

Relazione sull'attività e le ricerche svolte durante il periodo di Dottorato all'estero (2015-2016)

Durante il mio dottorato di ricerca in Neuroscienze ho trascorso un tempo di 13 mesi presso l'Università della California San Diego (UCSD) presso il dipartimento di Patologia del Prof. Steven Gonias, durante il quale mi sono occupata di diversi progetti e in particolare mi sono concentrata sul Signaling del recettore per le lipoproteine, LRP1, nei microdomini lipidici "lipid rafts".

I raft lipidici sono microdomini di membrana, costituiti da un assemblamento dinamico di colesterolo e glicosfolipidi. Essi sembrano avere un ruolo centrale in diversi processi cellulari, controllando l'iniziazione, la propagazione e il mantenimento del segnale prodotto nella membrana plasmatica. Diversi recettori con attività kinasica, tra cui il Low-density lipoprotein receptor-1 (LRP1), sono stati identificati all'interno dei microdomini di membrana.

Scopo del mio progetto è stato analizzare il ruolo e la localizzazione di Lrp1 nei Lipid rafts.

Ho eseguito l'isolamento dei lipid rafts tramite ultracentrifugazione in gradiente di Saccarosio, che mi ha permesso di identificare la presenza di LRP1 nei Lipid rafts di linee neuronali, quali cellule PC12 e N2a; mentre non ho riscontrato la presenza di LRP1 in cellule CHO-K1 e VSMCs.

In particolare, per confermare l'interazione di LRP1 nei lipid rafts, ho analizzato le frazioni di membrana resistenti ai detergenti (DRM), raccolte in seguito a ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio discontinuo al 5-45%. Dal gradiente sono state raccolte, dall'alto verso il basso, 10 frazioni da 0.5 ml ciascuna; le frazioni 4-7, corrispondenti alla banda opaca migrata all'interfaccia 5%-30% di saccarosio, contengono i lipid raft, componenti di membrana a bassa densità di galleggiamento resistenti ai detergenti (DRM). Le frazioni dalla 8 alla 10 vengono chiamate high density fractions (HDF). Tramite analisi di Western blot è stata riconfermata e rivelata la presenza di LRP1 sia nelle frazioni DRM e HDF.

Altro obiettivo è stato comprovare il ruolo essenziale dei lipid rafts nei vari pathway di signaling di LRP1. È stato dimostrato precedentemente che nelle linee N2a e PC12 si ha una fosforilazione di ERK1/2 (appartenente alla famiglia delle MAP chinasi) dipendente da LRP1, che può essere inibita tramite il silenziamento e l'inibizione di LRP1. I Ligandi di LRP1, quali tissue-type plasminogen activator (tPA) e alpha2macroglobulina ( $\alpha_2M$ ), sono in grado di attivare la fosforilazione di ERK1/2 solo in presenza dei lipid rafts. In quanto, tramite esperimenti di deplezione del colesterolo di membrana con MCD 10mM a 30', si è potuto osservare un malfunzionamento e una inibizione dell'attivazione di ERK.

È stato anche analizzato il binding del ligando specifico  $\alpha_2M^*$  radio-iodinato su cellule PC12 a 4 °C. Le cellule sono state prima trattate con 1 mM M $\beta$ CD o con PBS per 30 min e poi portate a 4 °C. Sono state usate concentrazioni di  $^{125}I$ - $\alpha_2M^*$  dallo 0,1 al 15 nM. Allo stesso tempo le stesse concentrazioni sono state usate in presenza con una concentrazione di  $\alpha_2M^*$  non marcato 100 volte superiore (freddo) per spaziarne l' $^{125}I$ - $\alpha_2M^*$  legato. La  $K_D$  per l' $\alpha_2M^*$ -binding alle cellule PC12 è stato di  $3.7 \pm 1.0$  nM ( $n = 3$ ). La  $B_{max}$ , indice del numero di siti di binding dell' $\alpha_2M^*$ , era pari a  $75 \pm 7$  fmol/mg di proteine cellulari. Valori simili sono stati ritrovati nelle cellule pretrattate con la MetilCiclodestrina, dimostrando che il sequestro

di colesterolo non ha modificato l'espressione e la specificità del recettore LRP1 al suo ligando. L'alterazione del normale funzionamento di ERK, in seguito al sequestro di colesterolo, è stato analizzato anche tramite lo studio della differenziazione e crescita neuronale nelle PC12. Analizzando a microscopio la crescita neuronale delle PC12 in seguito a trattamento di 72h con tPA,  $\alpha$ 2M, e il neural growth factor (NGF), MCD si è dimostrato in grado di bloccare la crescita neuronale e revertire l'effetto di tutti i trattamenti indicati. Questi dati preliminari sottolineano un potenziale ruolo di LRP1 associato a lipid rafts nella normale attività e crescita neuronale.

.Il lavoro è stato pubblicato: .E Laudati; A S Gilder; M S Lam; R Misasi;; M Sorice; S L Gonias; The activities of LDL Receptor-related Protein-1 (LRP1) compartmentalize into distinct plasma membrane microdomains. Molecular and Cellular Neuroscience Aug 2016

Dott.ssa Emilia Laudati