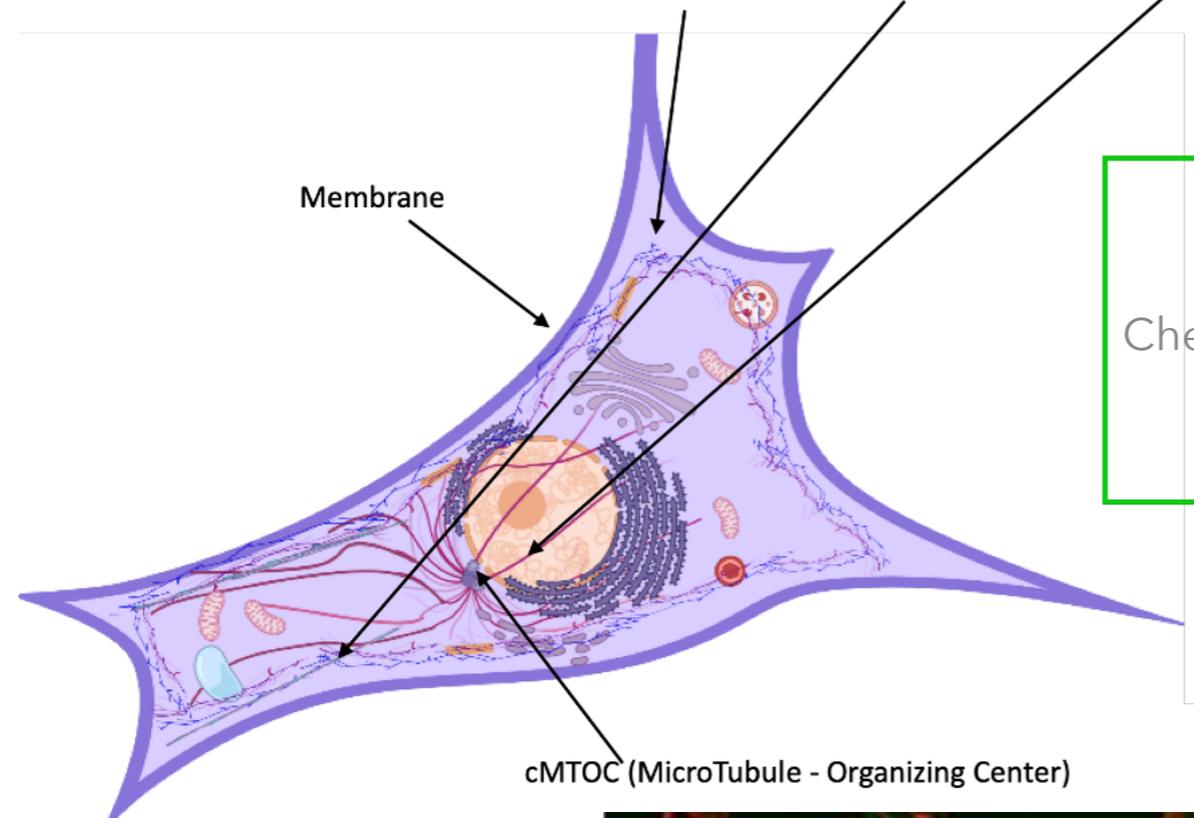


EXPERIMENT ON EXTRANUCLEAR CELLULAR TARGETS

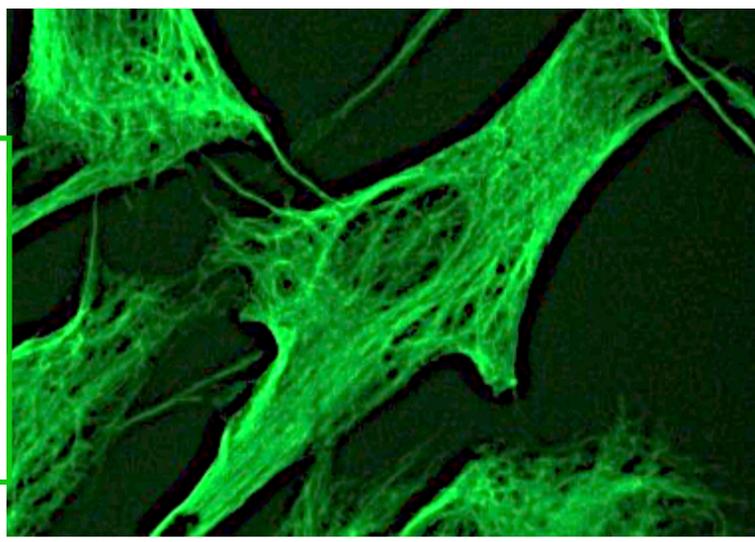
- Simonetta Croci (TIFPA -Università di Parma)

CITOSCHELETRO CARATTERISTICHE E FUNZIONE

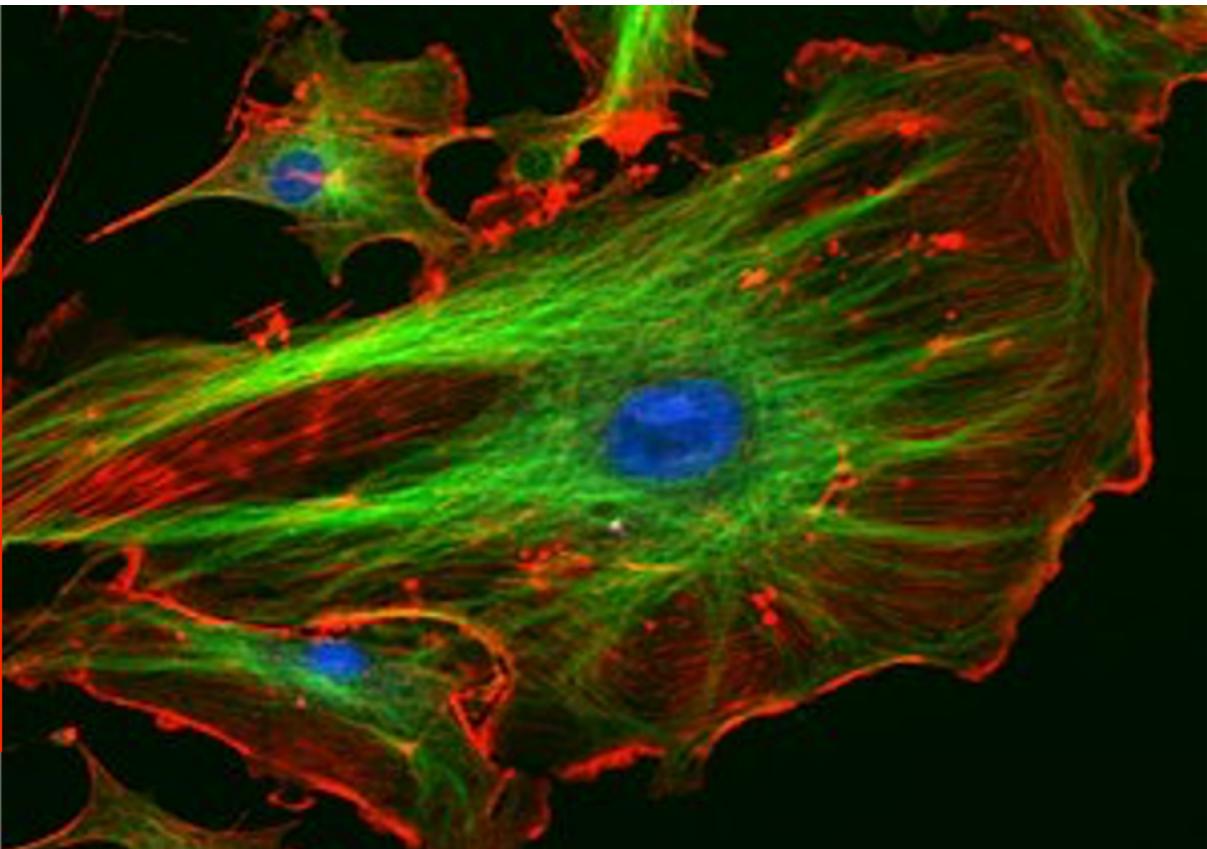
Cytoskeleton (microfilaments, intermediate filaments and microtubules)



FILAMENTI INTERMEDI
Cheratine e vimentina - diam 8 /12 nm
Sopportano stress meccanico
Altamente dinamici



MICROFILAMENTI
Actina - diam 4/7 nm
Movimento Cellulare
Forma della cellula
Contrazione cellule muscolari
Supporto strutturale
Ubiquitari



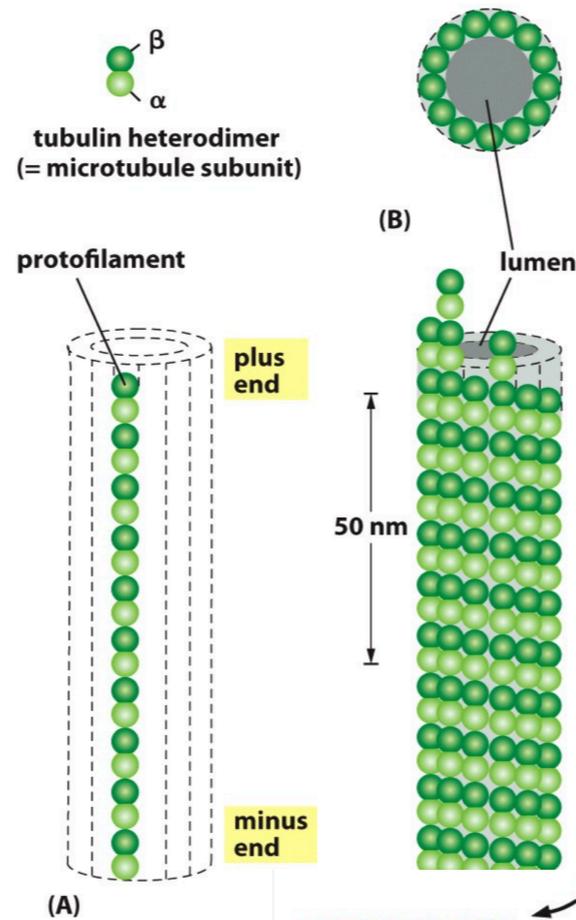
MICROTUBULI
Tubulina - **diam 25 nm**
Movimento Cellulare
Forma della cellula
Binario per il movimento degli organelli e di sostanze.
MT si riorganizzano e formano il fuso mitotico, la struttura che distribuisce i cromosomi fra le due cellule figlie

MICROTUBULI - TARGET

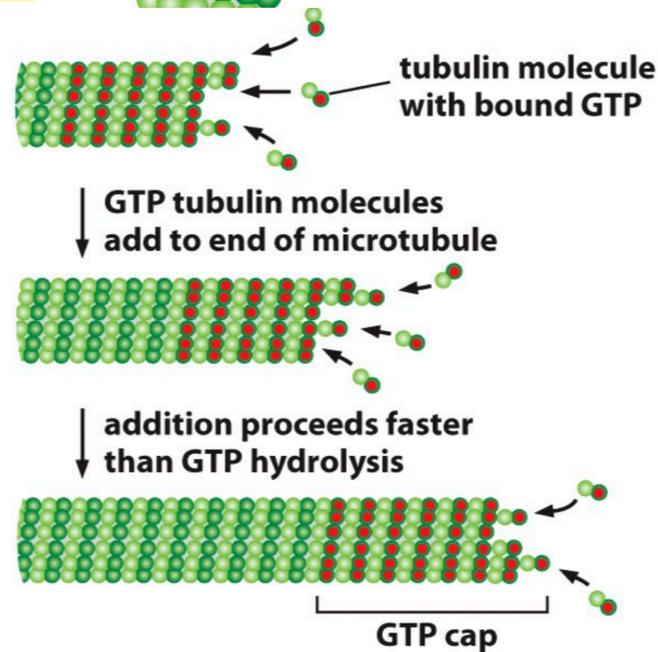
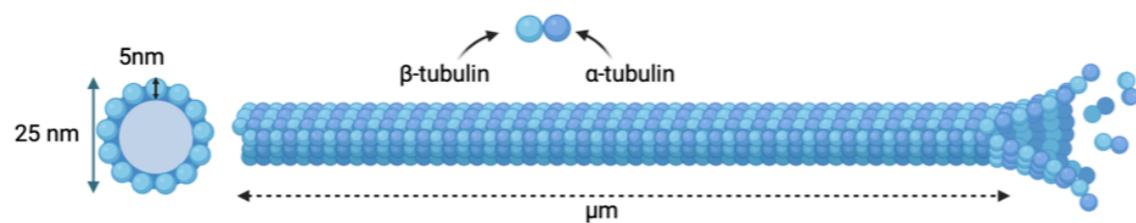
Sono in continuo stato di assemblaggio- instabilità dinamica

Sono polarizzati con una parte negativa (anello di β -tubulina) a crescita lenta e una positiva (anello di α -tubulina) a crescita veloce;

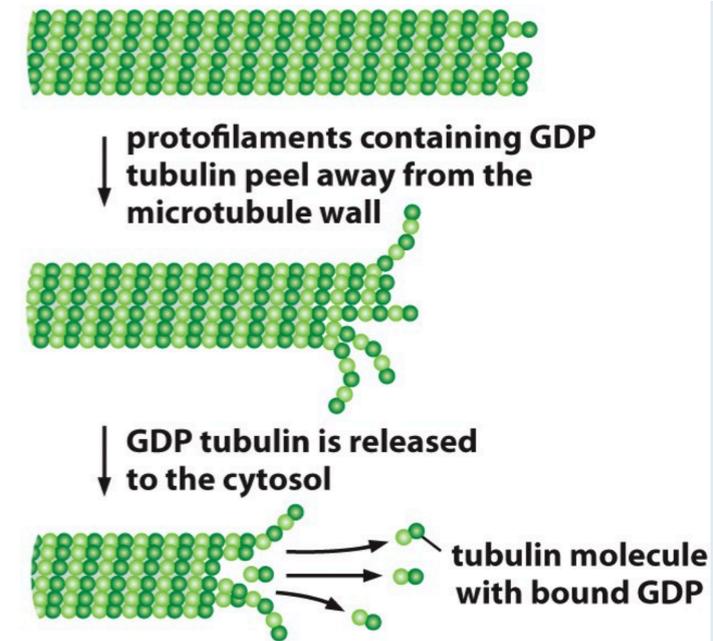
La fase di polimerizzazione avviene tramite legame con molecola di GTP che si converte in GDP



I dimero-GTP (guanosina trifosfato) si lega forte all'estremità + e la fa crescere, formando un cappuccio a GTP. Se il GTP della estremità s'idrolizza a GDP, i legami s'indeboliscono e il microtubulo si disfà: CATASTROFE. Questo processo mantiene i livelli di dimeri di tubulina alti nel citosole, per la nuova polimerizzazione.



(A) Microtubulo in allungamento



(B) Microtubulo in accorciamento

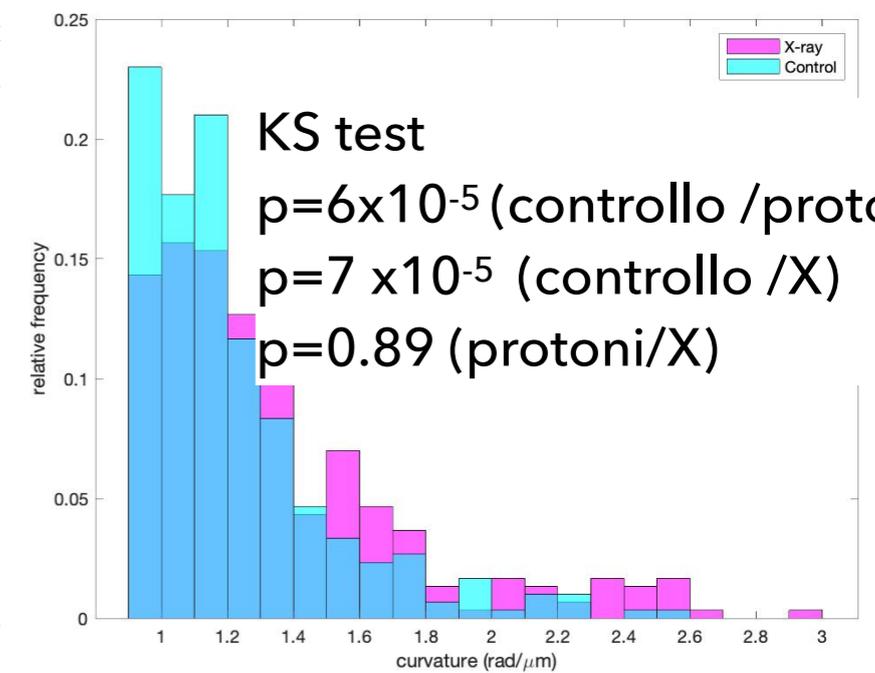
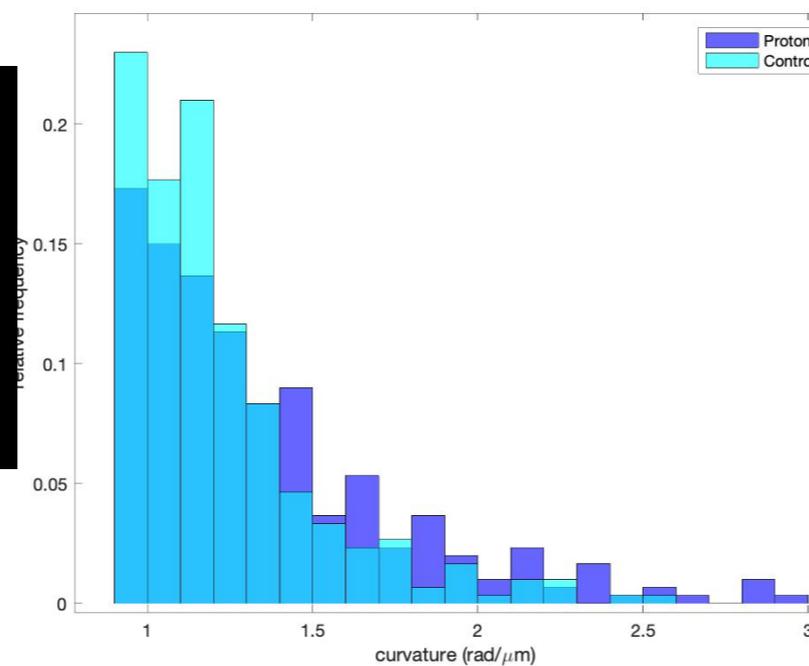
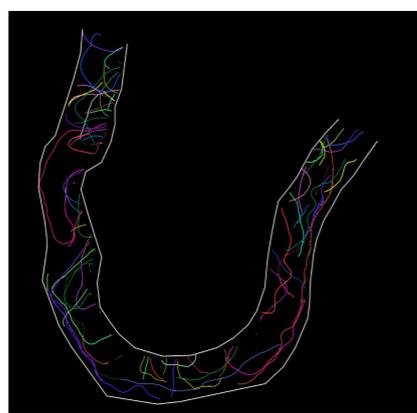
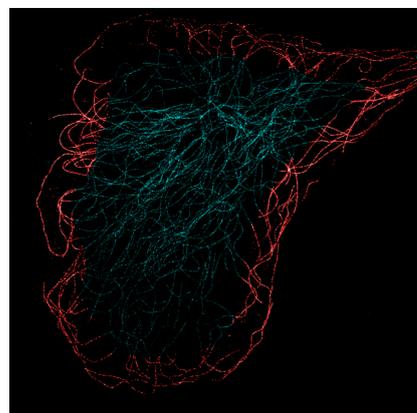
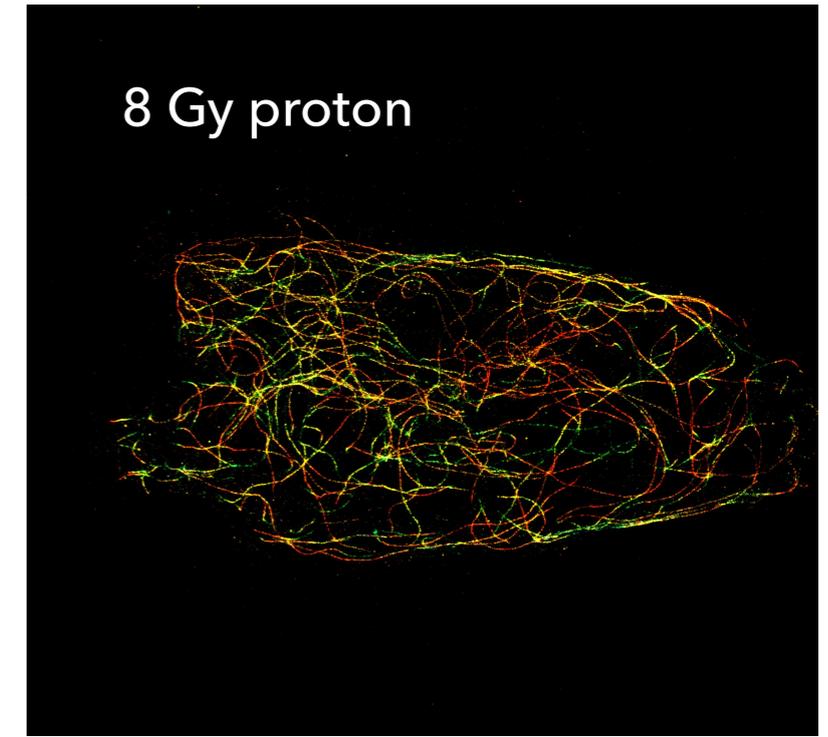
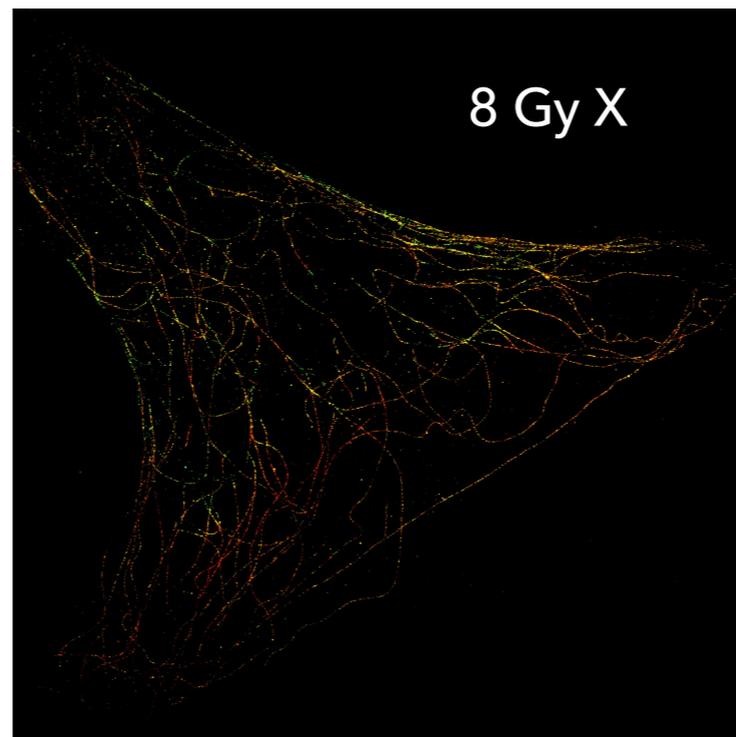
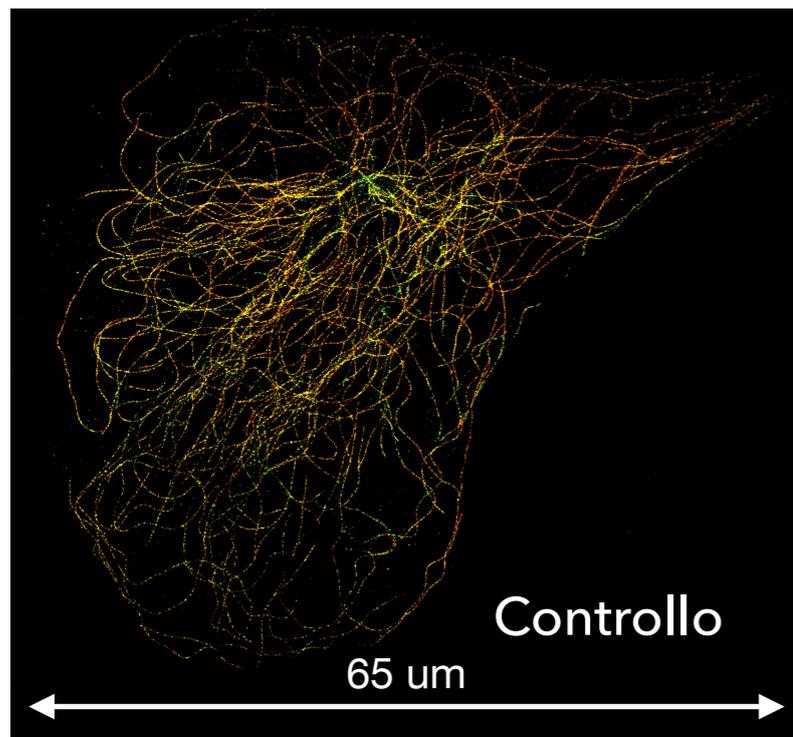
MICROTUBULI – TARGET

I MT subiscono un'instabilità dinamica, ovvero la conversione stocastica tra stati di crescita e di contrazione

Queste dinamiche sono altamente regolate in vivo da molteplici meccanismi che influenzano la tubulina e la sua interazione con un gran numero di sistemi di regolazione.

Un meccanismo che le cellule possono utilizzare per manipolare la struttura e la funzione dei MT coinvolge la modificazione post-traduzionale (PTM) delle subunità di tubulina. Attraverso la regolazione delle proteine, ad esempio mediante l'attaccamento covalente di gruppi chimici aggiuntivi, le PTM possono svolgere un ruolo importante nel controllo della stabilità e della funzione dei MT

ALFA-TUBULINA IN HS 578 BST – NON TUMORALE

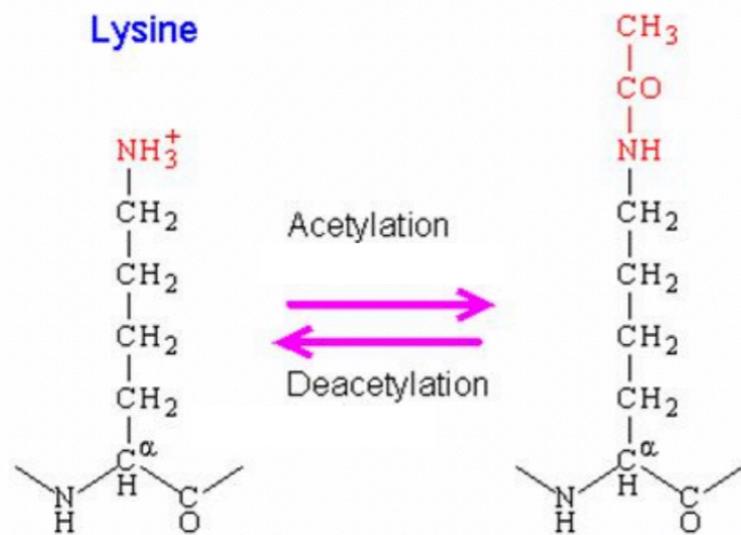


Curvatura media delle curvature >0.92 rad/μm	
Controllo	1,13
Protoni	1,24
X-ray	1,23

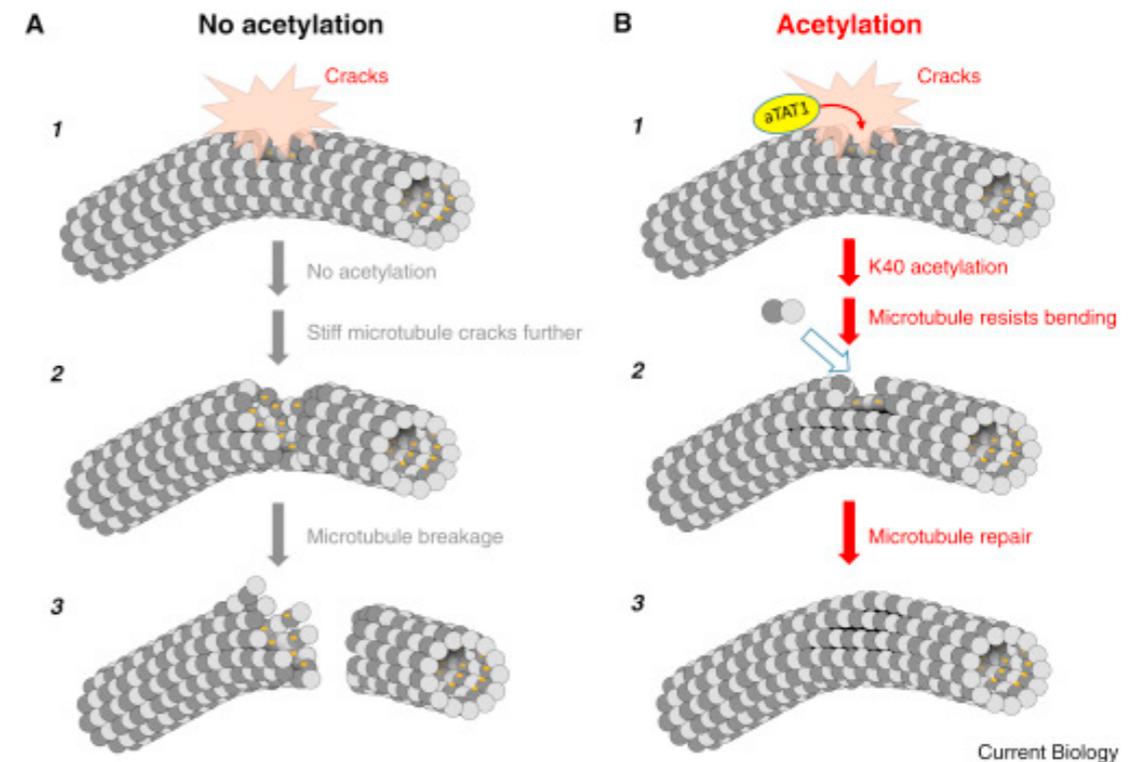
Nei campioni di controllo la distribuzione della curvatura ρ_x ha un valore medio di 0,33 rad/μm con una sd di 0,48 rad/μm, nei campioni irradiati con protoni di 0,35 rad/μm con sd di 0,60 rad/μm e nel caso dei campioni irradiati con raggi X di 0,34 rad/μm con sd di 0,49 rad/μm. Questi valori sono in completo accordo con la letteratura.

ACETILAZIONE

Spesso in zone **con maggior curvatura** e che **colocalizzano rotture** (da stress meccanico) del filamento, si trovano **hotspot di acetilazione - modificazione post-traduzionale (PTM)**



Acetilazione e deacetilazione del residuo lisinico



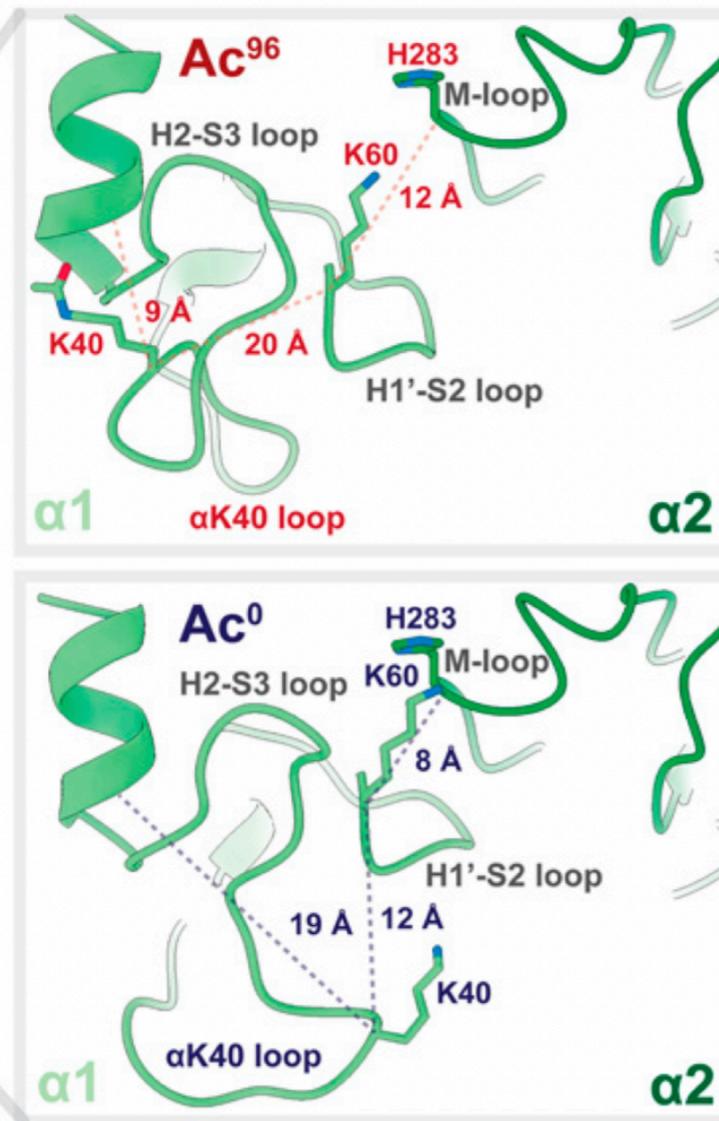
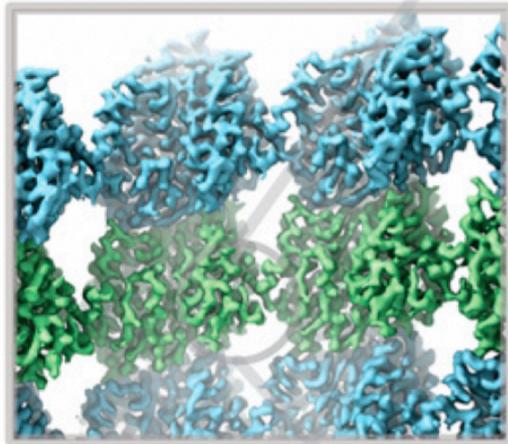
Carsten Janke and Guillaume Montagnac
Current Biology 27, R1287-R1292, December 4, 2017

Acetilazione della subunità α ha luogo principalmente nei microtubuli polimerizzati grazie all'enzima αTAT1 che sembra entrare nel filamento .



ACETILAZIONE

La maggior parte delle PTM della tubulina alterano i residui all'interno della coda C-terminale altamente flessibile della tubulina che si estende dalla superficie della MT e contribuisce al legame delle proteine associate ai microtubuli (MAP). **L'acetilazione di α -tubulina su K40 si distingue come il principale PTM della tubulina che si localizza all'interno della MT, all'interno di un loop di residui da P37 a D47, spesso**



In molte conformazioni favorite dallo stato Ac^0 , **K40** in un monomero $\alpha 1$ **è vicino all'anello M** del vicino monomero $\alpha 2$ **e può sostenere l'anello H1'-S2**, fornendo supporto all'interazione laterale vitale $\alpha 1K60:\alpha 2H283$.

Al contrario, quando **K40 è acetilato, si impacchetta ~10 Å** più vicino al dominio globulare del monomero $\alpha 1$, riducendo il potenziale per le interazioni inter monomeri

L'acetilazione può indebolire le interazioni laterali.

Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability

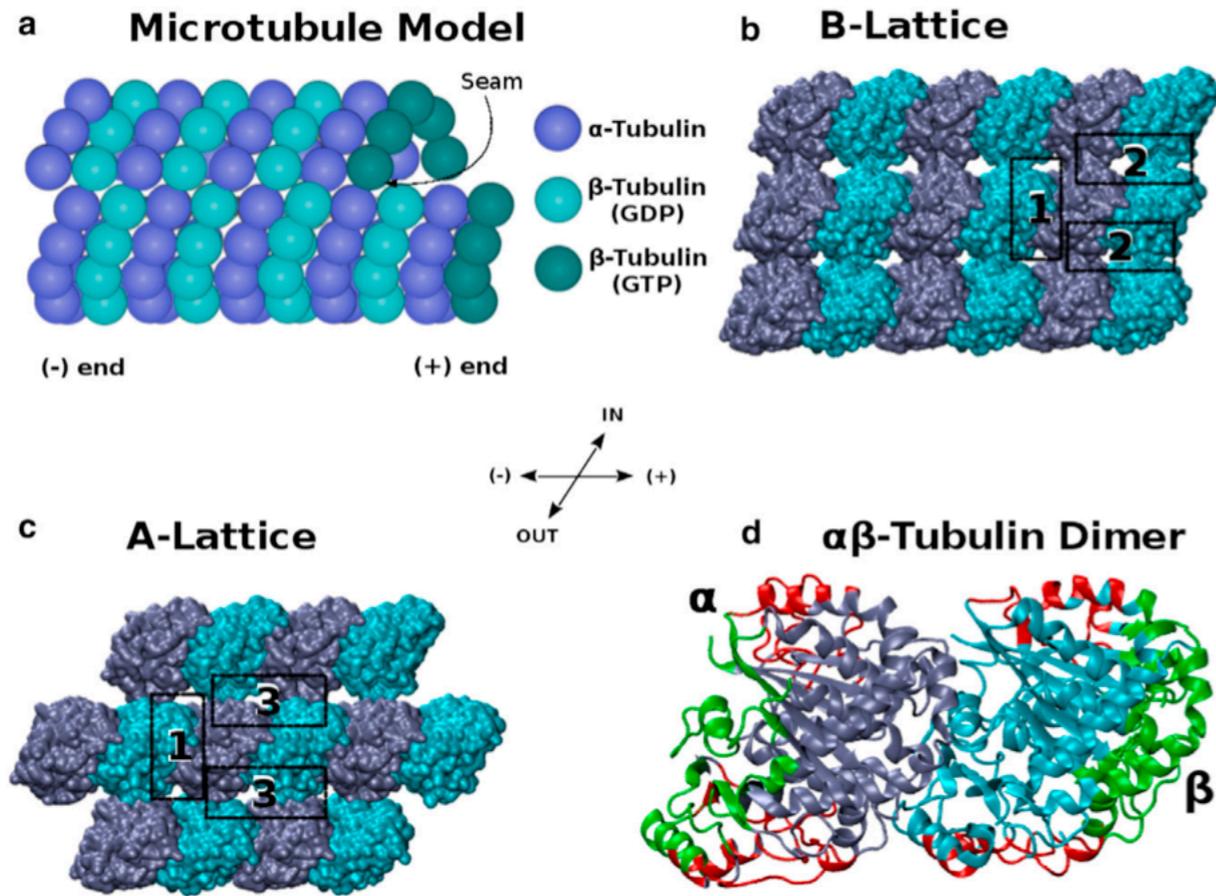
Lisa Eshun-Wilson et al. PNAS 2019, vol. 116 no. 21

Acetilazione K40 \longleftrightarrow stabilità dei microtubuli.

Acetilazione K40 \longrightarrow indebolisce l'interazione tra microtubuli

aumentando la loro flessibilità \longrightarrow maggior resistenza stress meccanico

TUBULINA - INTERAZIONI



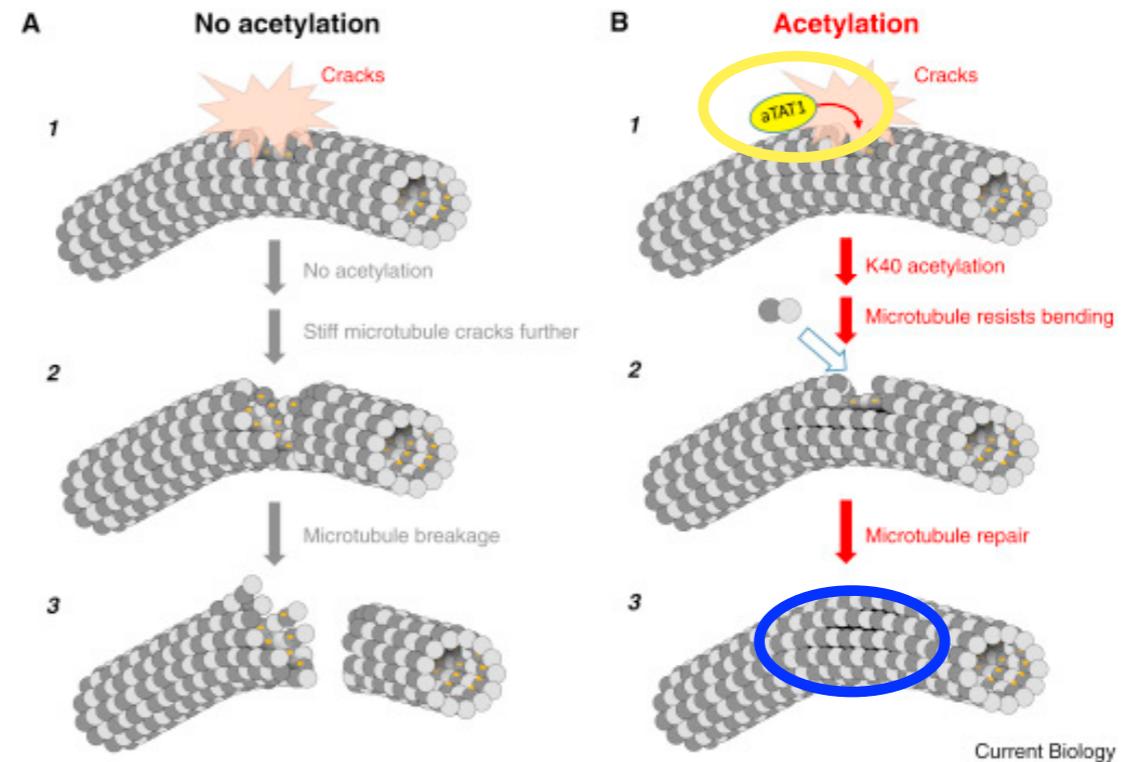
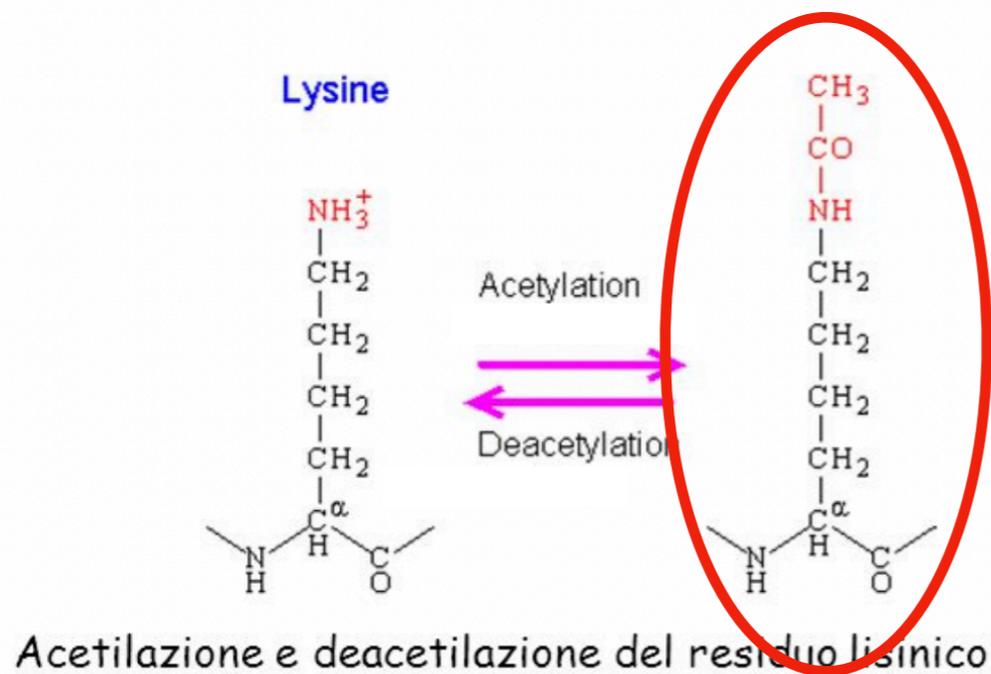
I contatti laterali hanno mostrato una stabilità molto più elevata di quelli longitudinali (-462 5 70 vs. -392 5 59 kJ/mol), il che suggerisce un drammatico effetto di stabilizzazione laterale. I legami idrogeno laterali del B-lattice si dimostrano di forza paragonabile a quelli dell'A-lattice (462 5 70 vs. -472 5 46 kJ/mol). Questi risultati dimostrano l'importanza dei legami a idrogeno per la stabilità dei sistemi tubulinici.

Ahmed T. Ayoub et al.

Analysis of the Strength of Interfacial Hydrogen Bonds between Tubulin Dimers Using Quantum Theory of Atoms in Molecules 740
Biophysical Journal Volume 107 August 2014 740-750

ACETILAZIONE

Spesso in zone **con maggior curvatura** e che **colocalizzano rotture** (da stress meccanico) del filamento, si trovano **hotspot di acetilazione - modificazione post-traduzionale (PTM)**

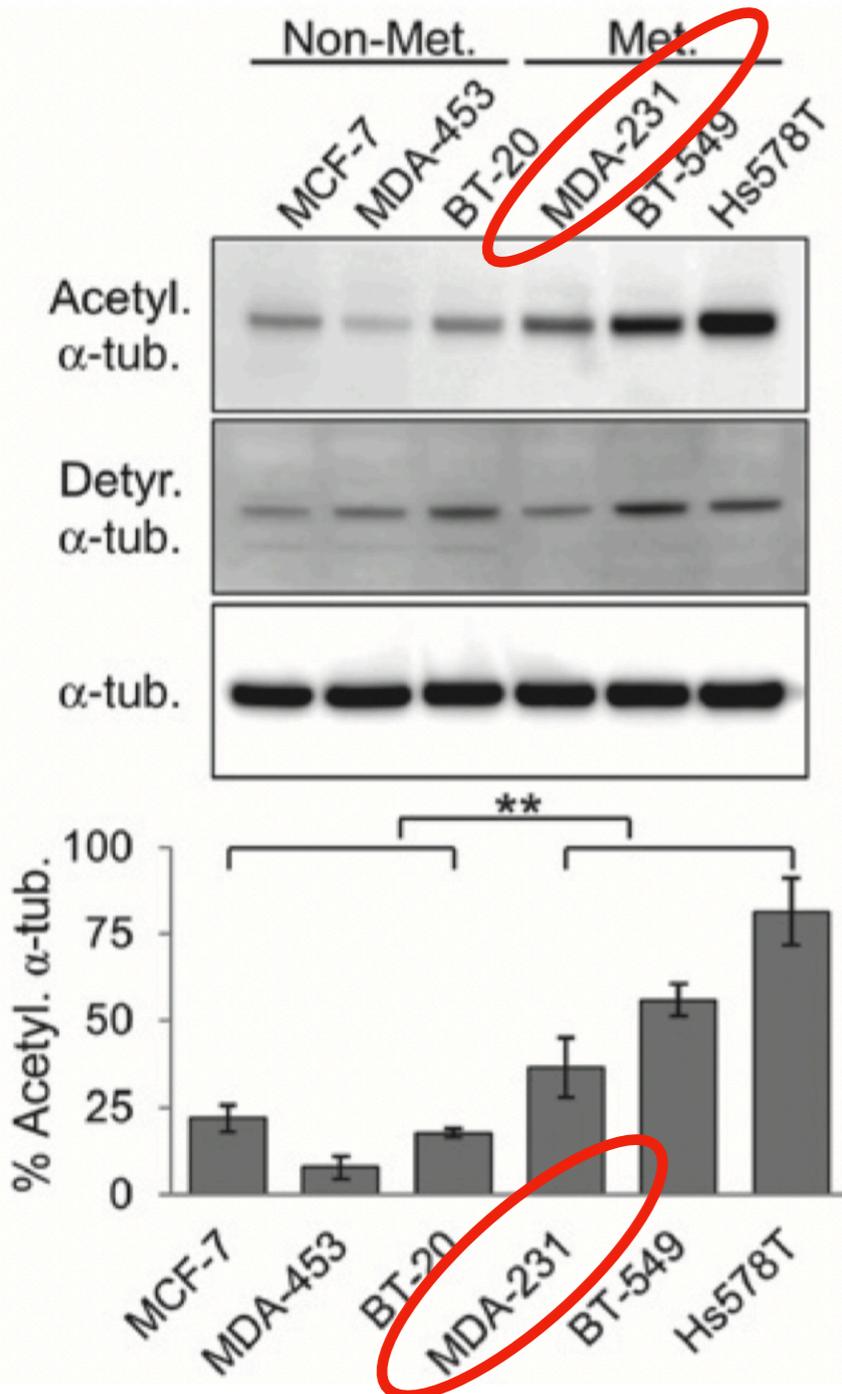


Carsten Janke and Guillaume Montagnac
Current Biology 27, R1287-R1292, December 4, 2017

Acetilazione della subunità α ha luogo principalmente nei microtubuli polimerizzati grazie all'enzima aTAT1 che sembra entrare nel filamento .



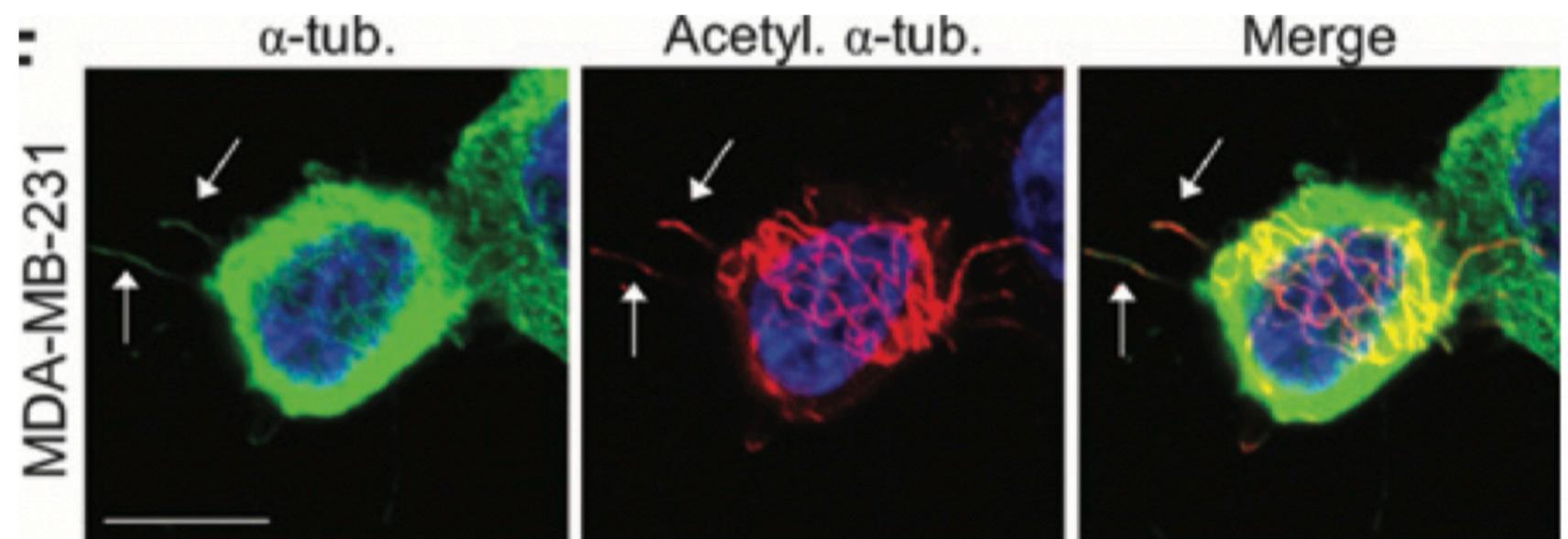
ACETILAZIONE



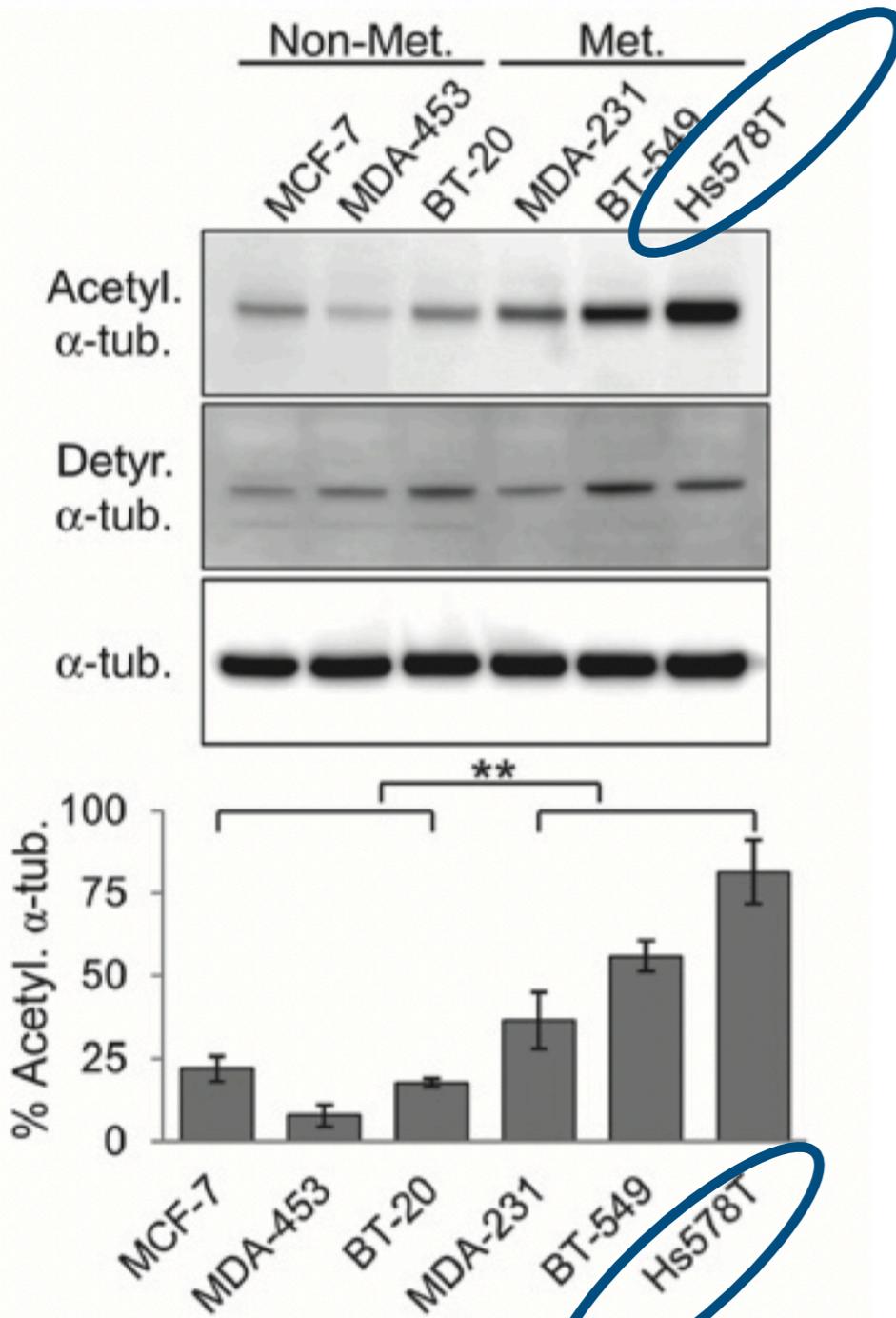
Amanda E. Boggs et al. α -Tubulin Acetylation Elevated in Metastatic and Basal-like Breast Cancer Cells Promotes Microtentacle Formation, Adhesion, and Invasive Migration *Cancer Res*; 75(1) January 1, 2015

Correlazione tra alti livelli di α -tubulin acetilata e il comportamento aggressivo delle cellule metastatiche nel tumore della mammella, con **formazione di microtentacoli**; potenziali implicazioni per la definizione di un semplice biomarcatore prognostico nelle pazienti con tumore al seno.

Riduzione dell'acetilazione della α -tubulina ha inibito significativamente la migrazione, ma non ha influito sulla proliferazione.

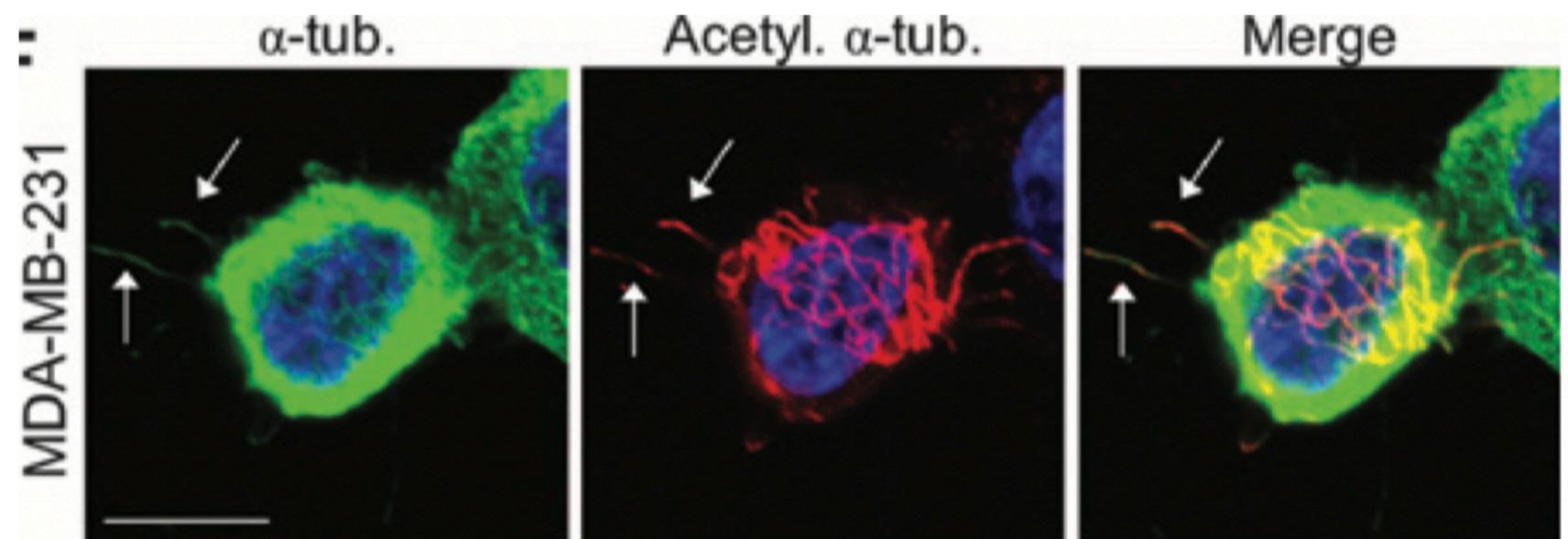


ACETILAZIONE



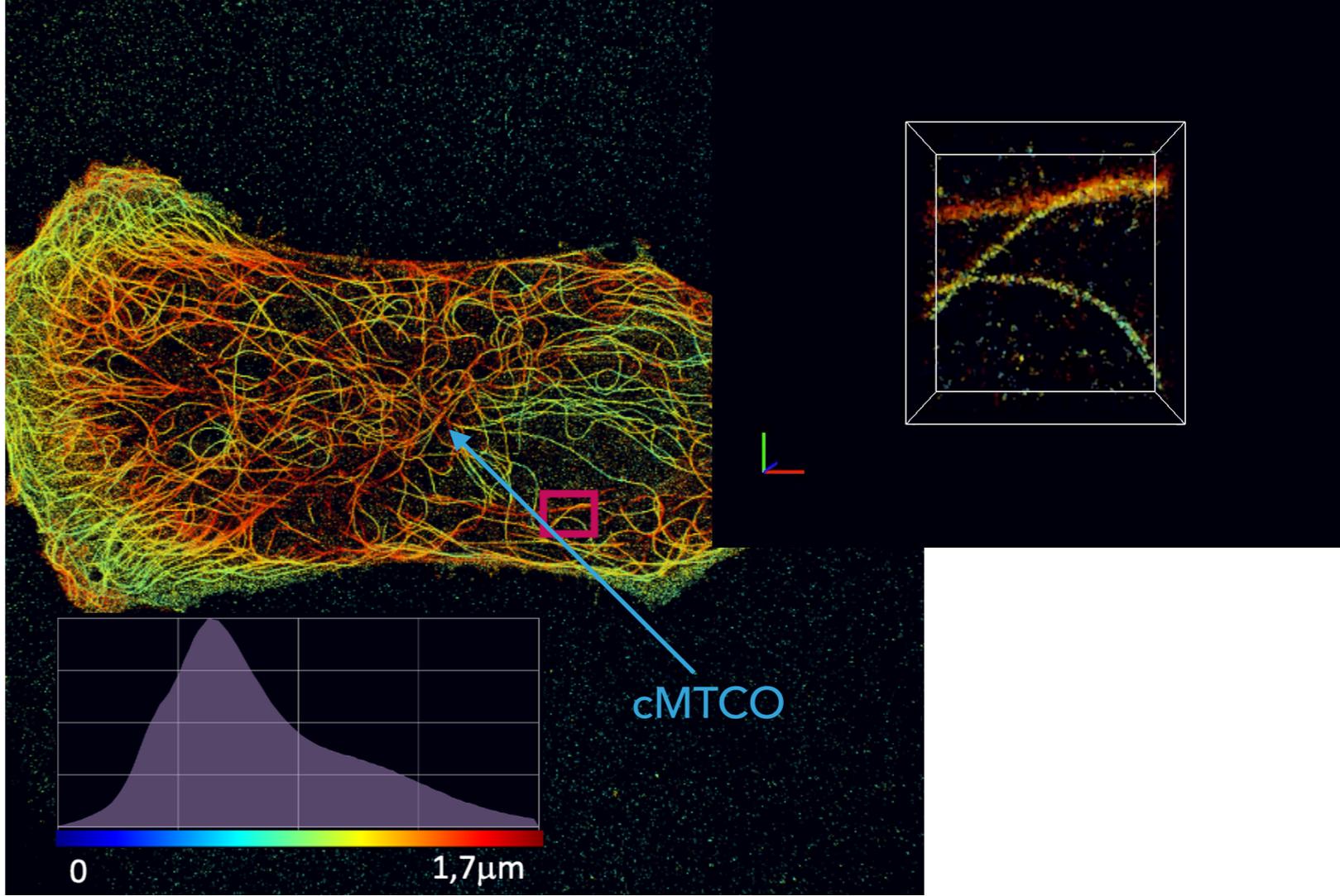
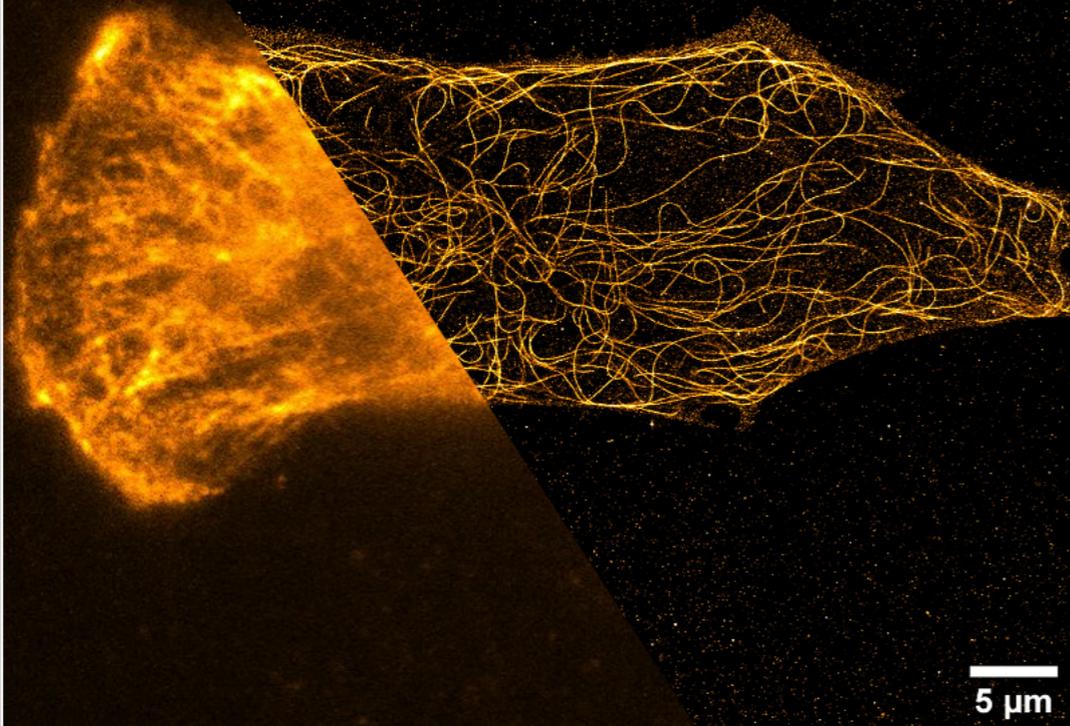
Correlazione tra alti livelli di α -tubulin acetilata e il comportamento aggressivo delle cellule metastatiche nel tumore della mammella, con formazione di microtentacoli; potenziali implicazioni per la definizione di un semplice biomarcatore prognostico nelle pazienti con tumore al seno.

Riduzione dell'acetilazione della α -tubulina ha inibito significativamente la migrazione, ma non ha influito sulla proliferazione.

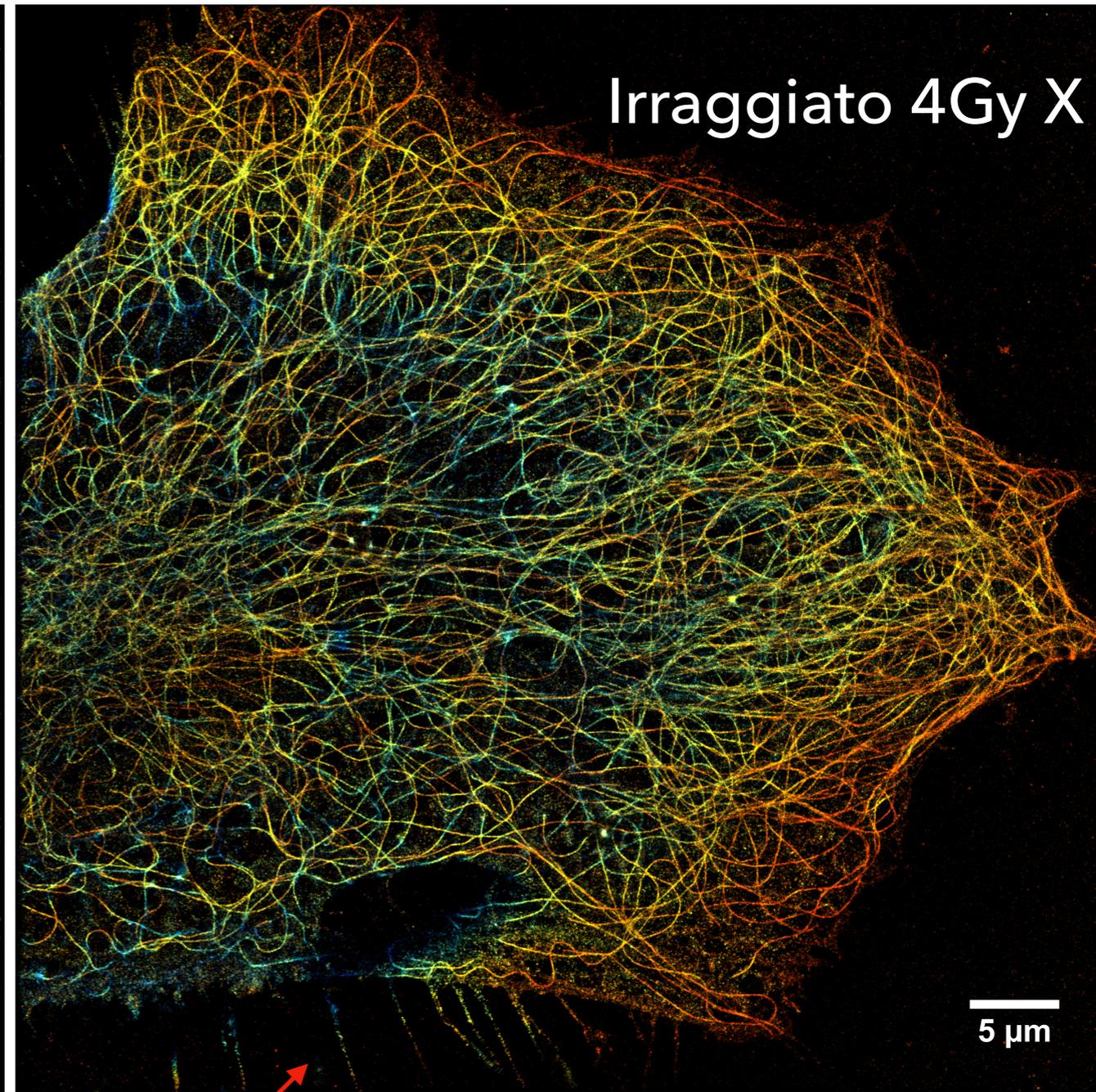
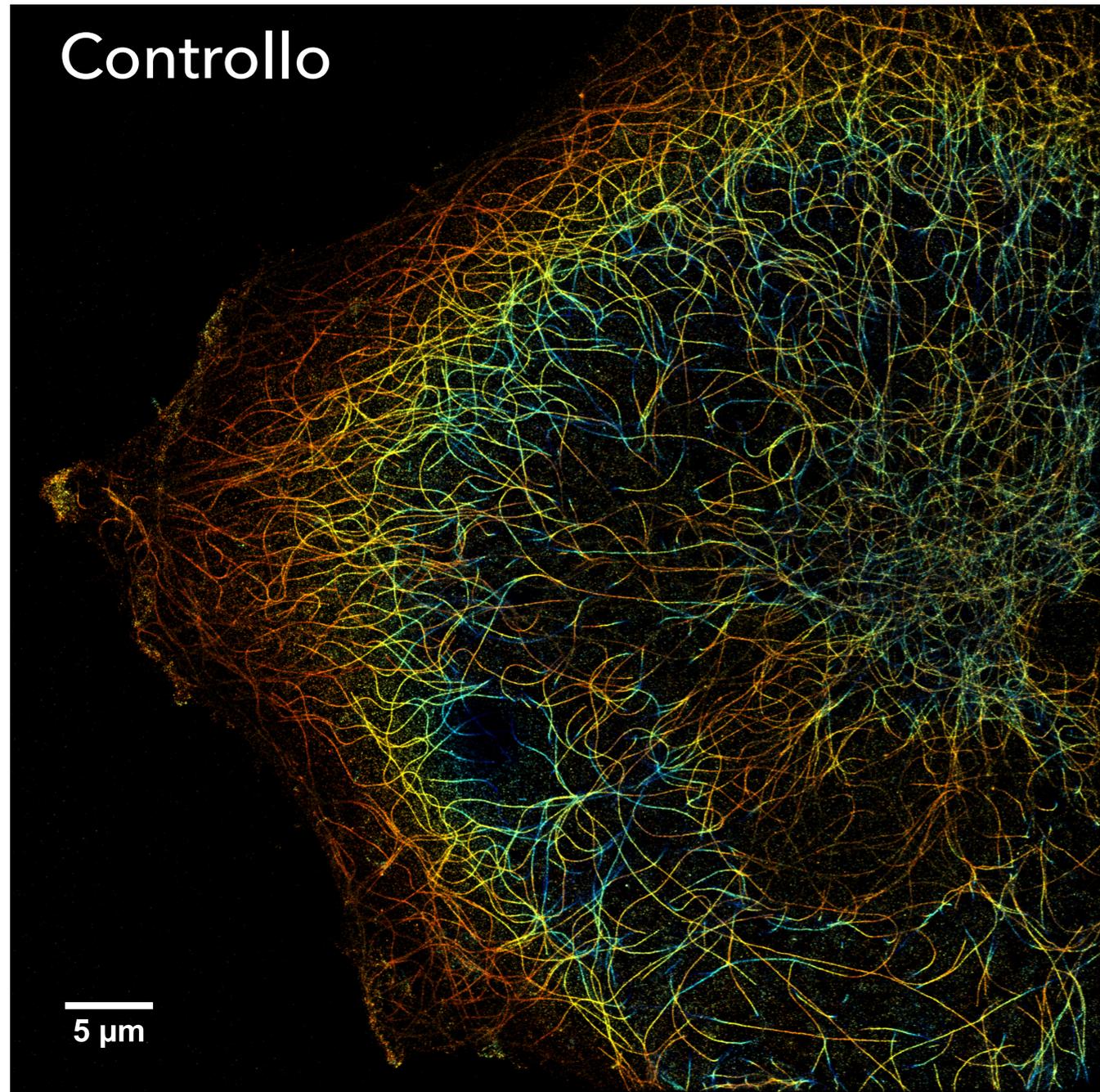


ALFA-TUBULINA IN HS 578 T - TUMORALE

Hs 578 T - tumore
mammario umano triplo
negativo



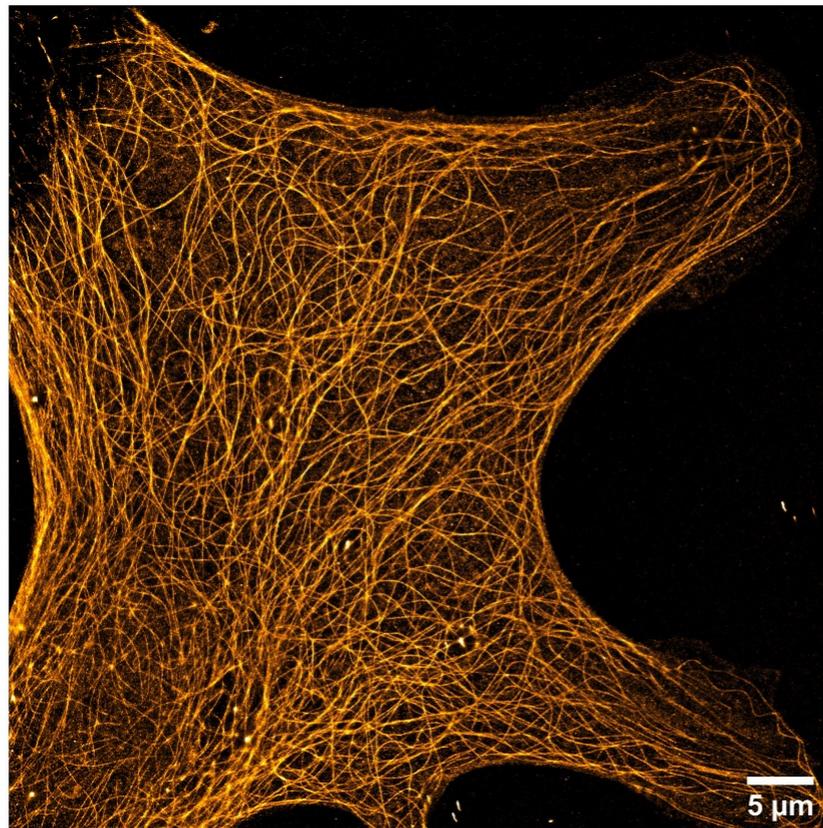
ALFA-TUBULINA IN HS 578 T - TUMORALE



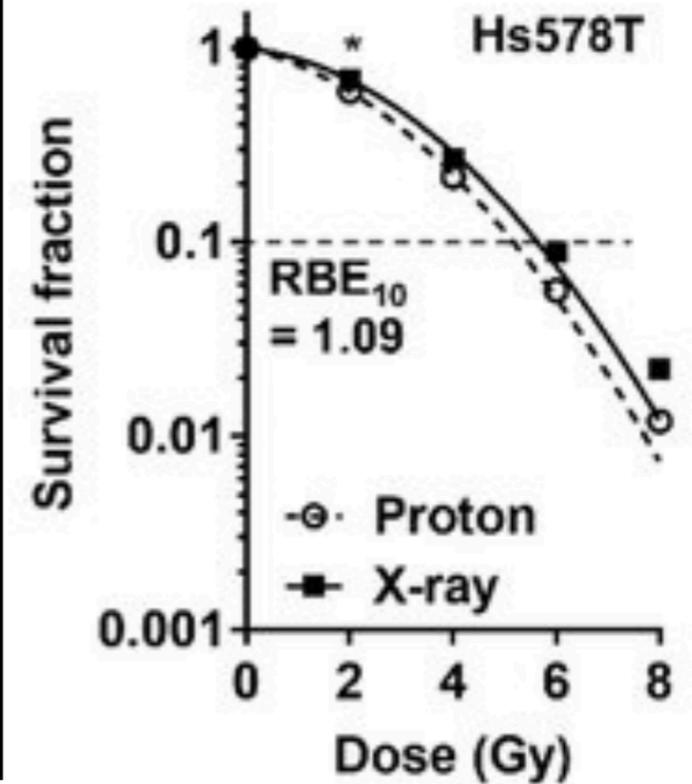
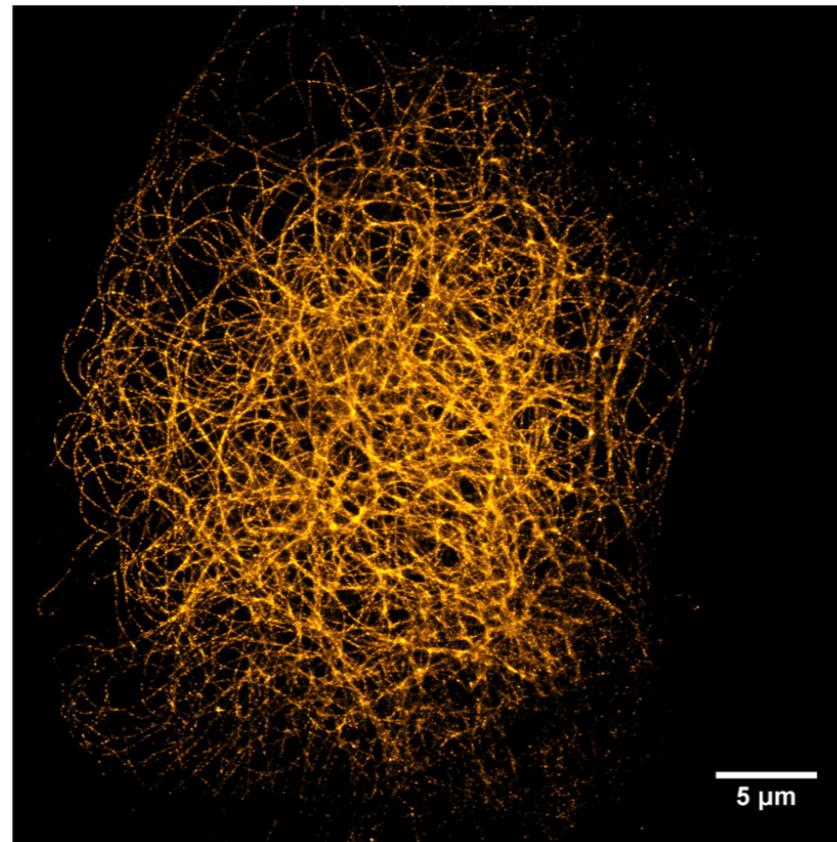
microtentacoli

ALFA-TUBULINA IN HS 578 T - TUMORALE

4 Gy X



4 Gy PROTON



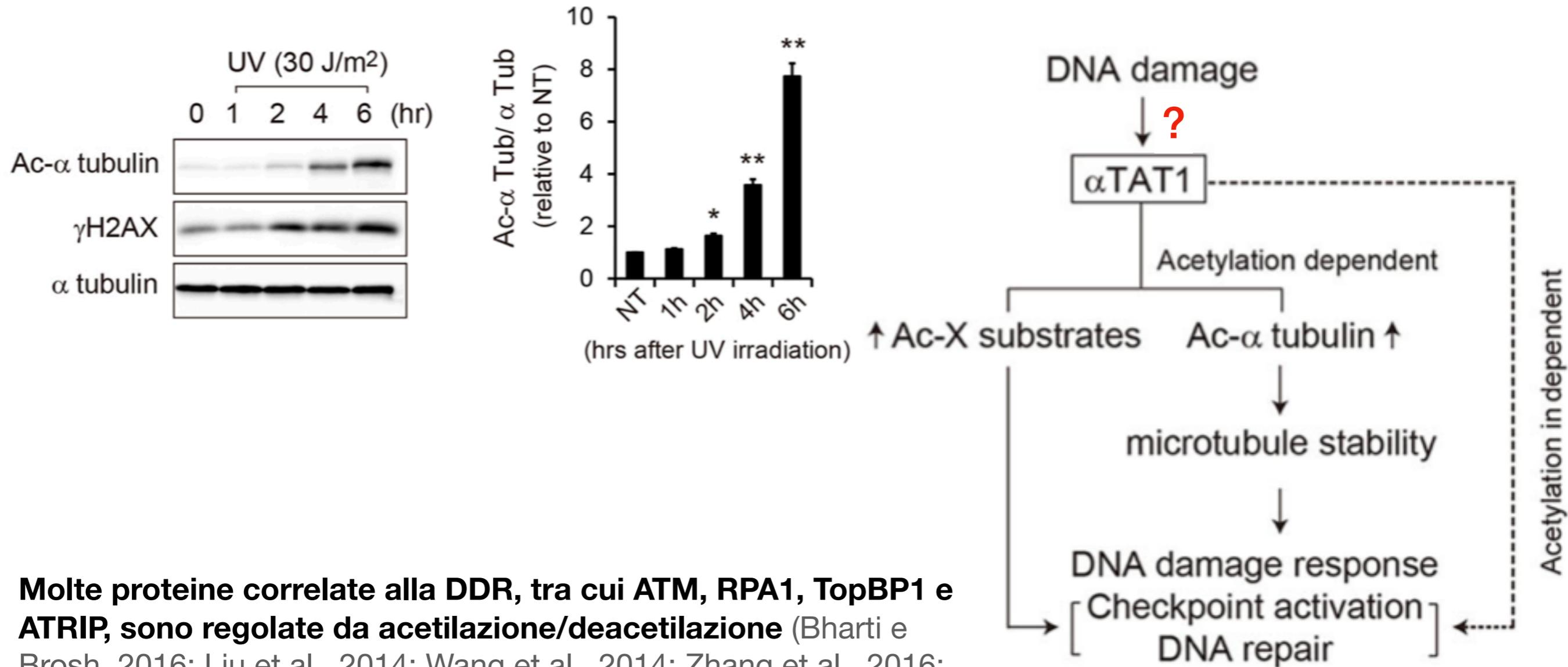
150 MeV - energia fascio protoni - centro SOBP presso Proton Therapy Center Trento
 195kV_p- TIFPA - Trento

Danneggiamento cMTOC con riorganizzazione dei MTOC

Aumento densità microtubuli

ACETILAZIONE - MISURA DI DANNO (MICROTUBULI O DNA)

E' stato dimostrato che la stabilizzazione dei microtubuli è necessaria per il traffico intracellulare delle proteine di riparazione del DNA in risposta al danno al DNA (Poruchynsky et al., 2015), e che esiste un legame tra la risposta al danno al DNA (DDR) anche con UVC e le reti di microtubuli.



Molte proteine correlate alla DDR, tra cui ATM, RPA1, TopBP1 e ATRIP, sono regolate da acetilazione/deacetilazione (Bharti e Brosh, 2016; Liu et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2017). **Sarebbe quindi interessante indagare il legame funzionale tra α TAT1 e queste proteine.**

MISURA DI DANNO (CITOSCHELETRO O DNA)

Ipotesi: danno ai microtubuli induce attivazione dell'acetilazione conferendone stabilità ai MT e permettendo il trasporto delle proteine di riparo del danno al DNA.

Cosa si può fare in FRIDA:

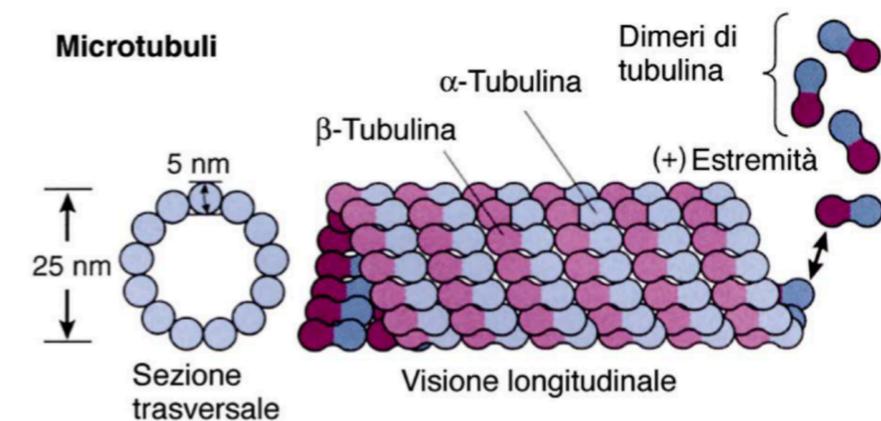
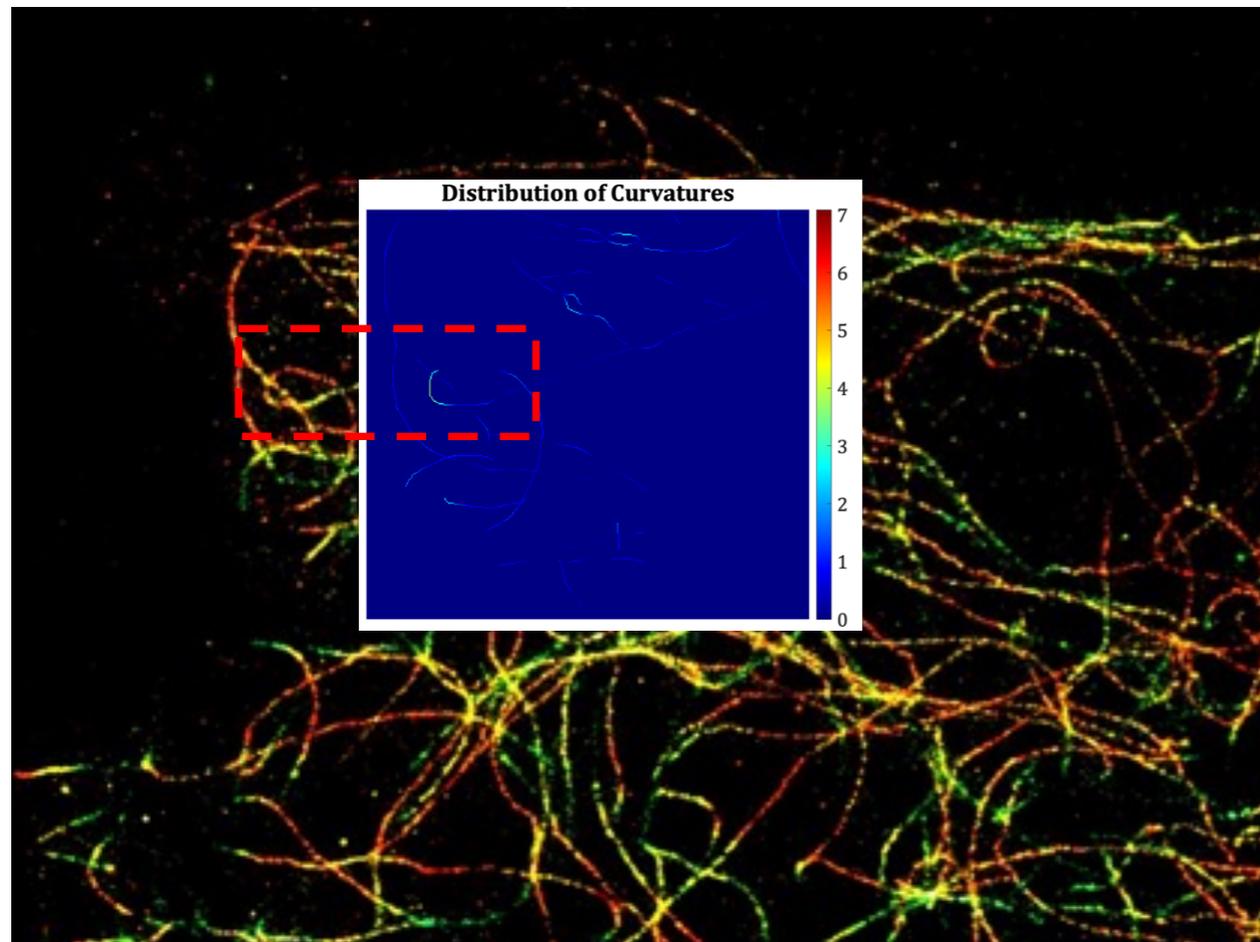
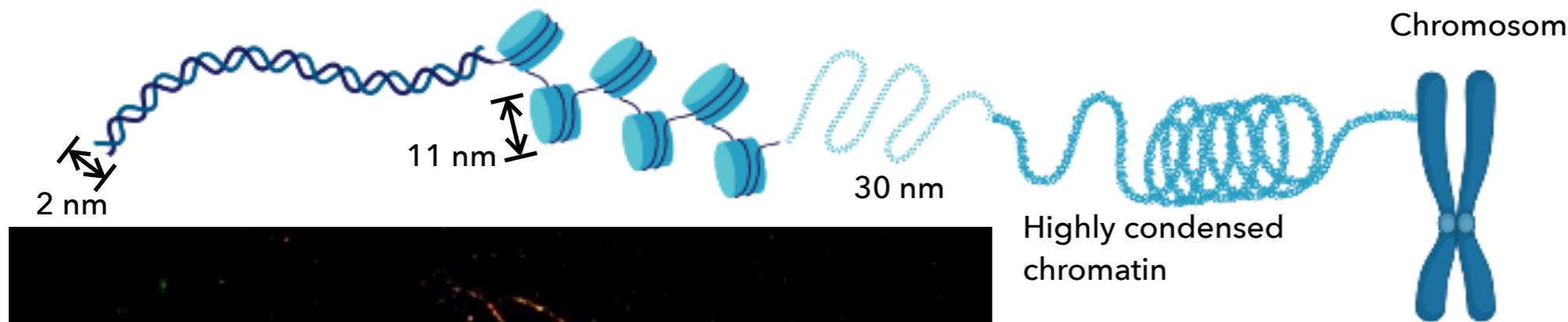
- 1) **Marcatura tubulina** e **tubulina acetilata** per misure con STORM e microscopia confocale. Verifica della colocalizzazione nei siti di maggior curvatura e con tubulina acetilata, in modalità (FLASH e CONV).
CORRELAZIONE CON γ H2AX (saturazione)
- 2) **Misure western blot** di tubulina acetilata e α ATA1 in modalità (FLASH e CONV)
- 3) Misure espressione genica (es BCL2, CXCL8, FGF1, MAPK8 e RASSF1A, geni noti per essere coinvolti principalmente nei segnali pro-infiammatori e nella crescita e metastasi delle cellule tumorali - era significativamente ridotta nelle cellule ATAT1 KO) in modalità (FLASH e CONV)

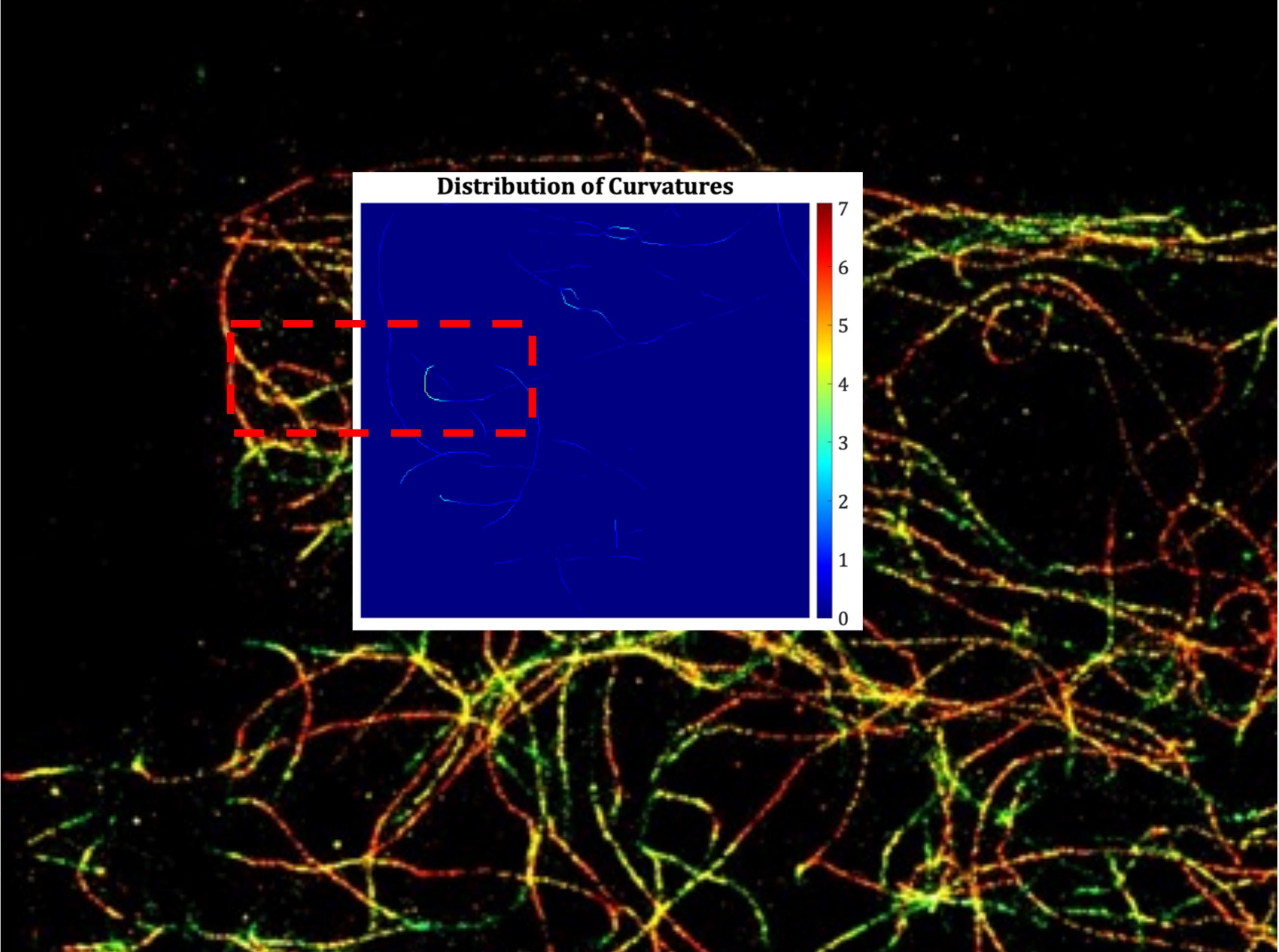
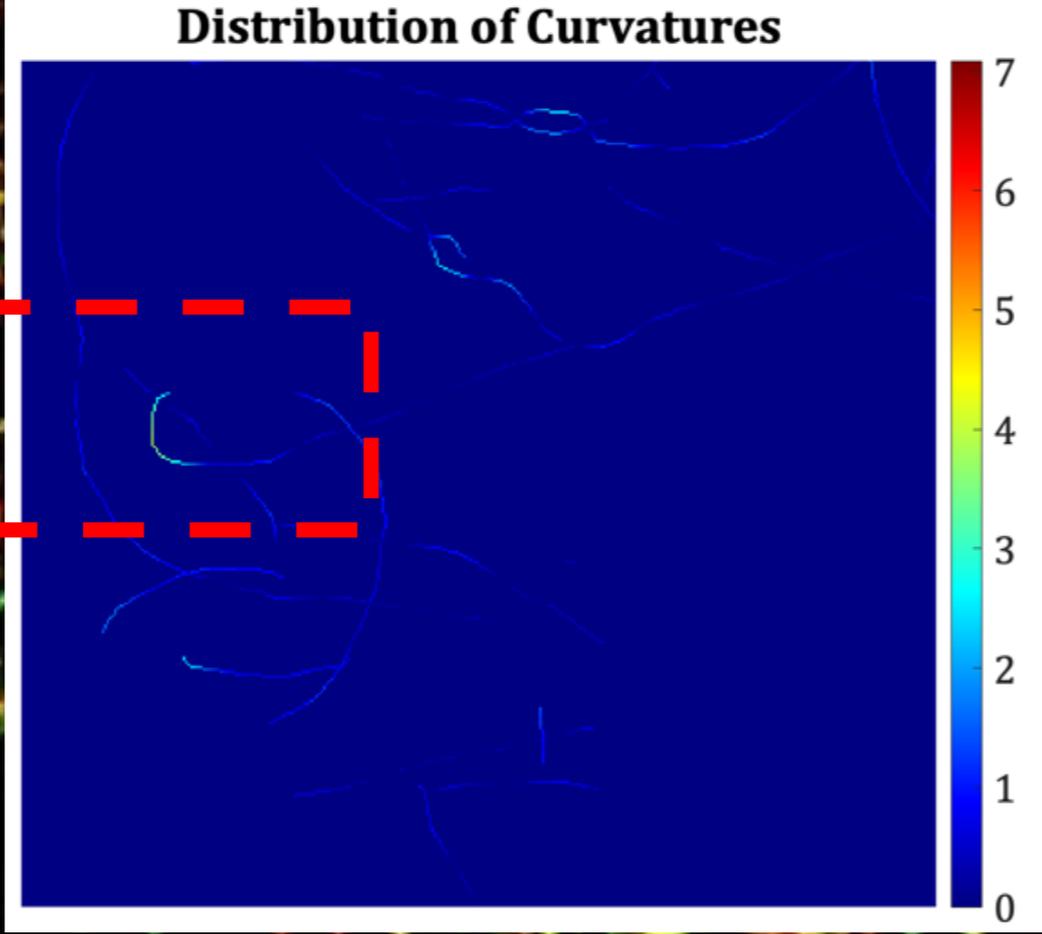
MISURA DI DANNO (CITOSCHELETRO O DNA)

Ipotesi: danno ai microtubuli induce attivazione dell'acetilazione conferendone stabilità ai MT e permettendo il trasporto delle proteine di riparo del danno al DNA.

Ulteriori proposte

4) Irraggiamenti con ioni carbonio / verso X per visualizzare possibile danno e traccia sul microtubuli come dati per possibili simulazioni Monte Carlo





ACETILAZIONE

Studio sul il meccanismo di progressione del tumore al seno in relazione alla rigidità della ECM, quando **le cellule MDA-231** sono cresciute su una matrice rigida, **sono state caratterizzate da un aumento dell'acetilazione dei microtubuli e dalla downregulation dei marcatori di stress ER.**

Knock down di ATAT1 ha indotto lo stress ER e inibito la progressione cellulare, la migrazione, l'invasione e la proliferazione e formazione di sferoidi, attraverso la downregulation dell'espressione genica (es adesione focale).

L'espressione di ATAT1 e dei geni marcatori dello stress ER è risultata correlata negativamente in vari tipi di cancro al seno.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che **l'interruzione dell'acetilazione dei microtubuli è un potente strumento terapeutico per prevenire la progressione del cancro al seno attraverso l'upregolazione dello stress ER.** Inoltre, **ATAT1 e i geni marcatori dello stress ER possono essere utili marcatori diagnostici** in vari tipi di cancro al seno.

*Ko,P.;Choi et L. Microtubule Acetylation Controls MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Invasion through the Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress. Int. J.Mol.Sci.***2021**,22,6018. [https:// doi.org/10.3390/ijms22116018](https://doi.org/10.3390/ijms22116018)

ALFA-TUBULINA IN HS 578 BST – NON TUMORALE

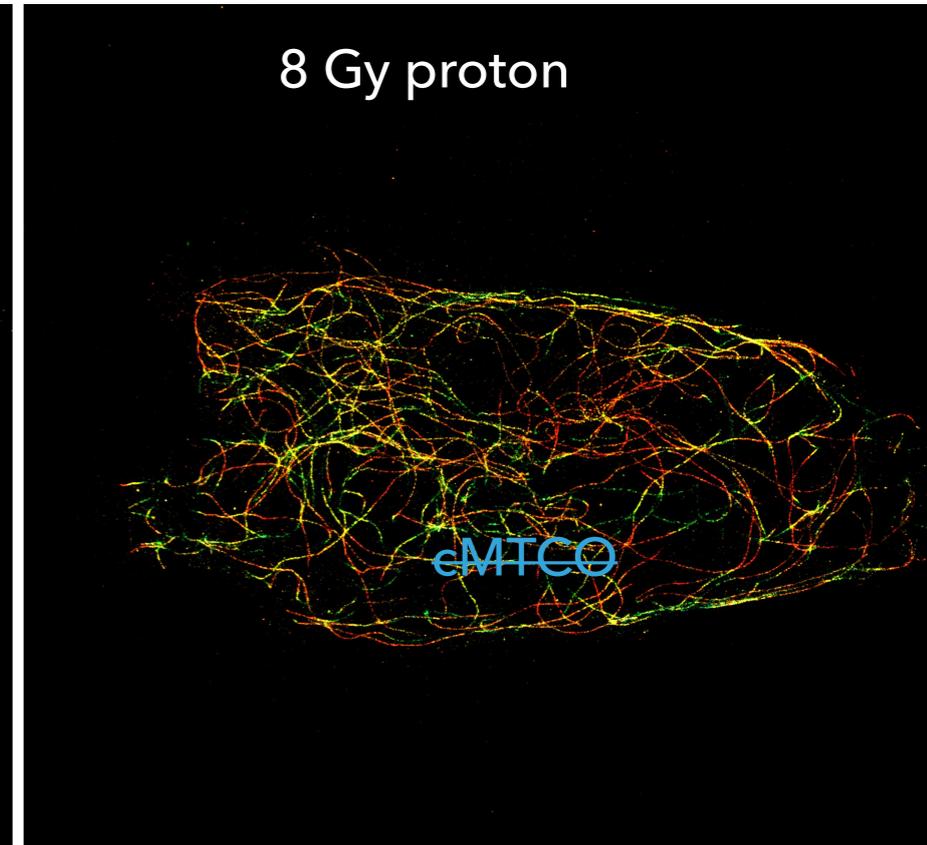
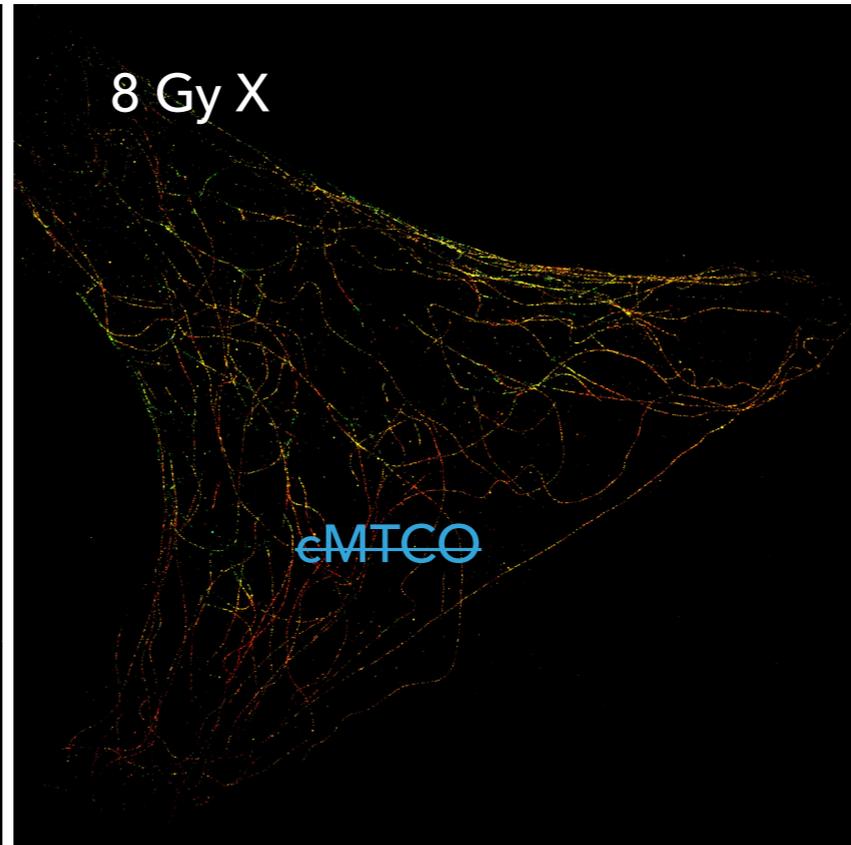
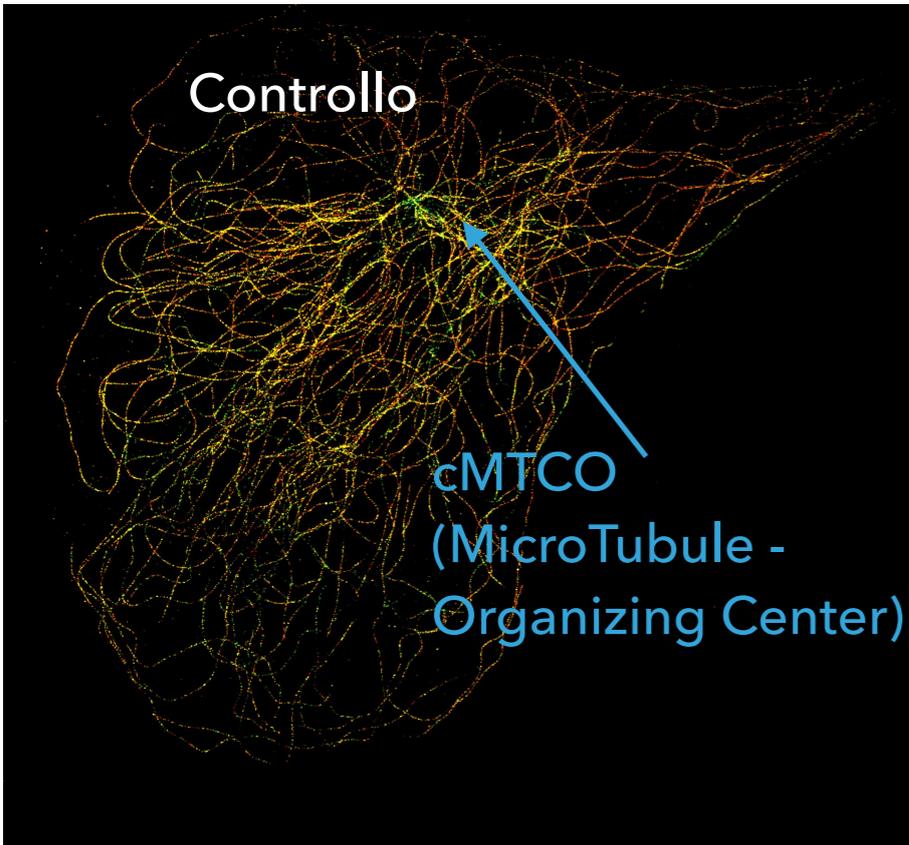


TABLE 1 | Computed total and peripheral occupancy ratios.

(%)	Control	Protons	X-ray
Total occupancy ratio	21 ± 9	25 ± 12	7 ± 4
Peripheral occupancy ratio	54 ± 9	98 ± 20	92 ± 8

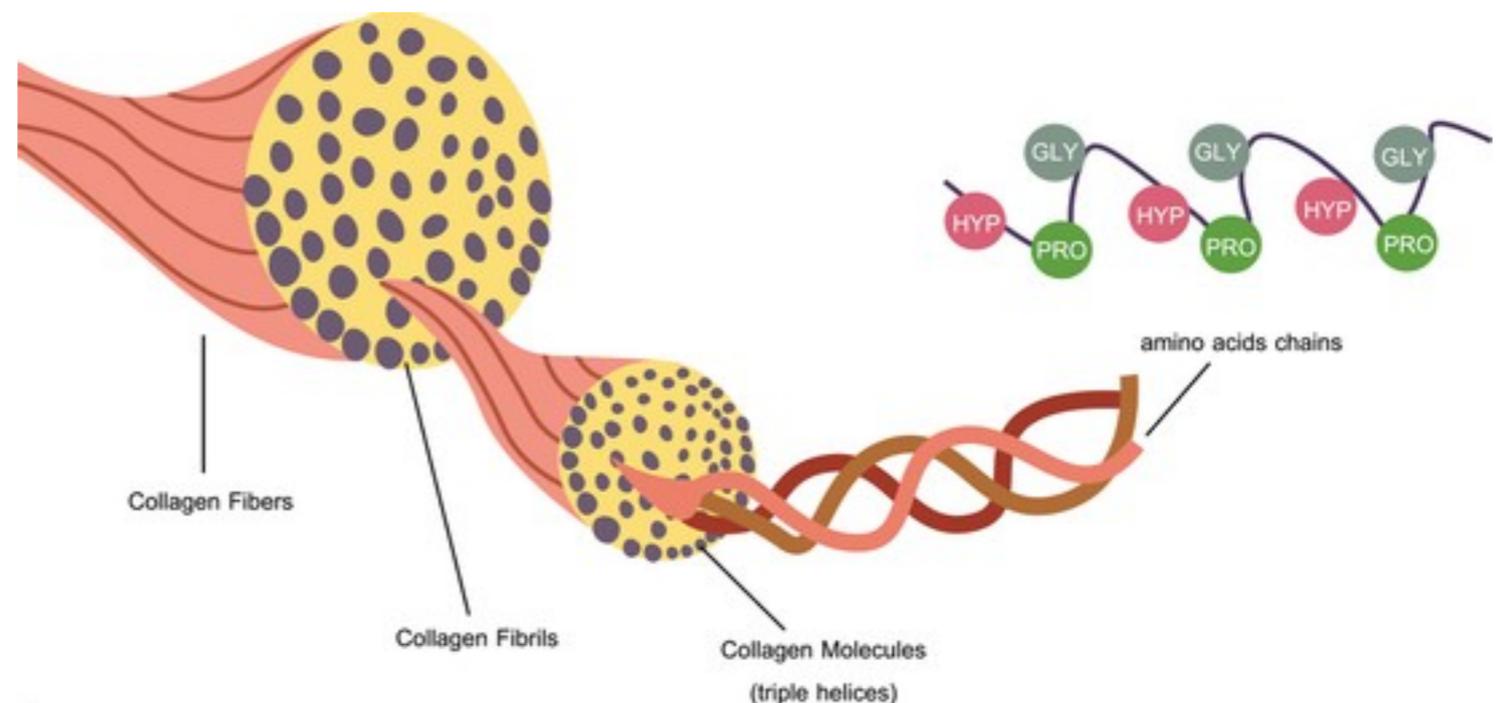
**Danneggiamento cMTOC
con riorganizzazione dei MTOC**

SISTEMA 3D

I modelli di coltura 3D dovrebbero introdurre vantaggi sostanziali rispetto ai monostrati cellulari perché rendono possibile lo spostamento delle indagini radiobiologiche dagli studi sui target cellulari all'esplorazione di risposte più complesse che coinvolgono la rete dei segnali derivanti dall'interazione cellula-cellula e cellula-matrice.

Abbiamo iniziato a studiare un possibile substrato 3D su cui fare co-culture.

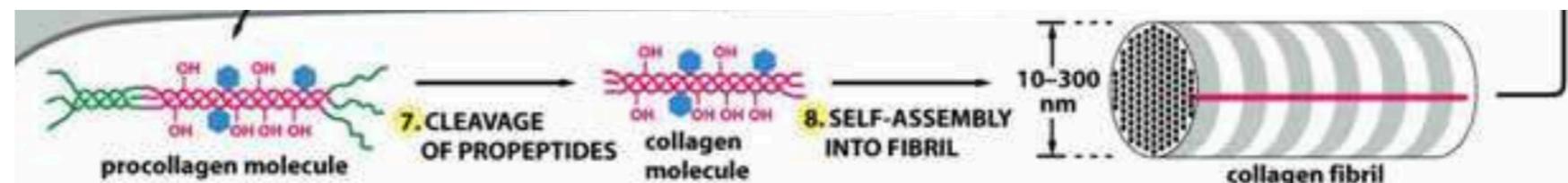
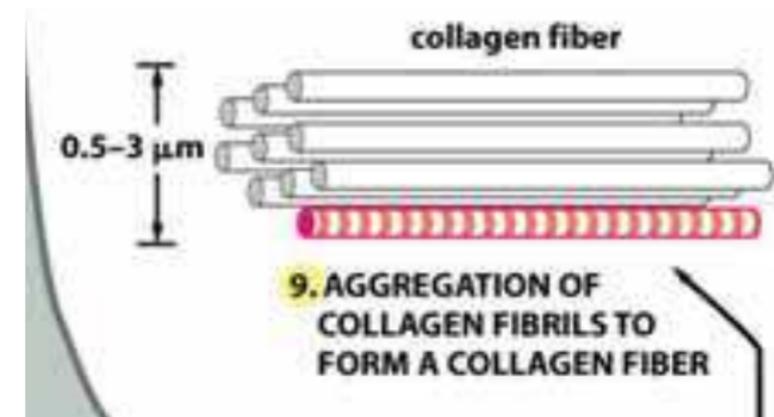
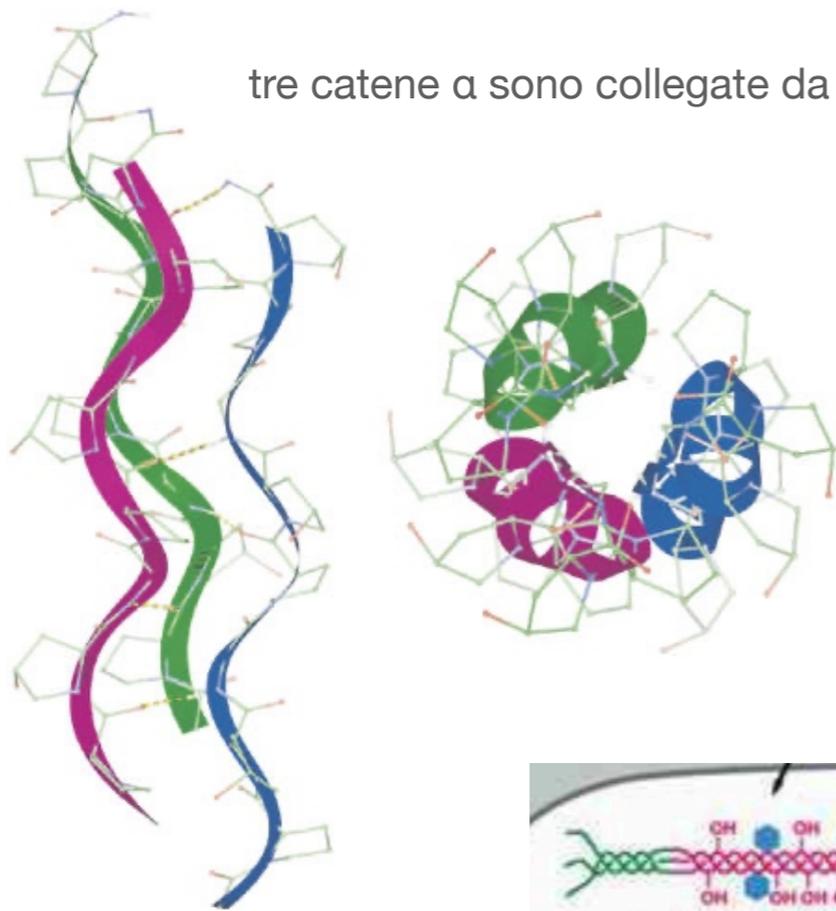
BIOPAD™ compressa di collagene equino nativo utilizzato normalmente nella bioingegneria. Questo "spugna" è formata da 100% collagene nativo che mantiene la sua struttura a tripla elica.



COLLAGENE

La sequenza di amminoacidi di una singola catena α è Gly-X-Y, dove l'amminoacido più piccolo è la glicina (Gly) e X e Y sono spesso prolina (Pro) e idrossiprolina (Hyp), rispettivamente. La sequenza mostrata è (Gly-Pro-Hyp)₃. Il piccolo amminoacido Gly si trova sempre al centro della superelica e gli ingombranti anelli pirrolidinici di Pro e Hyp puntano verso l'esterno. L'orientamento non centrosimmetrico dei gruppi metilenici negli anelli produce un effetto non lineare achirale.

tre catene α sono collegate da legami idrogeno tra l'NH della glicina e il CO della prolina nell'X

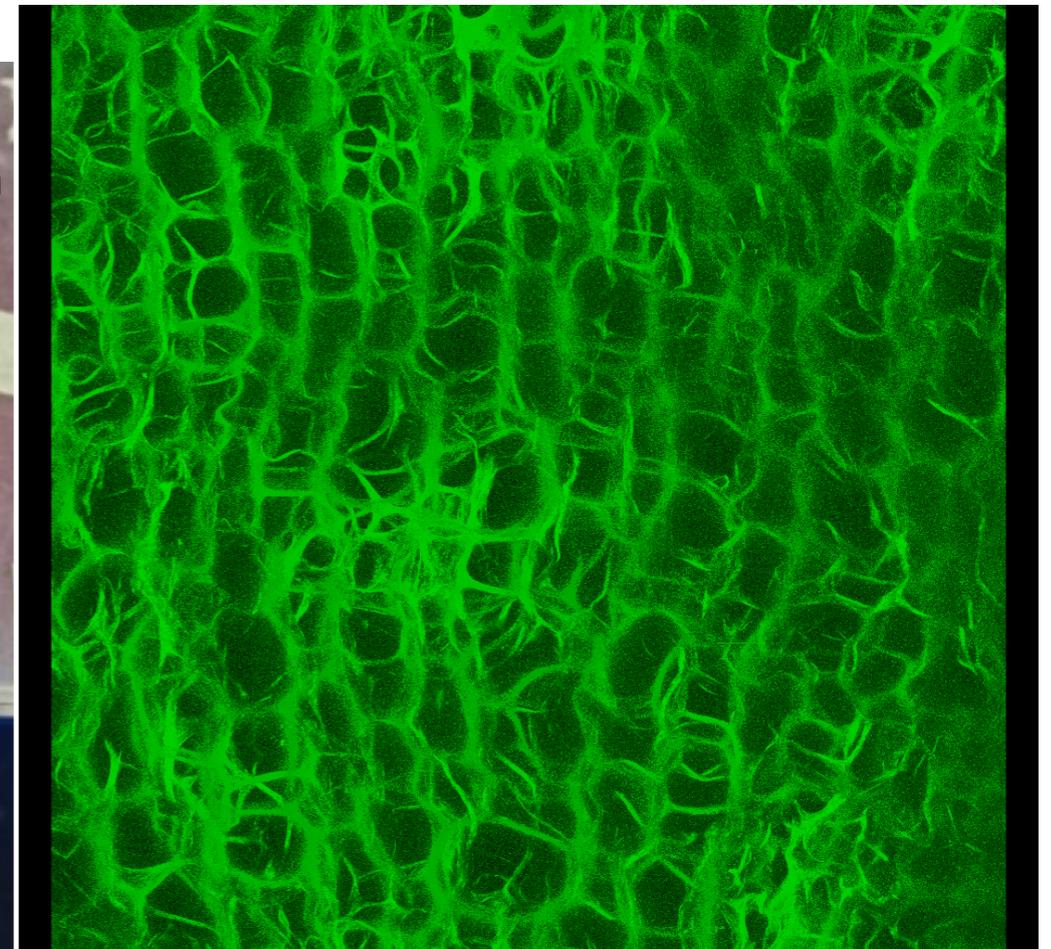
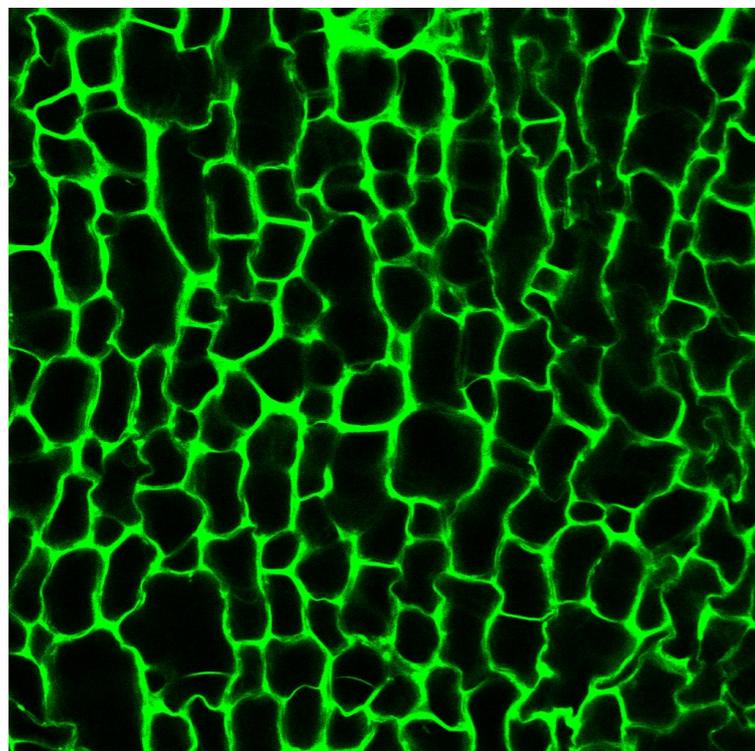
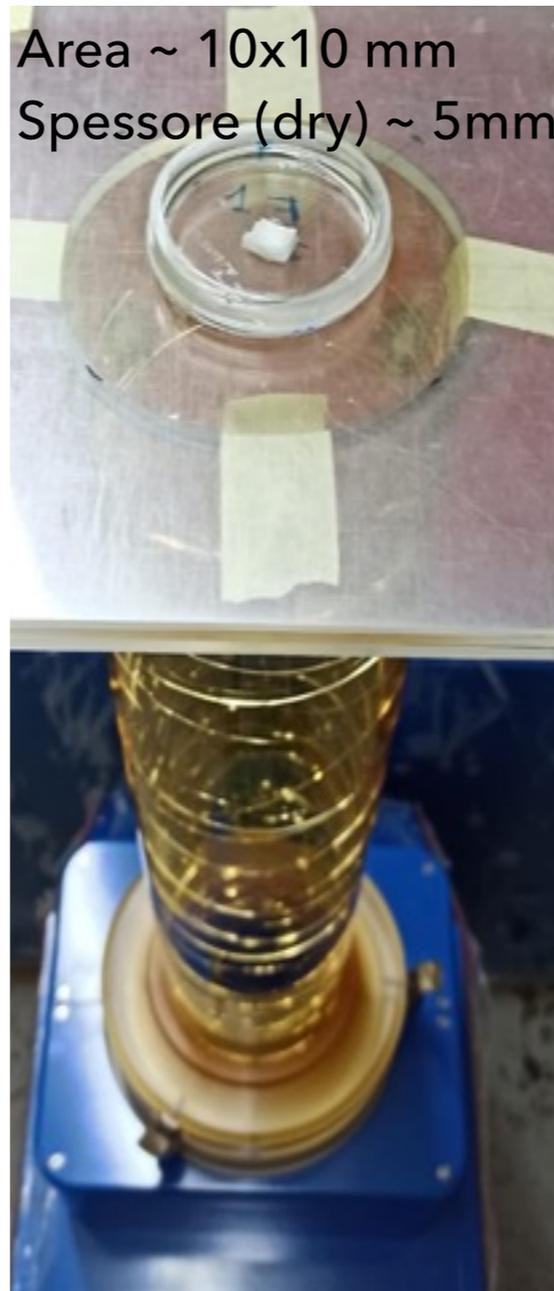


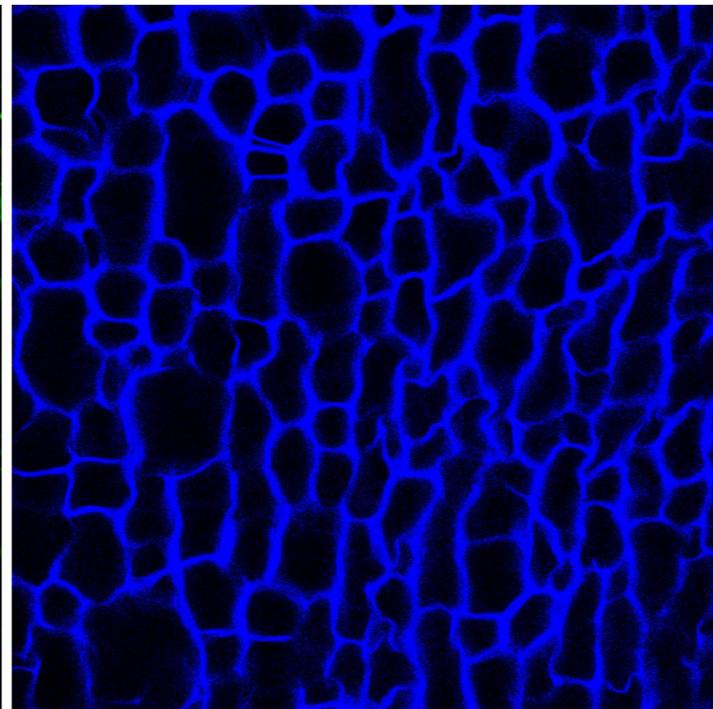
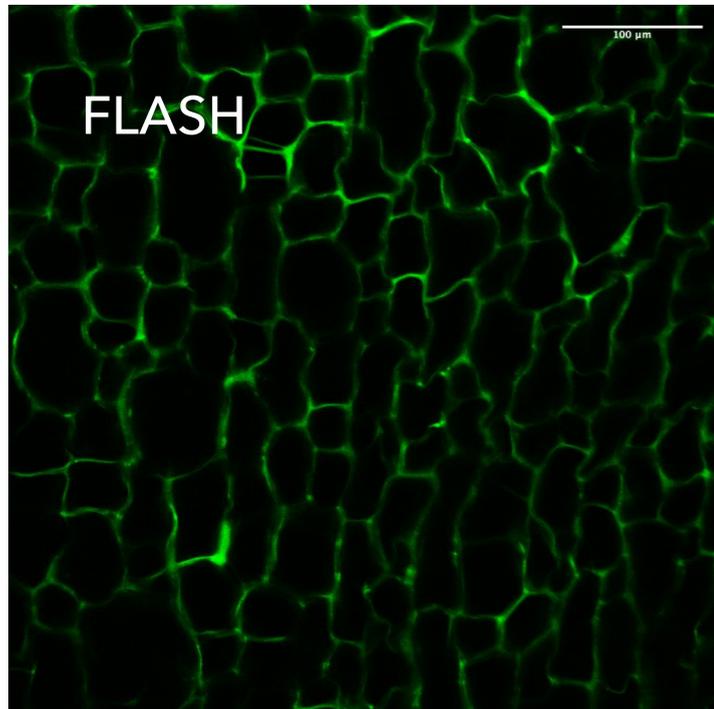
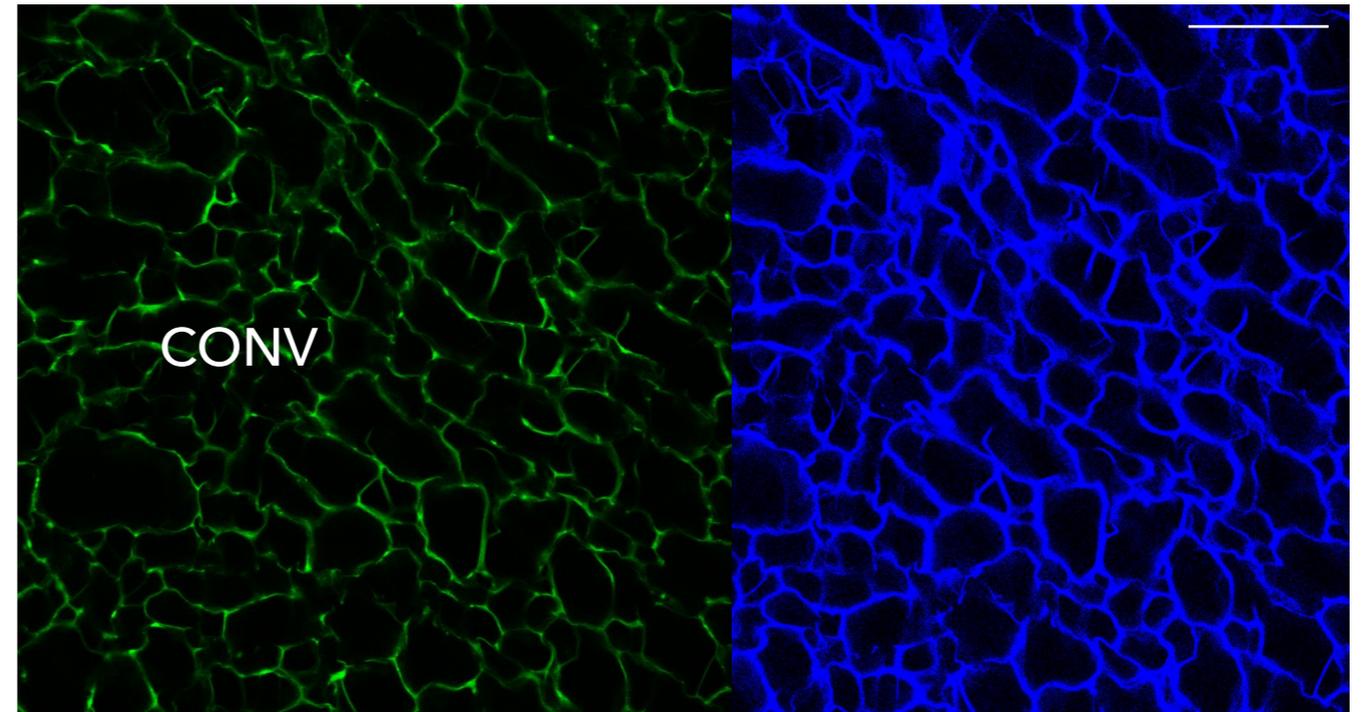
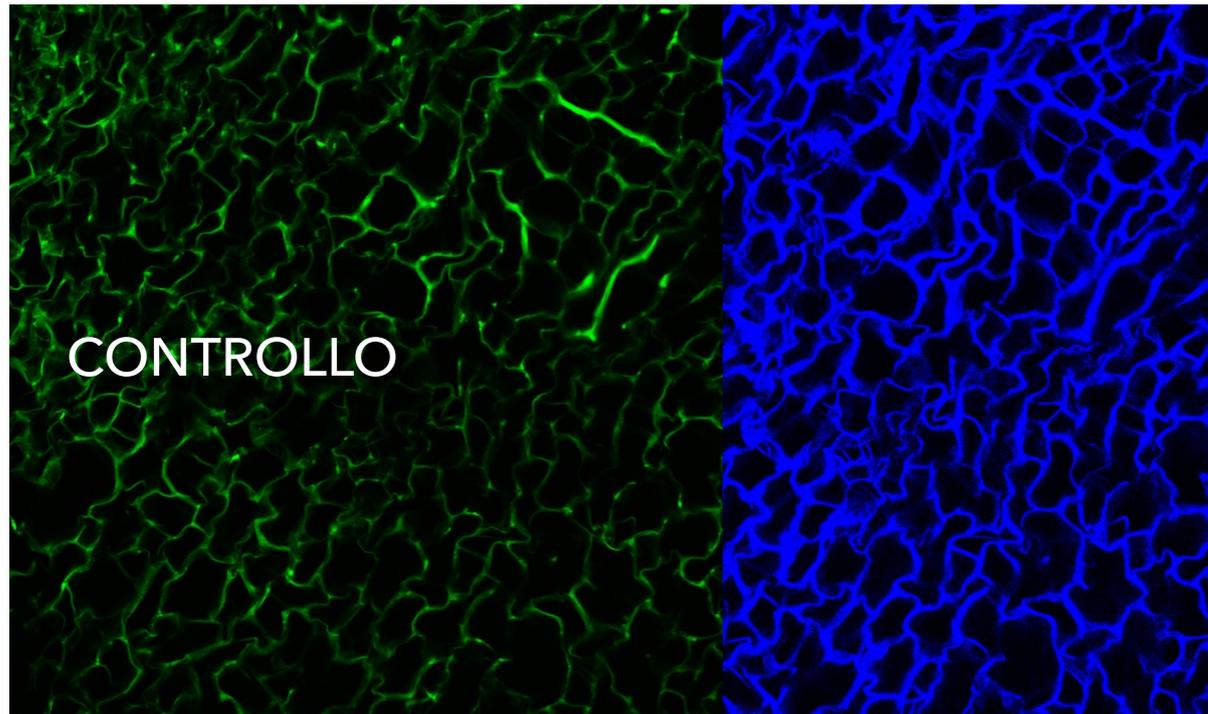
Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation

SISTEMA 3D
Esperimento 0.0

Verifica modello 3d - collagene in PBS Controllo - CONV - FLASH (elletroni)

	FLASH	CONV
Gy/pulse	2,4	$4.6 \cdot 10^{-2}$
Dose rate (Gy/s)	500	0,17
PRF (Hz)	208	4
Dose (Gy)	31	31

Area ~ 10x10 mm
Spessore (dry) ~ 5mm



$$P_{2\omega,y} = \beta_{yyy}E_{\omega,y}^2 + \beta_{yxx}E_{\omega,x}^2$$

$$P_{2\omega,x} = \beta_{yxx}E_{\omega,x}E_{\omega,y},$$

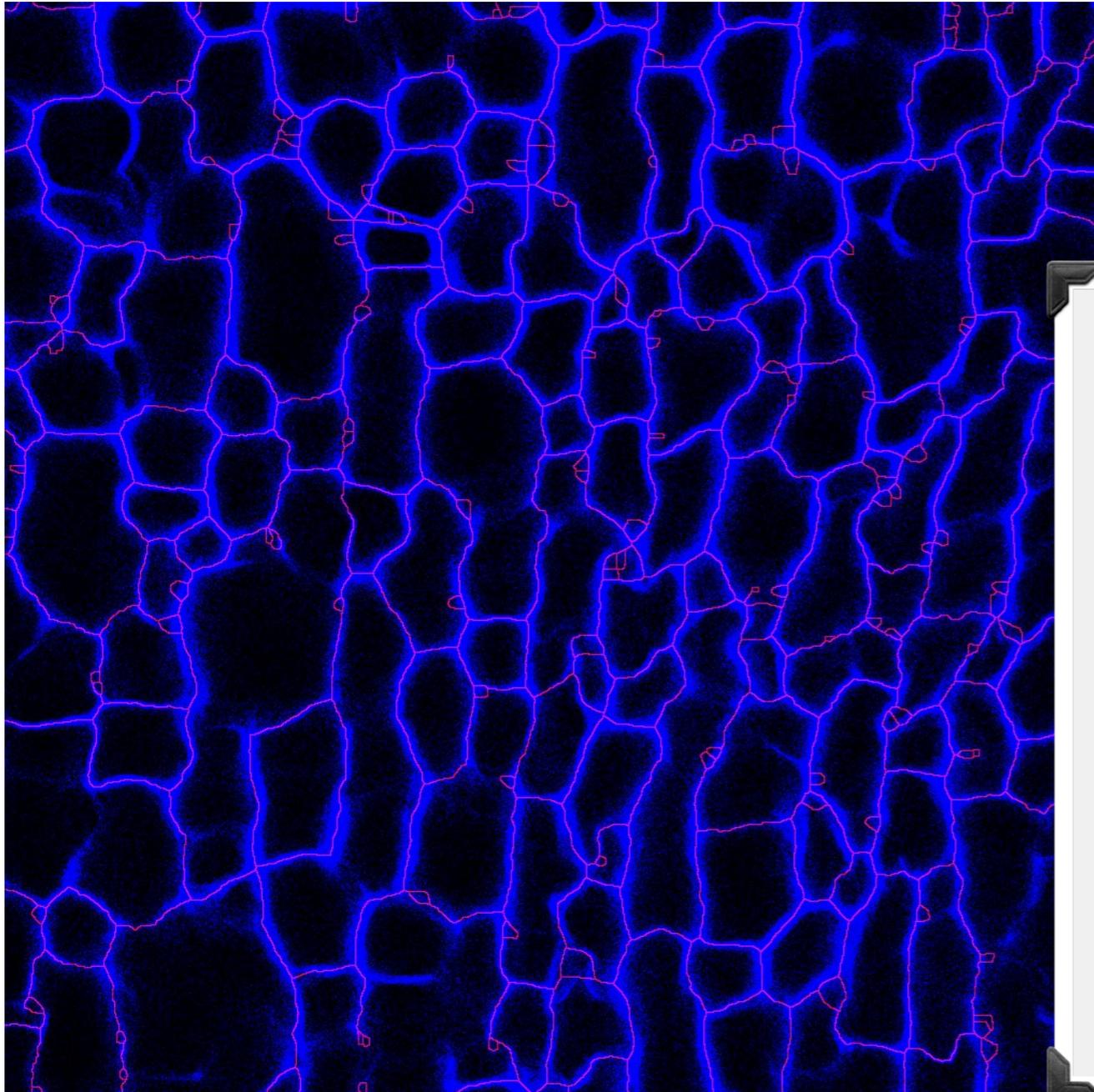
$$I_y(\Phi) = I_p[\rho \cos^2 \Phi + \sin^2 \Phi]^2$$

$$I_x(\Phi) = I_p[\sin 2\Phi]^2,$$

I_p intensità totale misurata con fascio polarizzato perpendicolare mentre

$$\rho = \beta_{yyy}/\beta_{xxx}$$

È la misura della polarizzazione della fibra



La distribuzione dell'area delle celle presenta una variabilità che non può essere imputata agli irraggiamenti

