



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – SOTTO - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Nicoletta Pasquariello

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi di Roma “Tor Vergata”

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

A. Finazzi-Agrò

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

12 mesi

Regolazione della metilazione del DNA da parte di mediatori critici della riproduzione.

Introduzione

Di recente, una nuova classe di composti lipidici ad alta attività biologica, gli endocannabinoidi, si sono imposti all'attenzione dei ricercatori per la loro capacità di regolare, sia in vitro che in vivo, diversi processi cellulari. L'azione degli endocannabinoidi si esplica attraverso l'attivazione di recettori cellulari ed è sottoposta ad un "controllo metabolico" che dipende dai livelli endogeni di tali composti, risultato di un regolato equilibrio tra le attività di sintesi e di degradazione. Nell'insieme, gli endocannabinoidi, i loro recettori e gli enzimi che ne regolano il metabolismo formano il "sistema endocannabinoide". Scopo del progetto di ricerca è quello di valutare il ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione dell'espressione genica utilizzando modelli cellulari umani.

Gli Endocannabinoidi

Molti composti di origine naturale sono dotati di attività biologica che si esplica tramite recettori di membrana sulle cellule bersaglio, ai quali si legano per stimolare la risposta cellulare. I cannabinoidi (ed in particolare il principio più attivo, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo, THC) sono composti di origine vegetale estratti dalla canapa (*Cannabis sativa*), i cui bersagli molecolari sono i recettori cannabici di tipo 1 e di tipo 2 (CB1 e CB2). Entrambi questi recettori sono stati scoperti più di 4000 anni dopo il primo utilizzo degli estratti di canapa in medicina popolare, che aveva riconosciuto gli effetti benefici del THC per molte condizioni di alterazione della salute. Poco più di dieci anni fa si è scoperta nei tessuti animali (incluso l'uomo) l'anandamide, un piccolo composto lipidico capace anch'esso di attivare i recettori CB1 e CB2. In breve tempo si sono trovati altri composti lipidici dotati della stessa capacità, chiamati nell'insieme "endocannabinoidi" in analogia con le "endorfine", cioè gli attivatori naturali dei recettori oppioidi.

L'Anandamide (arachidonoiletanolamide, AEA) appartiene ad un'importante classe di lipidi endogeni che include amidi ed esteri di acidi grassi polinsaturi a catena lunga, comunemente chiamati "Endocannabinoidi" (1, 2). L'AEA è rilasciata da neuroni depolarizzati, da cellule endoteliali e dai macrofagi (3), e mima gli effetti farmacologici del Δ^9 -tetraidrocannabinolo, il principio attivo di hashish e marijuana (4). L'AEA extracellulare si lega ai recettori cannabici di tipo 1 e 2 (CB1R and CB2R) (4) esplicando in tal modo molteplici effetti a livello del sistema nervoso centrale e periferico (2, 3). Inoltre, l'AEA è coinvolta nell'attivazione dei recettori vanilloidi di tipo 1 (oggi chiamati recettori vanilloidi potenziali transienti) in un sito intracellulare (5, 6). I livelli endogeni di AEA sono controllati in maniera strettamente coordinata attraverso l'ingresso cellulare mediato da un putativo trasportatore di membrana (AMT) (7, 8) e la sua degradazione da parte dell'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) (9). Invece, il punto di controllo della sintesi dell'AEA è la fosfolipasi D N-acil-fosfotidiletanolamina (NAPE-PLD) che rilascia l'AEA on demand a partire dalla membrana (10). Un'acquisizione importante della ricerca negli ultimi mesi è il fatto che l'attività biologica dell'AEA subisce un "controllo metabolico", vale a dire che dipende essenzialmente dai livelli endogeni del composto, piuttosto che da una modulazione della sensibilità dei suoi bersagli molecolari. In particolare, la FAAH sembra essere il perno di questo controllo metabolico, al punto che topi transgenici nei quali il gene codificante l'enzima è stato eliminato ("topi knockout") hanno livelli di AEA circa 15 volte più alti dei topi normali.

Un altro endocannabinoide di grande interesse è il 2- arachidonoilglicerolo (2-AG), di cui sono stati recentemente caratterizzati specifici enzimi metabolici (11, 12) ed è ancora oggetto di numerosi studi volti a interpretare il suo significato fisiologico (13). Insieme l'AEA e il 2-AG, con tutte le altre componenti che legano e metabolizzano tali sostanze, costituiscono il sistema

endocannabinoide (ES) (3, 14). Un ES pienamente funzionale è stato virtualmente trovato in tutti i tessuti ma soprattutto è stato dimostrato un ruolo di rilievo a livello del sistema nervoso centrale (15). Nel sistema periferico gli endocannabinoidi giocano un ruolo cruciale nella modulazione del sistema nervoso autonomo, riproduttivo, endocrino e immunitario (16, 17, 18, 19). Recentemente, l'attenzione è stata focalizzata su un possibile ruolo dell'AEA e degli altri endocannabinoidi nella regolazione della crescita cellulare e del differenziamento. Sempre più evidenze indicano l'AEA come segnale proapoptotico in numerosi tipi cellulari (20, 21). E' stato mostrato che l'AEA sia in grado di attenuare la sensazione di dolore prodotta da un danno chimico a tessuti cutanei, suggerendo un ruolo per il ES nel controllo del dolore (22, 23). In un recente studio del nostro gruppo abbiamo mostrato che i cheratinociti umani possiedono un ES funzionale che li rende in grado di legare e metabolizzare l'AEA; inoltre, il ES è coinvolto nel controllo del differenziamento epidermico attraverso un meccanismo dipendente da CB1R (24). Fra le diverse attività dell'AEA nei tessuti periferici, la regolazione della fertilità ha destato grande interesse (25). Esistono diversi lavori che indicano un ruolo degli endocannabinoidi nella regolazione del sistema riproduttivo femminile. Ad esempio, è stato dimostrato che l'espressione della FAAH è sotto il controllo di segnali di fertilità, come il progesterone e la leptina (26). Inoltre, l'utero di topo contiene la più alta quantità di AEA trovata nei diversi tessuti (Paria and Dey, 2000). Recentemente, è stato proposto un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione del sistema riproduttivo maschile. Infatti, i testicoli di ratto sintetizzano AEA (Sugiura et al., 1996), e questo composto è stato rilevato a concentrazioni nanomolari nel plasma seminale umano (Schuel et al., 2002a). Nel topo, è stata dimostrata la presenza di CB1R nelle cellule di Leydig, dove questo recettore è coinvolto nella secrezione di testosterone (Wenger et al., 2001), mentre le cellule del Sertoli nel topo possiedono CB2R, AMT e FAAH (Maccarrone et al., 2003b), che potrebbero essere coinvolte nella regolazione dello sviluppo delle cellule germinali. Il coinvolgimento dell'AEA nella regolazione delle funzioni spermatiche richieste per la fecondazione è stato proposto anche nell'uomo (Schuel et al., 2002b; Rossato et al., 2004), anche se le basi molecolari di questa regolazione rimangono ancora sconosciute.

Nonostante sia noto che l'amministrazione cronica del Δ^9 -tetrahydrocannabinol, il principio attivo del cannabis, diminuisce la secrezione di testosterone e riduce la produzione, la mobilità e la vitalità degli spermatozoi (Hall and Solowij, 1998), e che induce impotenza nei ratti maschi (Murphy et al., 1994), non è ancora ben chiaro il ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione della fertilità maschile (Paria and Dey, 2000; Park et al., 2003; Maccarrone and Finazzi-Agrò, 2004). Il legame dell'AEA ai recettori CB presenti negli spermatozoi del riccio di mare riduce la loro capacità di fecondazione (Chang et al., 1993; Schuel et al., 1994), e omogenati interi di questi animali sono capaci di convertire N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE) in AEA (Bisogno et al., 1997). Lo sperma eiacolato dei mammiferi, a differenza degli animali inferiori, deve andare incontro ad una maturazione funzionale, in modo da essere in grado di fecondare l'ovocita. Lo sperma acquisisce la capacità di fecondazione nel tratto genitale femminile, dove, dopo diversi cambiamenti fisiologici, diventano "capacitati" (Yanagimachi, 1994). In seguito alla capacitazione, gli spermatozoi subiscono diversi cambiamenti nella testa, rendendoli in grado di legare la zona pellucida e subire la reazione acrosomiale, e nel flagello, facilitando la mobilità spermatica iperattivata. Il controllo di questo processo cruciale coinvolge l'attività dell'adenilato ciclasi (Parrish et al., 1994), la fosforilazione di diverse proteine spermatiche (Visconti et al., 1995; 1998), l'aumento del pH dello sperma (Zeng et al., 1996) e cambiamenti della concentrazione intracellulare di ioni (Fukami et al., 2003; Wennemuth et al., 2003), della fluidità di membrana (Harrison, 1997; Gadella and Harrison, 2000), del metabolismo e della mobilità (Suarez and Ho, 2003). Comunque, risultano ancora da chiarire la sequenza di questi cambiamenti e, in particolare, i meccanismi regolatori locali che permettono alla capacitazione di avvenire solo quando lo spermatozoo si trova in prossimità dell'ovocita.

L'attivazione di diversi geni nei cheratinociti richiede che la struttura della cromatina si apra e che specifiche regioni di promotori vengano demetilate nel genoma. Variazioni nello stato

generale del livello di metilazione in cellule differenziate e proliferanti è stato studiato in un certo numero di modelli (30, 31), ed è stato visto che il DNA dei cheratinociti differenziati contiene una quantità minore di 5-metilcitosine rispetto ai cheratinociti non differenziati (32). Inoltre, sostanze in grado di inibire la metilazione del DNA (ad esempio la 5-azacitidina, 5AC) e la deacetilazione degli istoni (ad esempio il sodio butirato, NaB) inibiscono da un lato la crescita e dall'altro promuovono il differenziamento dei cheratinociti (33, 34, 35). Il nostro gruppo ha precedentemente riportato che nei cheratinociti differenziati si trovano bassi livelli di AEA, dovuti ad aumentati livelli di degradazione del lipide da parte della FAAH e del suo trasporto attraverso l'AMT. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'AEA esogena inibisce in vitro il differenziamento dei cheratinociti, portando a una riduzione dell'involucro corneo e dell'attività transglutaminasica (24). D'altra parte, è stato visto che gli endocannabinoidi regolano la neuritogenesi, la crescita degli assoni e la sinaptogenesi in neuroni differenziati (36, 37), generando l'idea che gli endocannabinoidi siano coinvolti in un generale meccanismo segnale di regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Questo progetto si propone di valutare i meccanismi molecolari influenzati dagli endocannabinoidi, e in particolare dall'AEA, nel controllo del livello di metilazione critico nell'attivazione e nel silenziamento genico. In particolare, andranno investigati gli effetti dell'AEA esogena a livello della regolazione dell'espressione genica dei cheratinociti umani differenziati.

La Metilazione nella fertilità

Durante lo sviluppo degli organismi multicellulari, le diverse cellule seguono differenti programmi di espressione genica sostanzialmente regolati da modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni (1,2). Nello sviluppo normale o in situazioni patologiche, alcune cellule vanno incontro ad una generale "riprogrammazione" epigenetica che stabilisce lo schema di espressione finale che la cellula seguirà. Nella fecondazione si assiste a due fasi distinte di riprogrammazione epigenetica: durante la gametogenesi e nello sviluppo pre-impianto. Il genoma delle cellule germinali primordiali (semplici cellule somatiche all'inizio) subisce una demetilazione del DNA a seguito della quale il genoma dei gameti è metilato de novo e acquisisce il suo imprint finale. Durante la fase di reimpianto avviene una demetilazione passiva del DNA e una ulteriore riorganizzazione delle modificazioni istoniche. Se il genoma paterno è sempre attivamente demetilato, il genoma materno appare epigeneticamente più stabile. La metilazione dunque, diventa un meccanismo fondamentale nel passaggio dalla totipotenza verso il corretto inizio dell'espressione genica embrionale e dello sviluppo stesso dell'embrione. Riprogrammazioni aberranti portano a gravi squilibri e spesso sono alla base delle

OBIETTIVI

L'attività di ricerca che il nostro gruppo si propone di svolgere in modo integrato è riconducibile a tre linee principali che procederanno in maniera sequenziale:

1. Valutare i livelli di espressione di diversi geni, come le cheratine e le transglutaminasi, al fine di costruire una mappa dettagliata di regolazione del macchinario molecolare cellulare in seguito al trattamento con AEA esogena;
2. Seguire le modalità di variazione dello stato di metilazione della cromatina nel genoma e in geni specifici dopo trattamento con AEA in cheratinociti trattati;
3. Valutare se l'azione dell'AEA passi attraverso modificazioni nella metilazione del DNA dei geni coinvolti e se tali modificazioni siano dipendenti dai recettori cannabici di tipo 1 (CB1R) o se esse risultino da interazioni dirette dell'AEA con le metilasi cellulari (DNMT).

METODOLOGIE

Le metodologie d'avanguardia impiegate per il progetto richiedono l'uso di composti radioattivi, di anticorpi e di reagenti chimici speciali per microscopia, biologia molecolare, cromatografia ad alta prestazione, filtrazione ultrarapida, real-time PCR e tecniche enzimologiche.

RISULTATI ATTESI

Dai risultati sperimentali dovrebbero risultare 1) meglio definiti alcuni aspetti fondamentali del processo di espressione genica in relazione allo stato di metilazione osservato, e 2) chiarito il ruolo degli endocannabinoidi (diretto o mediato) nella regolazione dei livelli di metilazione. L'importanza della metilazione del Dna nella fertilità

Bibliografia

1. De Petrocellis, L., Cascio, M. G., and Di Marzo, V. (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Brit. J. Pharmacol.* 141, 765–774
2. Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Gasperi, V., and Maccarrone, M. (2006) New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 257–268
3. Di Marzo, V. (2006) A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 134–140
4. Howlett, A. C. (2005) Cannabinoid receptor signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 168, 53–79
5. De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J. B., Finazzi-Agrò, A., and Di Marzo, V. (2001) The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 12856–12863
6. Jordt, S. E., and Julius, D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108, 421–430
7. Battista, N., Gasperi, V., Fezza, F., and Maccarrone, M. (2005) The anandamide membrane transporter and the therapeutic implications of its inhibition. *Therapy* 2, 141–50
8. Glaser, S. T., Kaczocha, M., and Deutsch, D. G. (2005) Anandamide transport: a critical review. *Life Sci.* 77, 1584–1604
9. McKinney, M. K., and Cravatt, B. F. (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 411–432
10. Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* 279, 5298–5305
11. Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10819–10824
12. Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., and Doherty, P. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid knockout in the brain. *J. Cell Biol.* 163, 463–468

13. Ligresti, A., Cascio, M. G., and Di Marzo, V. (2005) Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 615–623
14. Paradisi, A., Oddi, S., and Maccarrone, M. (2006) The endocannabinoid system in ageing: a new target for drug development. *Curr. Drug Targets* 11, 1539–1552
15. Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873–884
16. Di Marzo, V., and Matias, I. (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 8, 585–589
17. Klein, T. W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 400–411
18. Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., and Pasquali, R. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27, 73–100
19. Wang, H., Dey, S. K., and Maccarrone, M. (2006) Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr. Rev.* 27, 427–448
20. Guzman, M. (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 3, 745–755
21. Maccarrone, M. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in cancer. In *Endocannabinoids: The Brain and Body's Marijuana and Beyond* (CRC Press, ed.) pp. 451–466, Boca Raton, FL., USA
22. Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., and Piomelli, D. (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394, 277–281
23. Walker, J. M., and Huang, S. M. (2002) Endocannabinoids in pain modulation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 235–242
24. Maccarrone, M., Di Rienzo, M., Battista, N., Gasperi, V., Guerrieri, P., Rossi, A., and Finazzi-Agrò, A. (2003) The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 278, 33896–33903
25. Maccarrone M, Finazzi-Agro A. (2004) Anandamide hydrolase: a guardian angel of human reproduction? *Trends Pharmacol Sci.* 7, 353-357. Review.
26. Nemes, Z., and Steinert, P. M. (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5–19
27. Kalinin, A., Marekov, L. N., and Steinert, P. M. (2001) Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell Sci.* 114, 3069–3070
28. Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340
29. Fuchs, E., and Cleveland, D. W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514–519
30. Lorand, L., and Graham, R. M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140–156
31. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. H., Kuo, K. C., McCune, R. A., and Gehrke, C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10, 2709–2721

32. Lyon, S. B., Buonocore, L., and Miller, M. (1987) Naturally occurring methylation inhibitor: DNA hypomethylation and haemoglobin synthesis in human K562 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1759–1763
33. Veres, D. A., Wilkins, L., Coble, D. W., and Lyon, S. B. (1989) DNA methylation and differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 93, 687–690
34. Rosl, F., Durst, M., and Zur Hausen, H. (1988) Selective suppression of human papillomavirus transcription in non-tumorigenic cells by 5-azacytidine. *Embo J.* 7, 1321–1328
35. Schmidt, R., Cathelineau, C., Cavey, M. T., Dionisius, V., Michel, S., Shroot, B., and Reichert, U. (1989) Sodium butyrate selectively antagonizes the inhibitory effect of retinoids on cornified envelope formation in cultured human keratinocytes. *J. Cell Physiol.* 140, 281–287
36. Staiano-Coico, L., Helm, R. E., McMahon, C. K., Pagan-Charry, I., LaBruna, A., Piraino, V., and Higgins, P. (1989) Sodium-N-butyrate induces cytoskeletal rearrangements and formation of cornified envelopes in cultured adult human keratinocytes. *Cell Tissue Kinet.* 22, 361–375
37. Rueda, D., Navarro, B., Martinez-Serrano, A., Guzman, M., and Galve-Roperh, I. (2002) The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 46645–46650
38. Galve-Roperh, I., Aguado, T., Rueda, D., Velasco, G., and Guzman, M. (2006) Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2319–2325