin itself), cellular debris, which are normally processed by autophagy. Lipofuscin accumulation, observed in early- and late-stage AMD, results in ROS generation and cell apoptosis. Increased protein aggregation in turn contributes to inflammation in a vicious, self-sustaining cycle. Accordingly, animals with knock-out in genes coding for proteins/factors essential for autophagy, inflammatory response, or ROS-scavenging, develop age-related RPE degeneration and other AMD features. Interestingly, sera of AMD subjects contain five autoantibodies all targeting macula proteins with a role in autophagy. Since autophagy flux is significantly reduced in retinal tissue from human donor AMD eyes and animal models of AMD, some autophagy-inducers have been suggested as therapeutics for the treatment of AMD and other ocular diseases. Also, the incidence of irreversible retinal toxicity as side effect should be considered when patients are treated with autophagy inhibitors like CQ or HCQ, that accumulate in the retina/RPE cells where they block autophagosome fusion and degradation.

Bibliografia

1. Petibone DM, Majeed W, Casciano DA. Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. *J Appl Toxicol.* 2017; 37: 23-37.
2. Lippai M, Szatmári Z. Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance. *Cell Biol Toxicol.* 2017;33(2):145-168.
3. Morel E, Mehrpour M, Botti J, et al. Autophagy: A Druggable Process. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017; 57: 375-398.

4. Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 2746-2752.
5. Ma X-H, Piao S, Wang D, et al. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 3478-3489.
6. Towers CG, Thorburn A. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine*. 2016; pii: S2352-3964(16)30495-30499.
7. Mita M, Sankhala K, Abdel-Karim I, Mita A, Giles F. Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008; 17: 1947-1954.
8. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 596-603.
9. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2007; 282: 5641-5652.
10. De Souza A, Khawaja KI, Masud F, Saif MW. Metformin and pancreatic cancer: Is there a role? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77: 235-242.
11. Duffy A, Le J, Sausville E, Emadi A. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2015; 75: 439-447.
12. Moriya S, Che X F, Komatsu S, et al. Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells. *Int J Oncol*. 2013; 42: 1541-1550.
13. Li YJ, Jiang Q, Cao GF, et al. Repertoires of autophagy in the pathogenesis of ocular diseases. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 35: 1663-1676.
14. Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, et al. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog Retin Eye Res*. 2016; 55: 206-245.
15. Kaarniranta K, Tokarz P, Koskela A, et al. Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. *Cell Biol Toxicol*. 2017; 33: 113-128.

