

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



Department of Chemistry and Biology “A. Zambelli”

Ph.D. in Chemistry

XXXIV cycle

Ph.D. Thesis

“Analysis of biochemical pathways involved into protective effects of bioactive compounds: focus on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids”

“Analisi dei pathway biochimici coinvolti negli effetti protettivi dei composti bioattivi: focus sugli acidi grassi polinsaturi Omega 3”

Tutor:

Prof. Lillà Lionetti

Ph.D. student:

Dr. Ilaria Di Gregorio

8800100054

Ph.D. Coordinator:

Prof. Claudio Pellecchia

Academic Year 2020 - 2021

Abstract

I lipidi derivati dalla dieta influenzano il metabolismo cellulare, con diversi effetti sul rischio di malattie metaboliche. Nel mio lavoro di tesi di dottorato ho ritenuto interessante valutare l'effetto degli Acidi Grassi Polinsaturi Omega-3 (Omega-3 PUFA), sui pathway biochimici coinvolti nel metabolismo cellulare che giocano un ruolo importante sia nelle patologie associate all'obesità, quali la steatosi epatica e la disfunzione riproduttiva, sia nei processi di cancerogenesi e nella terapia anticancro. È ben noto che, a livello cellulare, pathway metabolici coinvolti nello stress e nella morte cellulare sono: 1) la disfunzione dei mitocondri, associata a stress ossidativo ed alterazione della dinamica mitocondriale, e 2) lo stress del reticolo endoplasmatico. I mitocondri sono organelli altamente dinamici che vanno incontro a continui processi di fusione e fissione regolati rispettivamente dalla proteina mitofusina 2 (MFN2) e dalla proteina collegata alla dinamina (DRP1). Il mantenimento di un corretto bilancio tra fusione e fissione mitocondriale è necessario per mantenere una corretta morfologia, distribuzione e funzionalità dei mitocondri. Infatti, uno sbilanciamento verso i processi di fissione mitocondriale è associato a disfunzione mitocondriale, mitofagia ed autofagia. Un altro meccanismo coinvolto nella disfunzione metabolica cellulare è lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) che attiva il pathway di risposta alle proteine mal ripiegate (UPR) e può innescare i processi infiammatori ed apoptosi. È ben noto che gli Omega-3 PUFA hanno effetti antinfiammatori, mentre meno conosciuto è l'effetto degli Omega-3 PUFA a livello cellulare sui processi di

dinamica mitocondriale, stress ossidativo ed ER stress. Meccanismi protettivi nei confronti della disfunzione mitocondriale, stress ossidativo ed ER stress potrebbero essere attivati dagli Omega-3 PUFA per contrastare le disfunzioni metaboliche collegate all'obesità, come anche potrebbero essere alla base dell'effetto coadiuvante degli Omega-3 PUFA nella terapia con farmaci antitumorali.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quindi quello di valutare gli effetti protettivi degli Omega-3 PUFA sul metabolismo cellulare ed il ruolo delle proteine coinvolte nei processi di fusione/fissione mitocondriale, stress ossidativo e/o stress del reticolo endoplasmatico sia in patologie associate all'obesità indotte dalla dieta, quali steatosi epatica e disfunzione riproduttiva, sia nell'azione di supporto degli Omega-3 PUFA nelle terapie con farmaci antitumorali. A tale scopo sono stati attuati due disegni sperimentali: 1) un primo disegno sperimentale è stato condotto su un modello sperimentale *in vivo* rappresentato da ratti maschi *Wistar*, alimentati con diete iperlipidiche a base di acidi grassi saturi (lardo) o polinsaturi Omega 3 (olio di pesce), per valutare gli effetti degli Omega-3 PUFA sulla disfunzione metabolica cellulare associata all'obesità indotta da dieta iperlipidica nel tessuto epatico e riproduttivo. 2) un secondo disegno sperimentale è stato condotto su un modello cellulare *in vitro*, rappresentato da cellule epatiche tumorali (Hepg2), al fine di valutare l'effetto degli Omega-3 PUFA sul metabolismo cellulare in associazione con un farmaco antitumorale, ovvero la capecitabina. I risultati del primo disegno sperimentale hanno confermato che una

dieta ad alto contenuto di olio di pesce induce un minor grado di sviluppo dell'obesità e di resistenza all'insulina rispetto all'alimentazione ad alto contenuto di lardo, suggerendo che gli Omega-3 PUFA hanno un effetto anti-obesogeno e protettivo verso l'insulino-resistenza. A livello epatico, i risultati hanno dimostrato che la dieta ricca in Omega-3 PUFA, rispetto alla dieta ricca in lardo, induce un minore accumulo lipidico associato al mantenimento del bilancio tra fusione e fissione mitocondriale. Inoltre, il contenuto normale di MFN2 è associato ad un minore aumento dei marker di ER stress rispetto all'aumento indotto dalle diete ricche in lardo, per le quali si osserva anche una diminuzione nel contenuto di MFN2 ed uno sbilanciamento verso i processi di fissione. A livello testicolare sono stati valutati le proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale e nelle difese antiossidanti ed i risultati hanno dimostrato che la dieta ricca in Omega-3 PUFA induce un minore stress ossidativo rispetto alla dieta ricca in grassi saturi grazie all'attivazione delle difese antiossidanti. Inoltre, anche in questo tessuto si osserva un cambiamento della dinamica mitocondriale verso i processi di fusione con un aumento della MFN2 ed una diminuzione di DRP1 in risposta alla dieta ricca di Omega-3 PUFA rispetto a quella ricca in grassi saturi, che induce invece un aumento dei processi di fissione associati a stress ossidativo ed apoptosi.

I risultati del secondo disegno sperimentale sull'effetto degli Omega-3 PUFA, in particolare EPA e DHA, da soli o in combinazione con il profarmaco antitumorale capecitabina sulla dinamica mitocondriale e sullo stress ossidativo nelle cellule epatiche tumorali HepG2, dimostrano che anche in questo caso nelle cellule trattate

solo con Omega-3 PUFA si ha un aumento dei processi di fusione mitocondriale ed un aumento delle difese antiossidanti, mentre nel trattamento combinato di Omega-3 PUFA e capecitabina si osserva un maggior effetto citotossico con una diminuzione della MFN2 e quindi un aumento dei processi di fissione mitocondriale associato ad una alterazione delle difese antiossidanti. In questo caso la netta diminuzione della MFN2 spinge ad ipotizzare un ruolo di tale proteina nel destino di vita o morte cellulare.

Nel complesso i risultati della mia tesi di dottorato mettono in luce l'importanza dello studio dei meccanismi di dinamica mitocondriale in associazione allo stress ossidativo o del reticolo endoplasmatico per comprendere i meccanismi cellulari alla base degli effetti protettivi di composti bioattivi, quali gli Omega-3 PUFA, sulla salute cellulare.

Abstract

Dietary fat sources differently affect cellular metabolism, with different effects on metabolic disease risks. In the present PhD thesis, it was evaluated the effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (Omega-3 PUFAs), on the biochemical pathways involved in cellular metabolism, which can play an important role in metabolic diseases associated with obesity, such as hepatic steatosis and reproductive dysfunction, as well as in carcinogenesis processes and anti-cancer therapy. It is well known that, at the cellular level, metabolic pathways involved in stress and cell death are: 1) mitochondrial dysfunction associated with oxidative stress and alteration of mitochondrial dynamics behaviour, and 2) endoplasmic reticulum stress (ER stress). Mitochondria are highly dynamic organelles that continuously undergo fusion and fission processes, which are regulated by the protein mitofusin 2 (MFN2) and dynamin-related protein 1 (DRP1), respectively. Maintaining a correct balance between mitochondrial fusion and fission is necessary to maintain correct morphology, distribution and functionality of the mitochondria. In fact, an imbalance towards mitochondrial fission processes is associated with mitochondrial dysfunction, mitophagy and autophagy. Another mechanism involved in cellular metabolic dysfunction is ER stress, which activates the unfolded protein response pathway (UPR) and can trigger inflammatory processes and apoptosis. It is well known that Omega-3 PUFAs have anti-inflammatory effects, whereas little is known on the effect of Omega-3 PUFAs at the cellular level on the processes of mitochondrial dynamics behaviour

and ER stress. Protective mechanisms against mitochondrial dysfunction, oxidative stress and ER stress could be activated by Omega-3 PUFAs to counteract the obesity induced metabolic dysfunctions, as well as they could be at the basis of the adjuvant effect of Omega-3 PUFAs in therapy with anticancer drugs.

The aim of the present PhD thesis was, therefore, to evaluate the protective effects of Omega-3 PUFAs on cellular metabolism and the role of proteins involved in the mitochondrial fusion / fission processes, oxidative stress and / or ER stress both in pathologies associated with diet-induced obesity, such as hepatic steatosis and reproductive dysfunction, and in the supportive action of Omega-3 PUFAs in therapies with anticancer drugs. To this aim, two experimental designs were implemented: 1) a first experimental design was carried out on an *in vivo* experimental model represented by male Wistar rats, fed a hyperlipidic diet based on saturated fatty acids (lard) or polyunsaturated omega 3 (fish oil), to evaluate the effects of Omega-3 PUFAs on cellular metabolic dysfunction in hepatic and reproductive tissues. 2) a second experimental design was carried out on an *in vitro* cell model, represented by tumour liver cells (Hepg2), in order to evaluate the effect of Omega-3 PUFAs on cellular metabolism in association with an anticancer drug, namely capecitabine.

The results of the first experimental design confirmed that a high fish oil diet induced a lower degree of obesity and insulin resistance compared to a high lard diet, suggesting that Omega-3 PUFAs could have an anti-obesogenic and anti-insulin resistance effect. At the hepatic level, the results showed that the high fish

oil diet, compared to high lard diet, induced a lower degree of lipid accumulation associated with the maintenance of the mitochondrial fusion/fission balance. Furthermore, the normal content of MFN2 was associated with a lower increase in ER stress markers compared to the increases induced by high lard diet, where a decrease in the MFN2 content and a shift towards fission processes was also induced. At the testicular level, the proteins involved in mitochondrial dynamics and antioxidant defences were evaluated. Results showed that high fish oil diet induced less oxidative stress than high lard diet due to the activation of the antioxidant defences. Furthermore, also in this tissue there was a shift in the mitochondrial dynamics towards the fusion processes with an increase in MFN2 and a decrease in DRP1 in response to high fish oil diet compared to high lard diet, which instead induced an increase in fission processes associated with oxidative stress and apoptosis.

The results of the second experimental design on the effect of Omega-3 PUFAs, namely EPA and DHA, alone or in combination with the anticancer prodrug capecitabine on mitochondrial dynamics and oxidative stress in HepG2 cells, showed that a shift towards fusion processes was observed in cells treated with Omega-3 PUFAs alone. On the other hand, in cells cotreated with Omega-3 PUFAs and capecitabine, a higher cytotoxic effect was observed compared to cells treated with capecitabine alone. This increase in cytotoxic effect was associated with a decrease in MFN2, a shift towards fission processes and an alteration in

antioxidant defences. The marked decrease in MFN2 leads to hypothesize a key role of this protein in pro-survival or death cell fate.

Overall, the results of the present PhD thesis highlight the importance of studying the mechanisms of mitochondrial dynamics in association with oxidative stress and ER stress to understand the cellular mechanisms underlying the protective effects of bioactive compounds, such as Omega-3 PUFAs, on cellular health.