VIAGGIO AL CENTRO DELLA CELLULA

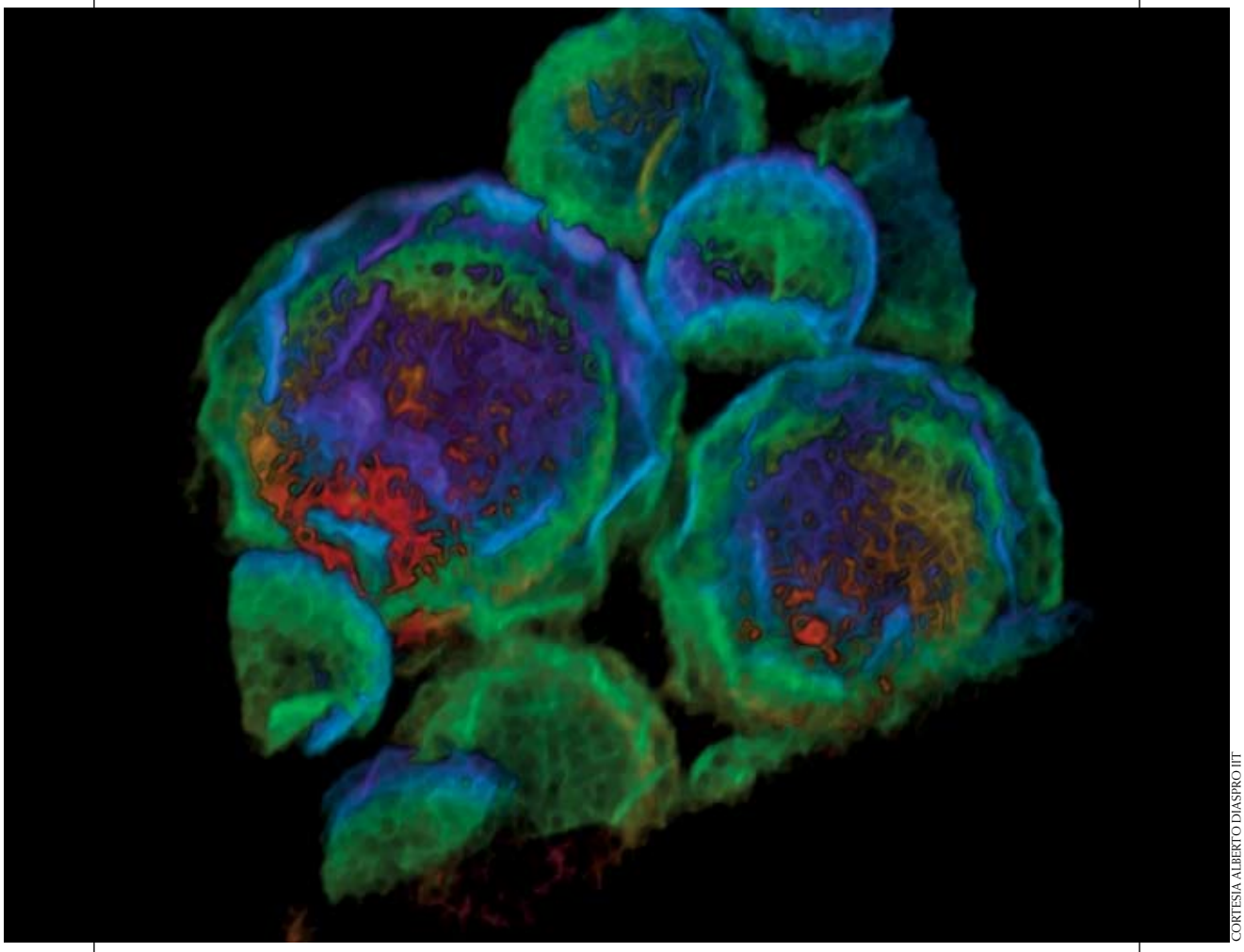
La biologia cellulare ha avuto uno sviluppo impetuoso e ricco di implicazioni a cui ha contribuito in modo decisivo il lavoro di un top scientist italiano

RICCARDO FESCE

Negli ultimi decenni i grandi progressi nelle neuroscienze e nello studio del Dna e della sua regolazione hanno colpito l'immaginazione del grande pubblico, anche per le loro grandi ricadute sulla salute e per la rilevanza delle tematiche bioetiche e sociali che sollevano. Meno adatto agli scoop, di più difficile divulgazione, e pertanto più nascosto, ma certo non meno rilevante per l'avanzamento della nostra comprensione della biologia, delle alterazioni patologiche e delle possibilità di intervento terapeutico, è stato l'altrettanto dirompente sviluppo della biologia cellulare.

Il 30 marzo a Milano si terrà un simposio con premi Nobel e *top scientists* da tutto il mondo per celebrare la carriera di Jacopo Meldolesi, figura di spicco della biologia cellulare italiana e internazionale. È l'occasione per fare il punto su una tematica complessa, raramente agli onori della cronaca, ma aspetto cruciale della organizzazione e funzione cellulare; un insieme di processi il cui corretto operare permette la crescita della cellula, il rinnovamento delle sue strutture, il funzionamento stesso dei sistemi neuronali, ormonali e secretivi in generale. Mentre dal suo malfunzionamento traggono origine numerose patologie endocrine, neurologiche, metaboliche.

Nata essenzialmente come caratterizzazione morfologica e strutturale della cellula e descrizione fenomenologica dei processi che vi si svolgono, la biologia cellulare si è evoluta a una chiara comprensione di gran parte dei meccanismi molecolari che sottendono la proliferazione, la crescita, il differenziamento, lo sviluppo e regolazione di specifiche funzioni cellulari: un reticolo – di straordinaria complessità – di meccanismi di regolazione e segnalazione, all'interno della cellula e tra le diverse cellule. Un gioco le cui protagoniste sono migliaia di proteine che guidano tutte le reazioni biochimiche implicate nel ciclo vitale della cellula e nel suo ruolo per l'organismo, eseguono funzioni meccaniche e di trasporto, riconoscono la presenza di specifiche molecole di segnale, intracellulari e extracellulari (neurotrasmettitori e ormoni). Ma al tempo stesso regolano reciprocamente le loro funzioni e le interazioni tra le membrane delle cellule e dei loro organelli; e in questo rocambolesco gioco coinvolgono anche gli acidi nucleici, ne modificano dinamicamente l'organizzazione e ne orchestrano la trascrizione, facendo del Dna un libro aperto che ogni cellula in ogni momento può leggere in modo specifico e versatile. Un manuale delle regole del gioco, che



CORTESIA ALBERTO DIASPRO IIT

Autofluorescenza delle membrane di *Colpoda maupasi* al microscopio confocale.

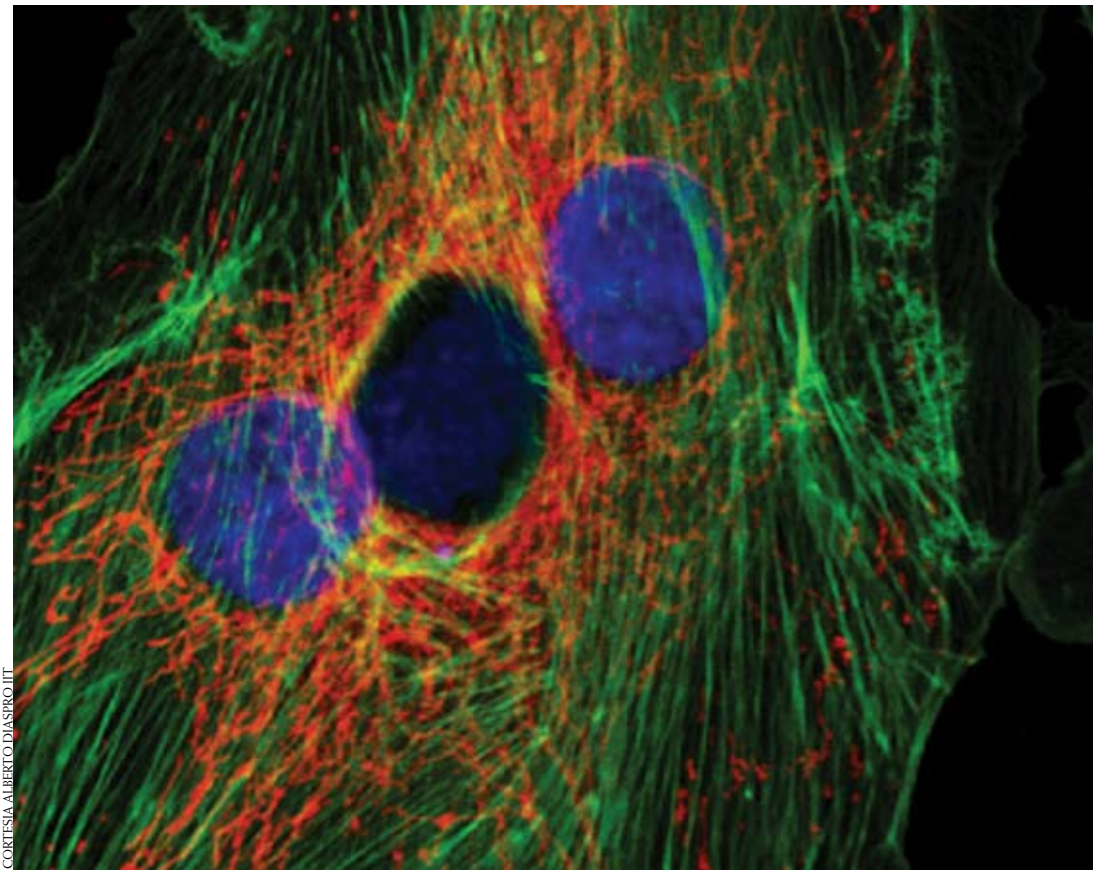
è essenziale, sì, che non contenga errori, ma questo non basta: il sistema di lettura deve poterlo interpretare in modo adeguato, in ogni momento e in risposta ad ogni necessità dello sviluppo e della vita dell'organismo.

In questo complesso intrecciarsi di funzioni molecolari, un ruolo centrale è svolto dalle membrane cellulari e degli organuli citoplasmatici, che separano compartimenti con composizioni e funzioni diverse (nucleo, reticolo, mitocondri, vescicole...), e dai processi di interazione tra le membrane stesse (il cosiddetto *membrane trafficking*) che permettono la genesi degli organelli e il continuo rinnovamento dei loro componenti, e al tempo stesso guidano la localizzazione specifica di proteine, lipidi e soluti nelle varie porzioni della cellula, e il rilascio di trasmettitori, ormoni, enzimi digestivi, grazie alla fusione di vescicole e granuli con la membrana plasmatica.

La storia del *membrane trafficking* e la carriera scientifica di Meldolesi hanno seguito una strada comune, dall'indagine morfologica al microscopio elettronico verso lo studio delle proteine implicate, attraverso il riconoscimento del ruolo cruciale dei calcio ioni nella regolazione dei processi eso/endocitotici, fino al controllo genetico della competenza secretiva e neurosecretiva.

Il *membrane trafficking* come argomento di indagine scientifica è nato circa mezzo secolo fa nel laboratorio di George Palade, prendendo spunto dallo studio morfologico di cellule secretive, ma senza fermarsi agli aspetti descrittivi e fenomenologici, bensì tracciando un quadro interpretativo tuttora valido delle problematiche connesse alla interazione tra lipidi e proteine nei processi di «fusione» e «fissione» di membrane implicati nella esocitosi e endocitosi.

Aspetto cruciale dei meccanismi di eso/endocitosi, sul quale il giovane Meldolesi diede importanti contributi al ritorno in Italia dal laboratorio di Palade, è come essi procedano in modo continuo in alcuni sistemi (secrezione costitutiva) mentre in



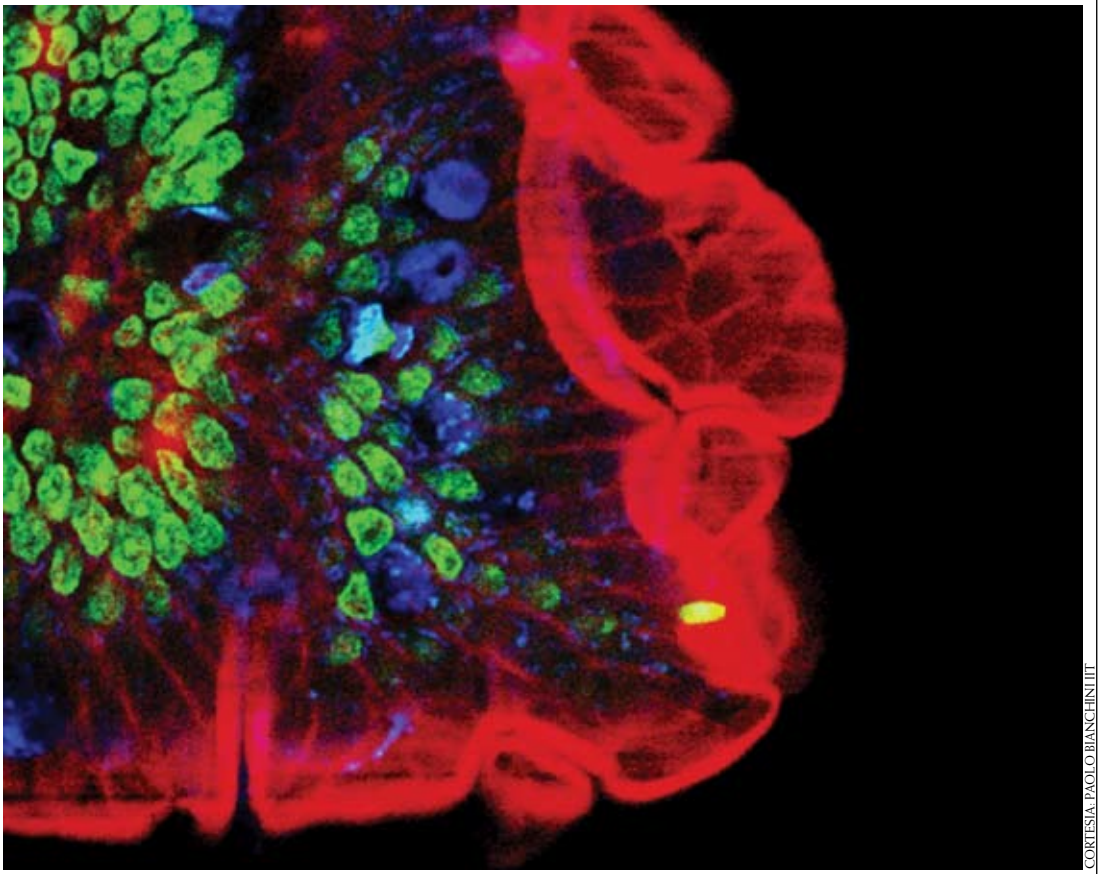
CORTESIA ALBERTO DIASPRO IIT

Ricostruzione tridimensionale di cellule endoteliali al microscopio confocale.

altri l'esocitosi risulti finemente regolata, in modo differenziato in funzione della struttura, composizione e dotazione di proteine specifiche, delle diverse vescicole e granuli secretivi.

Il meccanismo fondamentale di controllo della esocitosi è l'elevazione della concentrazione di ioni calcio (Ca^{2+}). I livelli citosolici di Ca^{2+} sono mantenuti estremamente bassi (10^{-7} M), ed elevazioni anche molto contenute sono in grado di attivare numerosi processi biochimici e funzionali (contrazione, secrezione, fosforilazione e regolazione di proteine e quindi di processi biochimici e biofisici) e complessi programmi cellulari (dalla rielaborazione plastica di cellule e sinapsi nervose all'apoptosi, morte cellulare programmata). Un contributo decisivo alla comprensione di caratteristiche e meccanismi della regolazione omeostatica del Ca^{2+} e della sua ridistribuzione dinamica nei compartimenti cellulari è venuto dallo sviluppo di traccianti fluorescenti, lavoro principalmente sviluppato dal professor Roger Tsien e dal suo gruppo: dapprima molecole appositamente disegnate per restare intrappolate nel citosol e segnalare la concentrazione di calcio ioni grazie al cambiamento delle loro proprietà di fluorescenza (quin, fura-2, indo), poi proteine luminescenti (aequorin) o fluorescenti (la *green fluorescent protein*, GFP, che è valsa a Tsien l'assegnazione del premio Nobel in Chimica nel 2008, e tante variazioni sul tema, fino a creare una vera e propria tavolozza di colori): proteine progettate per essere sensibili a calcio o altre molecole importanti e renderle visibili al microscopio, o per venire espresse in sottopopolazioni cellulari o in specifici compartimenti subcellulari, ed eventualmente coniugate a proteine endogene di interesse per segnalarne visivamente la localizzazione subcellulare. In questo campo di indagine un rilevante contributo veniva, nel nostro paese, dal lavoro pionieristico che si sviluppava nell'ambito di un pluridecennale sodalizio scientifico tra Tullio Pozzan, allievo di Tsien, soprattutto attento al ruolo dei mitocondri nella regolazione del calcio cellulare, e Meldolesi, che invece si concentrava sullo studio delle proteine che legano il calcio nel reticolo e negli altri compartimenti cellulari, e perveniva a identificare uno specifico organulo cellulare (battezzato *calciosome*) per l'accumulo dinamico di Ca^{2+}.

Come per ogni costituente cellulare, l'omeostasi



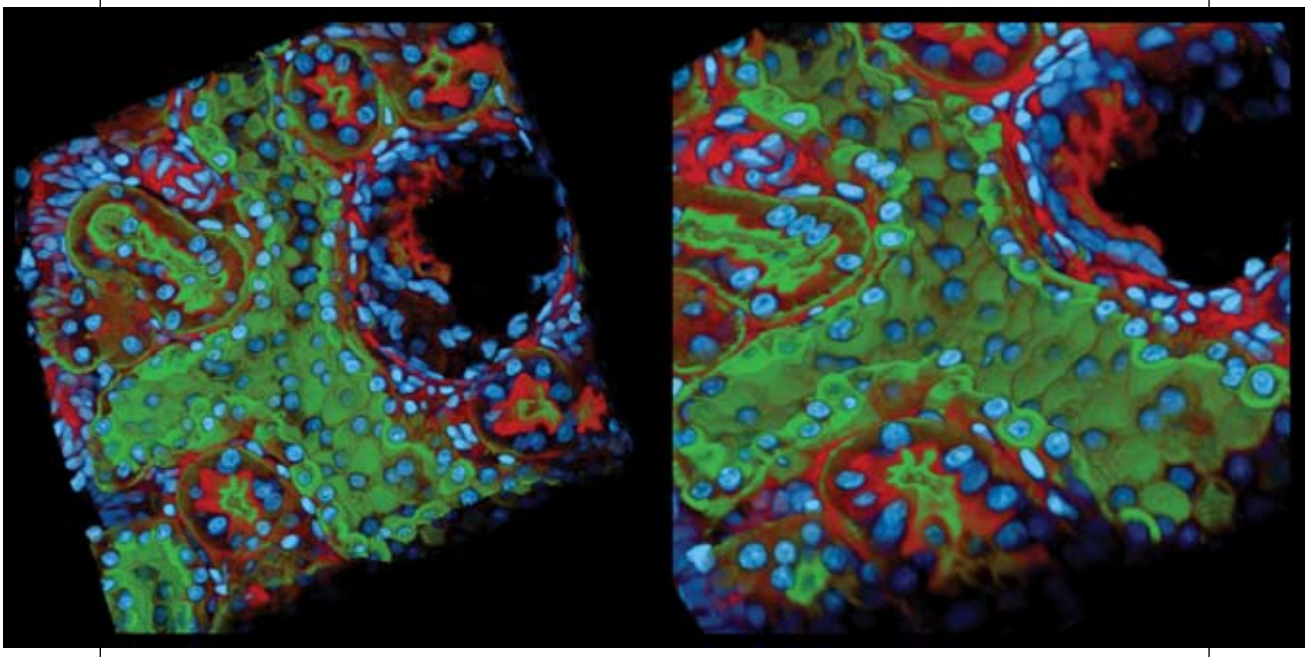
CORTESIA PAOLO BIANCHINI IIT

Un campione di intestino marcato con tre fluoro cromi; in verde i nuclei delle cellule epiteliali.

delle membrane non è basata sulla preservazione ma sul continuo rinnovamento; le membrane sono quindi strutture in continuo rimodellamento dinamico, e vanno costantemente degradate parzialmente e rifornite dei loro costituenti. Ciò si ottiene attraverso un continuo e intenso traffico di vescicole che spostano specificamente porzioni di membrana, formandosi da una membrana e fondendosi con un'altra in modo finemente regolato.

Questo processo è stato caratterizzato nel dettaglio nel lievito, la più semplice cellula eucariota, e poi confermato in molti sistemi cellulari e neuronali. Il contributo più rilevante è venuto dal gruppo di James Rothman, che negli anni '80-'90 ha chiarito come l'indirizzamento delle vescicole verso il loro corretto bersaglio sia sostenuto da un complesso macchinario di proteine citosoliche (NSF, N-ethyilmaleimide sensitive factor, e SNAP, soluble NSF activating proteins) che promuovono il riconoscimento specifico reciproco di proteine (SNARE, SNAP Receptors) sulla membrana della vescicola (v-SNARE) e del bersaglio (target, t-SNARE). Questa «macchina di fusione» consente di comprendere non solo la specificità delle interazioni tra membrane, ma anche come livelli diversi di Ca^{2+}, diffusi o localizzati, possano controllare diversi tipi di risposte esocitotiche, dai più lenti e delocalizzati, che in genere implicano fusione di granuli su tutta la superficie della membrana plasmatica, al rilascio istantaneo, sincrono e precisamente localizzato di vescicole che sostiene la trasmissione sinaptica: una modalità di rilascio che appariva troppo rapida per poter essere sotto il controllo di complessi sistemi proteici, ma che ben si spiega se la macchina di fusione sa condurre il processo fino a una situazione instabile di emi-fusione, che gli ioni calcio hanno solo il compito di permettere di precipitare verso la definitiva apertura esocitotica della vescicola.

Il rilascio di neurotrasmettitori, in particolare, è comunque processo altamente regolato non solo nella fase di fusione: una batteria di proteine controllano il legame al citoscheletro delle vescicole sinaptiche e quindi la loro disponibilità, la formazione della macchina di fusione, il controllo calcio-dipendente della fusione e la ricostituzione endocitotica della vescicola. Alla caratterizzazione di queste proteine, delle vescicole, del citoscheletro, solubili o della membrana presinaptica, hanno dato



Viste tridimensionali di cellule renali in fluorescenza multipla (da *Dunn K. et al.* 2002).

importanti contributi due allievi di Meldolesi, Pietro DeCamilli e Flavia Valtorta.

Il traffico di membrane non è un processo a senso unico: alla aggiunta specifica di nuova membrana a un organello si affianca un continuo processo di rimozione di membrana vecchia, che verrà in parte degradata e in parte riciclata. Lo studio del ciclo eso/endocitotico è stato rivoluzionato negli ultimi decenni dalla possibilità di combinare le indagini biochimiche con il monitoraggio dinamico della superficie di membrana cellulare grazie alla misurazione della capacità elettrica di membrana. Questo approccio nasce dalla tecnica del *patch clamp*, sviluppata da Erwin Neher e Bert Sakmann e valsa loro il premio Nobel per la Fisiologia e Medicina nel 1991. L'aggiunta di un ulteriore approccio sperimentale – la misurazione amperometrica del rilascio di mediatori – permetteva a Guillermo Alvarez de Toledo e allo stesso Neher, negli anni '90, di mostrare che la fusione esocitotica può anche essere transiente, consentendo il rilascio di trasmettitori anche senza completo collasso della vescicola sulla membrana. Si tratta di un meccanismo coerente con le correlazioni morfofunzionali presentate nei decenni precedenti da Bruno Ceccarelli, sul rilascio di acetilcolina alla giunzione neuromuscolare, correlazioni a lungo discusse con Meldolesi e che suggerivano proprio un tale meccanismo di fusione reversibile – di *kiss and run* – come una delle possibili modalità di eso-endocitosi alla terminazione nervosa.

La continua dinamica di eso ed endocitosi, e la regolazione fine del processo, è particolarmente rilevante per la membrana plasmatica, compartimento raggiunto sia da vescicole che hanno il compito di rinnovarne i componenti, sia da vescicole e granuli secretivi (esocitosi). I meccanismi di regolazione della endocitosi sono complessi: problema fondamentale è la raccolta selettiva di componenti di membrana su porzioni della membrana stessa che verranno endocitate. A questo scopo, un ruolo cruciale è svolto dalla riorganizzazione dei componenti di membrana nei *lipid rafts* («zattere» lipidiche) e in specifiche introflessioni di membrana (caveolae), come mostrato dagli studi di Kai Simons.Ma anche sul lato dell'esocitosi, contrariamente a quanto si riteneva inizialmente, è ora chiaro che non solo la esocitosi per fini secretivi è regolata: sempre più numerosi sono gli esempi di esocitosi volta a fornire al plasmalemma proteine con importanti ruoli fisiologici (acquaporine nelle cellule del dotto collettore del rene, recettori per neurotrasmettitori a livello pre e postsinaptico, trasportatori per trasmettitori, aminoacidi, glucosio) e finemente regolata. Recentemente, è apparso chiaro che anche l'esocitosi volta ad aggiungere membrana in quanto tale, per regolare la superficie del plasmalemma durante la crescita, lo sviluppo di prolungamenti neuritici e la riparazione di lesioni, è in buona parte regolata – da calcio e altri fattori – e sfrutta uno specifico tipo di vescicole, identificato da Meldolesi, che lo ha battezzato *enlargeosome*.

RICERCA

Il lavoro scientifico di Jacopo Meldolesi

Jacopo Meldolesi con George Palade alla Rockefeller University

Jacopo Meldolesi si ritira ufficialmente dall'impegno accademico e scientifico. Solo ufficialmente, però, perché i progetti scientifici e i finanziamenti per proseguirli ci sono, come ci sono idee e proposte sulla gestione della ricerca e la tenacia per sostenerle. Laureato in Medicina e Chirurgia nel 1962 a Catania, approda, attratto dalla sfida della ricerca di base all'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano: un centro vivace di medicina sperimentale, fucina d'incontro di medici, chimici, biologi e fisici, sotto la guida carismatica e stimolante di Emilio Trabucchi. È l'epoca in cui si inizia a intravedere il grande sviluppo che la biologia cellulare e molecolare darà al chiarimento della patogenesi delle malattie, alla scoperta di nuovi bersagli terapeutici, alla comprensione dei processi alla base della vita.

Il microscopio elettronico apre la via a questa nuova visione della biologia cellulare, e a Meldolesi offre l'occasione di incontrare George Palade, premio Nobel e fondatore della moderna biologia cellulare, e di lavorare con lui alla Rockefeller University. Palade è il maestro e la Rockefeller University la palestra per crescere tra grandi scienziati, come Albert Claude, Christian De Duve, Gerald Edelman, James Darnell, Fritz Lipmann, David Sabatini, Gunter Blobel, Alex Mauro, e sviluppare il proprio stile di ricerca coniugando l'integrazione dei diversi aspetti metodologici con l'originalità mediterranea. Al suo ritorno a Milano, con lui e Bruno Ceccarelli, con l'entusiasmo di tre giovani ricercatori diamo vita, integrando la morfologia più avanzata con gli approcci biochimici ed elettrofisiologici, a un laboratorio misto CNR-Università, che molto inciderà sullo sviluppo della biologia e della farmacologia cellulare in Italia. Con l'espandersi dell'ateneo su nuovi poli didattici, Meldolesi crea il laboratorio di Neurobiologia Cellulare e Molecolare presso il S. Raffaele di Milano, e guida la costruzione del DIBIT, che grazie alle sue coraggiose scelte di qualità ed eccellenza diviene in breve il gioiello dell'istituto scientifico S. Raffaele. La storia scientifica di Meldolesi prende l'avvio dal traffico intracellulare di proteine e membrane nel pancreas, nel fegato e nell'ipofisi, continuando e approfondendo gli studi iniziati con Palade. La sua attenzione si concentra poi sui meccanismi cellulari che controllano la secrezione, e quindi più specificamente sul ruolo degli ioni calcio, in un lungo e fecondo periodo di collaborazione con Tullio Pozzan. Un interesse speciale è però sempre rivolto alle cellule nervose e neuroendocrine: assumendo in parte l'eredità scientifica di Bruno Ceccarelli, contribuisce a impostare una lettura nuova dei meccanismi di fusione e di ricircolo delle vescicole sinaptiche. Ma il leitmotif resta la secrezione e l'esocitosi: individua nuove modalità di esocitosi non secretiva e di comunicazione intercellulare attraverso shedding di microvescicole, identifica un meccanismo di controllo genico per lo sviluppo della capacità neurosecretiva. Membro dell'Embo, dell'Accademia Europaea e dell'Accademia dei Lincei, bastano poche cifre per descrivere la carriera scientifica di Meldolesi: 260 pubblicazioni scientifiche, 1900 di Impact Factor, 15.000 citazioni, 69 di H Index. Ma anche una costante attenzione al progresso della ricerca in Italia: impegno costante perché sia premiata l'eccellenza e nel finanziamento pubblico viga una valutazione obiettiva dei progetti di ricerca, partecipazione a organismi internazionali per la valutazione della ricerca, organizzazione di analoghi sistemi di valutazione per Agenzie e Fondazioni italiane per il finanziamento della ricerca.

(Francesco Clementi, CNR e Università di Milano)

In realtà, il quadro appare sempre più complesso e sofisticato: i più recenti studi di Meldolesi suggeriscono che esista una ulteriore modalità di comunicazione intercellulare attraverso lo *shedding* (formazione e distacco) di microvescicole dalla membrana plasmatica verso lo spazio interstiziale.

Trattando di eso-endocitosi, è chiaro come la sua regolazione abbia una rilevanza fondamentale per le cellule neuronali e neurosecretive. La frontiera è ora comprendere quali siano i meccanismi di regolazione genica attraverso i quali la competenza verso questa complessa funzione si accende nei neuroni. Ancora una volta Meldolesi è in prima linea: i suoi recenti studi indicano nel repressore trascrizionale REST/NRSF, e nel sistema bistabile da esso controllato, il verosimile candidato.

Riccardo Fesce, Centro di Neuroscienze, Università dell'Insubria