

## **DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO**

### **Proposta di assegnazione di una borsa di Dottorato**

**Titolo della ricerca: “Il lievito come strumento per lo studio dell’invecchiamento e delle malattie ad esso correlate”**

**Docente guida proposto:** Cristina Mazzoni

### **DESCRIZIONE DELLA RICERCA**

#### **Obiettivi della ricerca (max 4000 car.):**

La maggior parte delle cellule eucariotiche in coltura, dopo un limitato numero di divisioni intraprende un arresto di crescita definito senescenza cellulare o invecchiamento. La relazione tra invecchiamento e apoptosi è a tutt'oggi sconosciuta. Infatti, se è vero che in animali vecchi sottoposti a stress genotossici la risposta apoptotica è attenuata, un gran numero di dati dimostra una correlazione tra disfunzioni mitocondriali, stress ossidativo e invecchiamento in tutti i viventi. Durante l'invecchiamento aumenta la concentrazione di macromolecole danneggiate dallo stress ossidativo, mitocondri aberranti e aumenta la percentuale di cellule che vanno in apoptosi.

Lo studio della relazione tra invecchiamento e apoptosi è complicata dalla difficoltà di trovare modelli sperimentali.

Infatti, poiché tale ricerca in ambito clinico richiede tempi lunghi, è molto costosa ed è limitata da problemi etici, l'impiego del lievito *S. cerevisiae* fornisce una valida alternativa.

L'invecchiamento cellulare studiato in *S. cerevisiae* può essere di tre tipi. Il primo, denominato RLS (Replicative Life Span), è una misura del numero di eventi mitotici che una cellula madre subisce prima della senescenza e può fornire un buon modello per lo studio dell'invecchiamento di cellule proliferanti (i.e. cellule staminali). Il secondo, denominato CLS (Chronological Life Span), è la misura della percentuale di cellule vitali in colture liquide in fase stazionaria e può rappresentare un modello d'invecchiamento per cellule in tessuti post-mitotici.

Il terzo, denominato invecchiamento Clonale (CILS – clonal life span) permette lo studio dell'invecchiamento della singola cellula isolata dalle altre per micromanipolazione e fatta crescere da sola. Questo processo evita l'interferenza sulla crescita da parte delle altre colonie (Mazzoni et al., 2012).

In lievito è stato dimostrato che cellule invecchiate, sia nel RLS e nel CLS, mostrano i tipici marcatori cellulari dell'apoptosi, indicando che in questo microrganismo esiste una stretta relazione tra invecchiamento e apoptosi (LAUN et al., 2001, HERKER et al., 2004). Inoltre, lo stress ossidativo svolge un ruolo chiave in tutti e tre i processi (MADEO et al. 1999).

Oltre ai tipici marcatori cellulari dell'apoptosi, nel lievito *S. cerevisiae* sono stati identificati geni omologhi sia degli esecutori che degli inibitori dell'apoptosi nei mammiferi, come per esempio una caspasi, un AIF (Apoptosis Inducine Factor), un Endonucleasi G, la serin proteasi OMI e la IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) *BIR1*. Inoltre, sono state descritte in lievito stimoli sia extracellulari che intracellulari in grado di indurre la morte cellulare programmata (FALCONE and MAZZONI, 2006;).

Queste considerazioni, insieme con la disponibilità della sequenza completa del genoma e la facilità di manipolazione genetica e molecolare, fanno del lievito un ottimo sistema modello per lo studio di processi che possono interferire con la normale regolazione del processo dell'apoptosi e dell'invecchiamento (BREITENBACH et al., 2003; MADEO et al., 2004).

Gli obiettivi di questa ricerca sono lo studio di geni coinvolti nell'invecchiamento e nel processo apoptotico osservato in lievito. Si vogliono inoltre creare dei modelli sperimentali di malattie umane tramite l'espressione dei geni coinvolti in cellule di lievito, allo scopo di studiare la progressione della malattia in un modello cellulare più semplice e per avere una piattaforma volta allo screening di molecole con attività terapeutiche. Le molecole selezionate potranno essere utilizzate per ulteriori studi in modelli avanzati.

## REFERENZE

HERKER et al., J Cell Biol. 164:501-504

LAUN et al., 2001. Mol Microbiol 39:1166-1173

MADEO, F., et al., 1999. J Cell Biol 145: 757-767

BREITENBACH et al., 2003. Topics in Current Genetics Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

MADEO et al., 2004. Curr Opin Microbiol, 7, 655-660.

FALCONE and MAZZONI, 2016. Cell Mol Life Sci.

MAZZONI et al., 2012 Front Oncol. 2012;2:203. doi: 10.3389/fonc.2012.00203.

## Stato delle conoscenze e referenze (max 4000 car.):

In lievito è stato dimostrato che cellule invecchiate, sia nel RLS e nel CLS, mostrano i tipici marcatori cellulari dell'apoptosi, indicando che in questo microrganismo esiste una stretta relazione tra invecchiamento e apoptosi (LAUN et al., 2001, HERKER et al., 2004). Inoltre, lo stress ossidativo svolge un ruolo chiave in tutti e tre i processi (MADEO et al. 1999).

Anche se è ormai chiaro che il lievito può effettivamente subire un suicidio cellulare, la terminologia corrispondente per descrivere questo processo multiforme rimane eterogenea e potenzialmente errata. Quindi, seguendo le indicazioni del Comitato per la Nomenclatura sulla morte cellulare (NCCD) e adattandole alle particolarità di *S. cerevisiae*, la comunità di ricerca sulla morte cellulare in lievito ha recentemente proposto dei criteri unificati per la definizione di casi accidentali, regolati e forme programmate di morte cellulare in lievito basate su una serie di criteri morfologici e biochimici (CARMONA GUTIERREZ et al., 2018).

In lavori precedenti, abbiamo dimostrato che tutti i mutanti di *S. cerevisiae* con ridotta attività di decapping degli mRNA vanno in apoptosi quando raggiungono la fase stazionaria (MAZZONI e FALCONE 2001; MAZZONI et al. 2003a; MAZZONI et al. 2003b). Il fenomeno apoptotico osservato nel mutante *Kllsm4Δ1* è caspasi-dipendente dal momento che la delezione di *YCA1*, che codifica la metacaspasi di lievito, previene la frammentazione mitocondriale e la rapida morte cellulare durante l'invecchiamento delle colture (MAZZONI et al. 2005a). Inoltre, la proteina tronca *Kllsm4Δ1p* non è in grado di associarsi ai P-bodies (MAZZONI et al., 2007).

I mutanti nel decapping degli mRNA mostrano un'aumentata sensibilità all'acqua ossigenata e all'acido acetico, noti induttori dell'apoptosi, e a droghe quali la caffeina, il benomyl e il calcofluoro (MAZZONI et al. 2003a).

L'aumentata sensibilità del mutante *Kllsm4Δ1* ad agenti che inducono l'apoptosi ha reso questo ceppo uno strumento interessante sia per l'isolamento di geni coinvolti nella morte cellulare programmata (MAZZONI et al. 2005; MAZZONI et al., 2009; PALERMO et al., 20015), sia come piattaforma per saggiare l'effetto di molecole o composti naturali sull'invecchiamento (PALERMO et al., 2012; STIRPE et al., 2017).

Sono disponibili anche mutanti nei singoli geni coinvolti nel processo di morte cellulare programmata che sono stati utilizzati per l'espressione di geni umani selvatici o loro forme mutate (PALERMO et al., 2013; MUSCOLINI et al., 2011; REINA et al., 2010; DE PINTO et al., 2010). Inoltre, il lievito può essere usato come una piattaforma per la scoperta di farmaci anti-invecchiamento. Ad esempio, gli studi basati sul lievito hanno portato alla scoperta del resveratrolo o della spermidina come potenziali agenti anti-invecchiamento. Infine, il lievito viene attualmente impiegato come modello per ricreare malattie legate all'invecchiamento, come per esempio le malattie neurodegenerative (Sampaio-Marques B et al., 2019).

## Referenze

- HERKER, E. et al., J Cell Biol. 164:501-504  
LAUN, P. et al., 2001. Mol Microbiol 39:1166-1173  
LUDOVICO, P., et al., 2002. Mol Biol Cell 13:2598-2606  
MADEO, F., et al., 1999. J Cell Biol 145: 757-767  
CARMONA GUTIERREZ et al., 2018 Microb Cell. 2018 Jan 1;5(1):4-31. doi: 10.15698/mic2018.01.607  
MAZZONI, C., and C. FALCONE, 2001. Yeast 18: 1249-1256  
MAZZONI, C., et al., 2003a. FEMS Yeast Res 4: 29-35  
MAZZONI, C., et al., 2003b. Mol Biol Cell 14: 721-729  
MAZZONI, C., et al., 2005a. EMBO Rep. 6: 1076-81  
MAZZONI, C. et al., 2005b. FEMS Yeast Res.6: 421-7  
MAZZONI, C. et al., 2007. FEBSLetters 581(25):4836-40  
MAZZONI, C et al., 2009 Yeast. Jan;26(1):31-7  
PALERMO V et al., 2010 Aging Cell. 2010 Aug;9(4):570-9.  
PALERMO, V et al., 2015 FEMSYR. Nov;15(7)  
PALERMO V et al., 2012 Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:491759  
STIRPE M et al., 2017 BMC Complement Altern Med. 2017 Apr 5;17(1):200.  
PALERMO V et al., FEMS Yeast Res. 2013 Jul 23. doi: 10.1111/1567-1364.12067  
REINA S et al., 2010 FEBS Letters, 2010 Jul 2;584(13):2837-44.  
DE PINTO V et al., 2010 Biochimica et Biophysica Acta BBA – Bioenergetics, 2010, June - July;1797(6-7):1268-1275.  
SAMPAIO-MARQUIS Prog Mol Subcell Biol. 2019;58:217-242. doi: 10.1007/978-3-030-13035-0\_9.  
MUSCOLINI M et al., 2011 J Biol Chem. 2011 Nov 18;286(46):39693-702. Epub 2011 Sep 27

## Lavori pubblicati dal Docente Guida e riguardanti l'argomento di studio (2010-2019)

Guaragnella N, Stirpe M, Marzulli D, Mazzoni C, Giannattasio S.

Acid Stress Triggers Resistance to Acetic Acid-Induced Regulated Cell Death through Hog1 Activation Which Requires RTG2 in Yeast.

Oxid Med Cell Longev. 2019 Feb 25;2019:4651062. doi: 10.1155/2019/4651062. eCollection 2019.

Giannattasio S, Mazzoni C.

Editorial: Yeast cell aging and death.

FEMS Yeast Res. 2018 Dec 1;18(8). doi: 10.1093/femsyr/foy083

Falcone C, Mazzoni C.

RNA stability and metabolism in regulated cell death, aging and diseases.

FEMS Yeast Res. 2018 Sep 1;18(6). doi: 10.1093/femsyr/foy050.

Carmona-Gutierrez D, Bauer MA, Zimmermann A, Aguilera A, Austriaco N, Ayscough K, Balzan R, Bar-Nun S, Barrientos A, Belenky P, Blondel M, Braun RJ, Breitenbach M, Burhans WC, Büttner S, Cavalieri D, Chang M, Cooper KF, Côte-Real M, Costa V, Cullin C, Dawes I, Dengjel J, Dickman MB, Eisenberg T, Fahrenkrog B, Fasel N, Fröhlich KU, Gargouri A, Giannattasio S, Goffrini P, Gourlay CW, Grant CM, Greenwood MT, Guaragnella N, Heger T, Heinisch J, Herker E, Herrmann JM, Hofer S, Jiménez-Ruiz A, Jungwirth H, Kainz K, Kontoyiannis DP, Ludovico P, Manon S, Martegani E, Mazzoni C, Megeney LA, Meisinger C, Nielsen J, Nyström T, Osiewacz HD, Outeiro TF, Park HO, Pendl T, Petranovic D, Picot S, Polčic P, Powers T, Ramsdale M, Rinnerthaler M, Rockenfeller P, Ruckenstuhl C, Schaffrath R, Segovia M, Severin FF, Sharon A, Sigrist SJ, Sommer-Ruck C, Sousa MJ, Thevelein JM, Thevissen K, Titorenko V, Toledano MB, Tuite M, Vögtle FN, Westermann B, Winderickx J, Wissing S, Wölfl S, Zhang ZJ, Zhao RY, Zhou B, Galluzzi L, Kroemer G, Madeo F.

Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature.

Microb Cell. 2018 Jan 1;5(1):4-31. doi: 10.15698/mic2018.01.607. Review.

Stirpe M, Palermo V, Bianchi MM, Silvestri R, Falcone C, Tenore G, Novellino E, Mazzoni C.

Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca) extracts act against stress and ageing in *S. cerevisiae* yeast cells. BMC Complement Altern Med. 2017 Apr 5;17(1):200. doi: 10.1186/s12906-017-1666-7.

Stirpe M, Palermo V, Ferrari M, Mroczek S, Kufel J, Falcone C, Mazzoni C.

Increased levels of RNA oxidation enhance the reversion frequency in aging pro-apoptotic yeast mutants.

Apoptosis. 2017 Feb;22(2):200-206. doi: 10.1007/s10495-016-1319-1.

PMID: 27803986

Falcone C, Mazzoni C.

External and internal triggers of cell death in yeast.

Cell Mol Life Sci. 2016 Apr 5. [Epub ahead of print] Review.

Palermo V, Stirpe M, Torella M, Falcone C, Mazzoni C.

NEM1 acts as a suppressor of apoptotic phenotypes in LSM4 yeast mutants.

FEMS Yeast Res. 2015 Nov;15(7). pii: fov074. doi: 10.1093/femsyr/fov074.

Guaragnella N, Palermo V, Galli A, Moro L, Mazzoni C, Giannattasio S.

The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2.

FEMS Yeast Res. 2014 Feb;14(1):2-16. doi: 10.1111/1567-1364.12094.

Mazzoni C, Giannattasio S, Winderickx J, Ludovico P.

Yeast stress, aging, and death.

Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:684395. doi: 10.1155/2013/684395. Epub 2013 Dec 2. No abstract available.

Palermo V, Mangiapelo E, Piloto C, Pieri L, Muscolini M, Tuosto L, Mazzoni C.

p53 death signal is mainly mediated by Nuc1(EndoG) in the yeast *S. cerevisiae*.

FEMS Yeast Res. 2013 Jul 23. doi: 10.1111/1567-1364.12067. [Epub ahead of print]

Guaragnella N, Palermo V, Burhans WC, Gourlay CW, Ludovico P, Madeo F, Giannattasio S, Mazzoni C.

Yeast between life and death: a summary of the Ninth International Meeting on Yeast Apoptosis in Rome, Italy, 17-20 September 2012.

Cell Death Differ. 2013 Sep;20(9):1281-3. doi: 10.1038/cdd.2013.71. Epub 2013 Jun 28.

Mazzoni C, Mangiapelo E, Palermo V, Falcone C.

Hypothesis: is yeast a clock model to study the onset of humans aging phenotypes?

Front Oncol. 2012;2:203. doi: 10.3389/fonc.2012.00203. Epub 2012 Dec 31

Palermo V, Mattivi F, Silvestri R, La Regina G, Falcone C, Mazzoni C.

Apple can act as anti-aging on yeast cells.

Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:491759. Epub 2012 Aug 30.

Mazzoni C, Falcone C. The importance of mitochondrial fusion in aging. Cell Cycle. 2011 Nov 1;10(21):3631. Epub 2011 Nov 1

Muscolini M, Montagni E, Palermo V, Di Agostino S, Gu W, Abdelmoula-Soussi S, Mazzoni C, Blandino G, Tuosto L. The cancer-associated K351N mutation affects the ubiquitination and the translocation to mitochondria of p53 protein. J Biol Chem. 2011 Nov 18;286(46):39693-702. Epub 2011 Sep 27.

Mazzoni C, Falcone C

mRNA stability and control of cell proliferation

Biochem Soc Trans. 2011 Oct 1;39(5):1461-5.

Palermo V, Pieri L, Silvestri R, La Regina G, Falcone C, Mazzoni C.

Drug-induced inhibition of tubulin polymerization induces mitochondrion-mediated apoptosis in yeast.

Cell Cycle. 2011 Sep 15;10(18). [Epub ahead of print]

Carmona-Gutierrez D, Ruckstuhl C, Bauer MA, Netzberger C, Eisenberg T, Braun RJ, Rockenfeller P, Khoury CM, Moitzi B, Sommer C, Ring J, Schroeder S, Habernig L, Mazzoni C, Winderickx J, Gurlay CW, Madeo F.

A new Canterbury tale: the eighth International Meeting on Yeast Apoptosis in Canterbury, UK, 2-6 May 2011.

Cell Death Differ. 2011 Sep 2. doi: 10.1038/cdd.2011.115. [Epub ahead of print] No abstract available.

Palermo V, Silvestri R, La Regina G, Falcone C, Mazzoni C

*S. cerevisiae* as a model for the study of new therapeutic molecules

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 150: S412-S412 Suppl. 1 NOV 2010

ISSN: 0168-1656

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.556

29-char Source Abbrev.: J BIOTECHNOL

ISO Source Abbrev.: J. Biotechnol.

Source Item Page Count: 1

Subject Category: Biotechnology & Applied Microbiology

ISI Document Delivery No.: 741OQ

Palermo V, Cundari E, Mangiapelo E, Falcone C, Mazzoni C

Yeast lsm pro-apoptotic mutants show defects in S-phase entry and progression.

Cell Cycle. 2010 Oct 1;9(19): 3991 - 3996

Mazzoni C

Fat: love it to death!

Cell Cycle. 2010 Aug 15;9(16):3149. Epub 2010 Aug 15

Palermo V, Falcone C, Calvani M, Mazzoni C

Acetyl-L-carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission.

Aging Cell. 2010 Aug;9(4):570-9. Epub 2010 Jun 9

Reina S, Palermo V, Guarnera A, Guarino F, Messina A, Mazzoni C, De Pinto V.

Swapping of the N-terminus of VDAC1 with VDAC3 restores full activity of the channel and confers anti-aging features to the cell

FEBS Letters, 2010 Jul 2;584(13):2837-44. Epub 2010 Apr 29.

De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, Messina A, Reina S, Flora, Tomasello FM, Palermo V, Mazzoni C.

Characterization of human VDAC isoforms: a peculiar function for VDAC3?

Biochimica et Biophysica Acta BBA – Bioenergetics, 2010, June - July;1797(6-7):1268-1275. Epub 2010 Feb 6.

**Fondi disponibili per svolgere il programma di ricerca.**

ATENEIO 2018

**Pending**

Richiesta di Fondi Ateneo 2019

Contratti di ricerca con aziende private (in via di definizione)

**Collaborazioni con laboratori nazionali ed internazionali**

Prof. Dr. Frank Francesco Madeo  
Institute for Molecular Biosciences  
Universitätsplatz2  
8010 Graz

Dr. Sergio Giannattasio  
senior scientist  
National Research Council  
Institute of Biomembranes and Bioenergetics  
Via Amendola 165A  
70126 BARI – ITALY

Prof. Valter Longo  
Andrus Gerontology Center  
Division of Biogerontology  
University of Southern California  
3715 McClintock Avenue  
Los Angeles  
CA 90089-0191, USA