UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI E GERONTOLOGICHE

XXXII Ciclo

(Anni 2017-2020)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

LA DELEZIONE DEL GENE *AKAP1* PEGGIORA L'IPERTROFIA CARDIACA E LO SCOMPENSO CARDIACO IN SEGUITO AL SOVRACCARICO DI PRESSIONE

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo
Prof. Esposito Giovanni

CANDIDATO/A

Dott. Boccella Nicola

INDICE

Introduzione	Pag.3
Materiali e metodi	Pag.5
Risultati	Pag.9
Discussione	Pag.12
Conclusioni	Pag.16
Bibliografia	Pag.16

Introduzione

L'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) caratterizza numerose malattie cardiovascolari (Hill and Olson, 2008; Schiattarella and Hill, 2015; Schiattarella et al., 2017) ed è fortemente associata ad un aumentato rischio di scompenso cardiaco (SC) (Levy et al., 1990). In risposta a varie forme di stress come il sovraccarico di pressione, il tessuto cardiaco va incontro ad un rimodellamento patologico a causa di modificazioni cellulari e molecolari (Perrino and Rockman, 2007; Burchfield et al., 2013). Nonostante il ruolo critico dell'IVS nello sviluppo della disfunzione cardiaca, i meccanismi che guidano l'ipertrofia dei cardiomiociti in risposta al sovraccarico di pressione rimangono ancora non completamente conosciuti. Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le proteine di ancoraggio della Proteina Chinasi A dipendente dall'adenosina monofosfato ciclico (A Kinase Anchor Proteins, AKAP), regolano la risposta cardiaca a stimoli patologici incluso il sovraccarico di pressione (Perrino et al., 2010; Diviani et al., 2011; Rababa'h et al., 2014). Le AKAP localizzano l'attività della PKA sulla membrana di organelli cellulari specifici, giocando un ruolo chiave nella propagazione dei segnali attivati dall'adenosina monofosfato ciclica (cAMP) (Feliciello et al., 2001; Carlucci et al., 2008b). Numerose AKAP sono espresse nei cardiomiociti regolando funzioni cellulari cruciali (Divini et al., 2011). Tra queste, le AKAP mitocondriali (mitoAKAP), derivanti dallo splicing alternativo del gene Akap1, localizzano la Proteina Chinasi cAMP dipendente (PKA) sulla membrana mitocondriale esterna (Feliciello et al., 2001; Carlucci et al., 2008b). I mitocondri sono la principale fonte di energia per la contrazione e respirazione nei cardiomiociti. L'IVS ed in ultimo lo SC sono caratterizzati da disfunzione mitocondriale che conduce ad una riduzione della produzione di ATP e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno mitocondriali (ROS) (Torrealba et al., 2017). Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio dimostrano che le

mitoAKAP svolgono un ruolo cruciale nel cuore in condizioni patologiche (Carlucci et al., 2008a; Perrino et al., 2010; Scorziello et al., 2013; Schiattarella et al., 2016). Rispetto a topi wild-type (wt), la delezione del gene Akap1 in topi geneticamente modificati (Akap1$^{-/-}$) aumenta il danno cardiaco in seguito ad infarto del miocardio (MI), promuove la disfunzione mitocondriale, incrementa la produzione di ROS ed aumenta l'estensione dell'area infartuale, riducendo la curva di sopravvivenza (Schiattarella et al., 2016). Usando modelli animali di IVS di ratto, abbiamo precedentemente dimostrato che il sovraccarico di pressione riduce la trascrizione del gene Akap1 ed i livelli proteici di AKAP121, il prodotto di Akap1 più abbondante nelle cellule muscolari lisce e nei cardiomiociti. La riduzione dei livelli di AKAP121 è associata ad alterata funzionalità mitocondriale e ridotta sopravvivenza cellulare (Perrino et al., 2010). In risposta all'ipossia o all'ischemia cardiaca, AKAP121 va inoltre incontro a degradazione mediata, almeno in parte, dalla proteina ubiquitina ligasi E3 nota come seven in absentia homolog 2 (Siah2; Carlucci et al., 2008a). Precedenti studi nel nostro laboratorio ed altri hanno dimostrato che la degradazione di AKAP121 indotta dall'ischemia è ridotta in topi knockout per Siah2 (Siah2$^{-/-}$; Kim et al., 2011; Schiattarella et al.,2016) e che la delezione di Siah2 riduce la suscettibilità cardiaca all'ischemia (Schiattarella et al., 2016). Sebbene il ruolo potenziale di AKAP121 nello sviluppo dell'ipertrofia dei cardiomiociti sia stato suggerito da studi in vitro (Abrenica et al., 2009), non è ancora noto se Akap1 gioca un ruolo importante durante lo sviluppo dell'IVS in vivo. Nel presente studio, abbiamo ipotizziato che l'assenza di Akap1 aumenti l'ipertrofia cardiaca in risposta al sovraccarico di pressione, accelerando la progressione verso lo scompenso cardiaco.

Materiali e metodi

Animali sperimentali

Tutti gli esperimenti di questo studio che coinvolgono gli animali sono stati eseguiti in conformità con la "Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio", pubblicata dal National Institutes of Health degli Stati Uniti (NIH Publication 8° edizione, aggiornamento 2011) e sono stati approvati dalla regolamentazione sul benessere animale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II e dall'Istituto Superiore di Sanità italiano. Nel presente studio sono stati inclusi topi C57BL/6 wt ed *Akap1*$^{-/-}$ di entrambi i sessi, di età compresa fra le 8–9 settimane. Topi C57BL/6 *Akap1*$^{-/-}$ sono stati generati dall'incrocio di topi Akap1 eterozigoti (*Akap1*$^{+/-}$), gentilmente donati da McKnight G S e sono stati precedentemente descritti (Newhall et al., 2006; Schiattarella et al., 2016). I topi sono stati mantenuti sotto condizioni costanti di temperatua (21 +/- 1°C), umidità (60+/-5%), e cicli luce/buio di 12 ore, con libero accesso al cibo ed acqua.

Modello murino di ipertrofia cardiaca indotta dal sovraccarico di pressione

Il sovraccarico di pressione è stato indotto in topi adulti *Akap1*$^{-/-}$ o *wt* mediante costrizione chirurgica dell'aorta trasversa (TAC) come precedentemente descritto (Esposito et al., 2011; Angrisano et al., 2014). Brevemente, i topi sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di 0,1 ml/kg di una miscela composta dal 50% di Tiletamina e 50% di Zolazepam (Zoletil 100) e da Xylazina 5mg/kg (Sigma-Aldrich). Dopo l'incisione del torace, un filo chirurgico è stato passato intorno all'arco aortico fra la carotide comune di sinistra e l'arteria anonima. Un altro gruppo di animali è stato sottoposto a toracotomia senza costrizione dell'arco aortico (sham). I topi di tutti i gruppi sono stati sacrificati una settimana

dopo chirurgia per le analisi molecolari. Solo gli animali TAC con gradiente pressorio trans-stenotico superiore a 40 mmHg sono stati inclusi nello studio.

Ecocardiogramma transtoracico

La funzione cardiaca è stata monitorata con procedura non invasiva mediante ecocardiogramma transtoracico usando il sistema ad alta risoluzione Vevo 2100 (Visual-Sonics, Toronto, ON, Canada) prima ed una settimana dopo operazione sham o TAC in topi di tutti i genotipi come precedentemente descritto (Esposito et al., 2011; Perrino et al., 2013).

Estrazione di proteine e immnunoblotting

I tessuti cardiaci sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi contenete 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 2 mmol/L EDTA, 1% v/v NP-40, 0.5% w/v deoxycholate, 10 mmol/L NaF, 10mM sodium pyrophosphate, 2 mmol/L PMSF, 2 heart leupeptin, 2 heart aprotinin, pH 7.4, usando il programma Protein_1 del omogeneizzatore GentleMACS tissue Dissociator (Miltenyi Biotec; Esposito et al., 2015; Cattaneo et al., 2016). La concentrazione di proteine in tutti i lisati era misurata usando il saggio di colorazione che lega le proteine della Bio-Rad e lo spettrofotometro SmartSpec Plus (Bio-Rad) leggendo ad una lunghezza di 595 nm. Immunoblotting è stato eseguito utilizzando anticorpi presenti in commercio: anti-Akt (rabbit policlonale, Santa Cruz Biotechnology), anti-pAkt (Ser473, rabbit policlonale, Cell Signaling), anti Caspasi 3 clivata (rabbit policlonale,Cell Signaling), anti-AKAP121 (Carlucci et al., 2008a; rabbit policlonale, anti Caspasi 9 (rabbit policlonale; Santa Cruz Biotechnology), anti-IDH2 (goat policlonale, Santa Cruz Biotechnology) anti fosfo-PKA (rabbit polyclonal, Cell Signaling), anti-GAPDH (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), e anti-tubulina (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich). Gli anticorpi secondari sono stati acquistati dall'Amersham Life Sciences (GE

Healthcare). Le bande sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (ECL; Amersham Life Sciences) secondo le istruzioni del produttore e sono state quantificate utilizzando la densitometria (Chemidoc, Bio-Rad). Ogni esperimento è stato quantificato densometricamente ed è stato ripetuto separatamente almeno tre volte.

Isolamento di RNA e Real-Time PCR

L'RNA totale è stato isolato utilizzando TRIzol (Invitrogen, Eugene, OR, United States), seguendo le istruzioni del produttore. Il primo filamento di cDNA ottenuto con Oligo-dT è stato sintetizzato utilizzando il kit di sintesi VILO cDNA SuperScript (Invitrogen, Life technologies) secondo le istruzioni del produttore. L'espressione dell'mRNA era determinata in campioni di tessuto cardiaco da differenti gruppi sperimentali da real-time quantitative (RT-PCR) usando una IQ-5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIORAD). I primer utilizzati sono stati:
β-MHC: forward 5'-GAGACGACTGTGGCCTCC-3', reverse 5'-GCATGATGGCGCCTGTCAG-3';
Collagen IA1: forward 5'-GGAGAC AGGTCAGACCTGTGTG-3', reverse 5'-CAGCTGGATAGCGACATCGGC-3';
Collagen III: forward 5'-ATATCAAACACGCAAGGC-3', reverse 5'-GATTAAAGCAAGAGGAACAC-3';
Fibronectin: forward 5'- ACCGTGTCAGGCTTCCGG-3', reverse 5'- ACGGAAGTGGCCGTGCTT-3';
GAPDH: forward 5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3', reverse 5'-TC GCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'.

Isolamento mitocondriale e valutazione dei parametri respiratori

I mitocondri sono stati isolati da campioni di tessuto cardiaco e la respirazione mitocondriale è stata determinata su mitocondri isolati come precedentemente descritto (Perrino et al., 2013;

Schiattarella et al., 2016). Brevemente, i cuori prelevati sono stati gentilmente immersi in un buffer contente 220 mM di manitolo, 70 mM di saccarosio, 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, and 5 mM EGTA (pH 7.4) e centrifugati a 8,000 *g* per 10 min a 4°C. Il supernatante è stato ulteriormente centrifugato e il pellet mitocondriale è stato centrifugato e usato per analisi di immunoblot o per misurare la respirazione mitocondriale (Perrino et al., 2013; Schiattarella et al., 2016).

Istologia

I campioni di cuore dei topi sono stati fissati in formaldeide al 4% e incorporati in paraffina. Dopo il de-paraffinamento e la re-idratazione, le sezioni di spessore di 4 μm sono state preparate e montate su vetrini portaoggetto. Le sezioni cardiache sono state colorate con wheat germ agglutinin (WGA) o Picosirius Red come precedentemente descritto (Schiattarella et al., 2016). Le immagini delle sezioni cardiache sono state acquisite usando un microscopio Nikon con software NIS Elements Basic Research (Nikon). Per valutare l'area di sezioni dei cardiomiociti, la media dell'area è stata valutata misurando 400-500 cellule per cuore (n=4-5 animali per gruppo). Le regioni fibrotiche (6-8 immagini per sezione, n=4-5 animali per gruppo) sono state misurate come percentuale sull'area totale della sezione utilizzando un software di analisi per immagini (Image J software, National Institutes of Health).

Colorazione TUNEL

La rottura del DNA nel tessuto cardiaco è stata analizzata mediante il kit di rilevamento dell'apoptosi Apoptag Fluorescein Direct (Chemicon) secondo le istruzioni del produttore come precedentemente descritto (Esposito et al., 2015; Schiattarella et al., 2016). La colorazione TUNEL è stata visualizzata mediante

fluorescenza verde e i nuclei con il 4'-6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). I nuclei dei cardiomiociti positivi al TUNEL identificati sono stati normalizzati sui nuclei totali colorati nelle stesse sezioni dal DAPI (n = 7–8 animali/gruppo).

Analisi statistica

Tutti i dati presentati sono rappresentativi di tre o più esperimenti indipendenti e sono stati espressi come la media più o meno SEM. I confronti tra due gruppi sono stati eseguiti utilizzando il t-test di Student non parametrico. Per esperimenti che includono tre o più gruppi sperimentali, i confronti sono stati effettuati mediante analisi a una via (ANOVA) o ANOVA a due vie e i valori di p indicano l'effetto della risposta del genotipo. La correzione per confronti multipli è stata effettuata usando il metodo Student–Newman–Keuls. È stato considerato un valore minimo di $p<0,05$ considerato statisticamente significativo. Tutti le analisi statistiche sono state effettuate con il software Graphpad Prism.

Risultati

La delezione di Akap1 aumenta l'ipertrofia cardiaca dopo costrizione dell'aorta trasversa

Studi precedenti hanno dimostrato che nel miocardio i livelli di AKAP121 sono ridotti in ratto dopo IVS in seguito alla legatura dell'aorta ascendente (Perrino et al., 2010), suggerendo un ruolo per questa proteina adattatrice nella trasmissione dei segnali dell'ipertrofia nel miocardio. Tuttavia, l'effetto della delezione di Akap1 nel rimodellamento cardiaco in risposta al sovraccarico di pressione è ancora sconosciuto. Coerentemente con i nostri dati precedenti (Perrino et al., 2010), i livelli cardiaci di AKAP121 sono risultati significativamente ridotti nei topi wt sottoposti a TAC dopo una settimana rispetto ai corrispondenti sham (Figura 1A). Per

valutare la risposta ipertrofica del miocardio nei topi TAC rispetto ai topi sham dei diversi genotipi, è stato valutato il rapporto tra il peso del cuore (HW) e del ventricolo sinistro (LVW) rispetto al peso corporeo dell'animale (BW). Una settimana dopo l'intervento, sia i topi *Akap1*$^{+/-}$ che *Akap1*$^{-/-}$ hanno mostrato un significativo aumento del rapporto HW/BW rispetto ai topi wt (Tabella 1). L'aumento di questo rapporto è stato associato ad un aumento significativo della massa del ventricolo sinistro indicato dall'aumento significativo del rapporto LVW/BW, sia per i topi *Akap1*$^{+/-}$ che per i topi *Akap1*$^{-/-}$ rispetto ai topi wt (Tabella 1, Figura 1B). Tali risultati sono stati associati ad un incremento dell'area dei cardiomiociti. Topi *Akap1*$^{+/-}$ e *Akap1*$^{-/-}$ una settimana dopo l'intervento TAC hanno mostrato un significativo aumento dell'area dei cardiomiociti rispetto a i topi wt (Figura 1C) e dell'espressione della catena pesante di β-miosina (β-MHC). Nessuna differenza è stata trovata tra i tre diversi genotipi nella fibrosi interstiziale cardiaca, che è stata valutata utilizzando la colorazione istochimica Picrosirius Red (Figura 2A) ed i marcatori più comuni di fibrosi come il collagene di tipo I, tipo III e la fibronectina (Figura 2B-D). Collettivamente, questi dati suggeriscono che la delezione di Akap1 aumenta l'ipertrofia cardiaca dopo aumento di pressione senza interferire con la risposta fibrotica.

La delezione genica di Akap1 fa precipitare il cuore nello scompenso cardiaco indotto da un aumento di pressione

Il sovraccarico di pressione cronico porta inevitabilmente, a lungo termine, ad una compromissione della funzione sistolica del ventricolo sinistro (Esposito et al.,2011; Schiattarella and Hill, 2015). Come previsto, dopo una settimana dalla procedura TAC, i topi *wt* hanno mostrato una lieve ma significativa riduzione della frazione di accorciamento percentuale del ventricolo sinistro (% FS) rispetto agli animali sham (Figura 3, A e B, Tabella 1). La % di FS si riduce in topi *wt* principalmente per l'aumento del diametro

telesistolico del ventricolo sinistro (LVESd, Figura 3C), senza cambiamenti significativi nel diametro telediastolico del ventricolo sinistro (LVEDd, Figura 3D). Topi con genotipo *Akap1*$^{+/-}$ e *Akap1*$^{-/-}$ sottoposti ad operazione TAC hanno presentato un'ulteriore riduzione significativa della % di FS rispetto ai topi TAC *wt* (Figura 3A, B). La riduzione della % di FS osservata in topi *Akap1*$^{+/-}$ e *Akap1*$^{-/-}$ dopo intervento TAC è dovuta all'aumento del diametro telediastolico e telesistolico del ventricolo sinistro (Figura 3C, D). Le differenze nella funzione sistolica del LV fra *wt* e topi con la deficienza parziale o totale di *Akap1* dopo stress suggeriscono che *Akap1* giochi un ruolo importante nello sviluppo dell'ipertrofia ventricolare e nella successiva progressione verso lo SC in risposta al sovraccarico di pressione.

Incremento dell'apoptosi e ridotta attivazione di Akt in cuori Akap1$^{-/-}$ *dopo sovraccarico di pressione*

Coerentemente con i risultati precedentemente mostrati, i livelli miocardici di caspasi 3 attivata, un noto effettore dell'apoptosi, sono risultati significativamente aumentati una settimana dopo la procedura TAC (Figura 4A). Tale aumento era significativamente maggiore nei cuori di topi *Akap1*$^{-/-}$ dopo procedura TAC rispetto ai corrispettivi animali *wt* (Figura 4A). Per confermare che un incremento di apoptosi era presente nei cuori *Akap1*$^{-/-}$, è stato quantizzato il numero dei nuclei positivi al TUNEL nelle sezioni del miocardio da topi *Akap1*$^{-/-}$ e *wt*. Mentre dopo intervento sham non sono state evidenziate significative differenze tra i diversi gruppi, dopo la procedura TAC la percentuale dei nuclei TUNEL-positivi è risultata significativamente incrementata, ed anche in questo caso l'incremento risultava più ampio nei topi *Akap1*$^{-/-}$ rispetto ai topi *wt* (Figura 4B). Al fine di determinare il contributo delle vie apoptotiche mitocondriali-dipendenti in assenza di *Akap1*, abbiamo successivamente valutato l'attivazione della proteina apoptotica mitocondriale caspasi 9 nei cuori di topi *wt* e *Akap1*$^{-/-}$

dopo intervento sham o TAC. Come mostrato in Figura 5, i cuori di topi *Akap1*$^{-/-}$ mostravano un significativo aumento dei livelli di caspasi 9 attivata rispetto ai cuori *wt* dopo operazione TAC. Questi risultati indicano che la delezione di *Akap1*$^{-/-}$ aumenta la suscettibilità al sovraccarico di pressione inducendo maggiore apoptosi, dipendente almeno in parte dall'attivazione della via di segnalazione mitocondriale pro-apoptotica. L'attivazione della via di segnalazione protettiva di *Akt* dipendente è caratteristica dello SC (Chaanine and Hajjar, 2011). Recentemente, abbiamo dimostrato che la perdita di *Akap1*$^{-/-}$ nell'endotelio vascolare attenua l'attivazione di *Akt* indotta da ischemia con conseguente comportamento disfunzionale delle cellule endoteliali (Schiattarella et al., 2018). Dato che i topi *Akap1*$^{-/-}$ progrediscono più velocemente verso lo SC dopo sovraccarico di pressione e che i cuori di *Akap1*$^{-/-}$ sono più sensibili all'apoptosi indotta da stress, abbiamo ipotizzato che la perdita di segnali cardioprotettivi da parte di *Akt* potrebbe svolgere un ruolo in questo contesto. In seguito ad intervento TAC, attivazione di *Akt* (fosforilazione di Ser473) è stata osservata in cuori *wt* (Figura 4C), mentre i cuori *Akap1*$^{-/-}$ hanno mostrato un'attivazione ridotta di *Akt* in risposta al sovraccarico di pressione (Figura 4C). L'assenza dell'attivazione di *Akt* insieme alla maggiore frequenza apoptotica osservata nei cuori di topi *Akap1*$^{-/-}$ suggerisce che entrambi i meccanismi potrebbero agire di concerto per determinare la compromissione della funzione cardiaca dei topi *Akap1*$^{-/-}$ dopo un sovraccarico di pressione.

Discussione

Questo studio dimostra per la prima volta che la delezione genetica in vivo del gene *Akap1* aumenta l'IVS in seguito al sovraccarico di pressione, accelerando la progressione verso lo SC. Queste anomalie in topi *Akap1*$^{-/-}$ sono state associate a un incremento dell'apoptosi cardiaca e perdita di attività delle vie di

segnalazione cardioprotettive dipendente da *Akt*. Questi risultati estendono la conoscenza di *Akap1* nella biologia cardiaca e confermano il suo ruolo di mediatore critico dell'IVS dopo sovraccarico patologico.

L'IVS è la prima risposta generale del cuore al sovraccarico fisiologico o patologico (Chien, 1999; Frey and Olson, 2003). Tuttavia, mentre gli adattamenti cardiaci indotti da stimoli fisiologici come l'esercizio fisico non danno luogo a scompenso cardiaco, il sovraccarico cardiaco indotto da stimoli patologici, come ipertensione cronica o malattie delle valvole cardiache, portano come risultato finale allo SC (Berenji et al., 2005; Heineke and Molkentin, 2006; Perrino et al., 2006). Anomalie nella segnalazione cAMP/PKA sono un segno distintivo dell'IVS patologica e dello SC (Perrino and Rockman, 2007). Le proteine di ancoraggio AKAP localizzano l'attività della PKA in domini subcellulari (ad es. mitocondri), permettendo così una regolazione spaziale e temporale strettamente controllata delle risposte cellulari (Feliciello et al., 2001; Newhall et al., 2006). La trasmissione della segnalazione cAMP ai mitocondri è localizzata da una famiglia di proteine le mitoAKAP che hanno dimostrato svolgere un ruolo importante nella risposta cardiaca allo stress (Perrino et al., 2010; Diviani et al., 2011). In particolare, i nostri dati e anche altri studi hanno dimostrato che AKAP121 è fondamentale per la risposta dei cardiomiociti al danno ischemico (Kim et al., 2011; Schiattarella et al., 2016). La delezione genetica di *Akap1* risulta in un aumento dell'area infartuata dopo legatura dell'arteria coronaria, peggiorando la funzione sistolica del ventricolo sinistro ed aumentando la mortalità dopo infarto del miocardio (Schiattarella et al., 2016). Sebbene l'assenza di *Akap1* è stata associata all'incremento di disfunzioni mitocondriali, mitofagia, e produzione di ROS, i meccanismi specifici del peggior rimodellamento cardiaco dopo ischemia nei topi con perdita di *Akap1* sono ancora sconosciuti. Più recentemente, abbiamo dimostrato che nelle cellule endoteliali la mancanza di *Akap1*

influenza molteplici funzioni cellulari e provoca una ridotta attivazione di *Akt* su stimoli angiogenici o durante l'ipossia (Schiattarella et al., 2018). Nel presente studio, abbiamo dimostrato che in risposta al sovraccarico di pressione, la delezione di *Akap1* si traduce in un aumento dell'IVS con ridotta attivazione di *Akt*. Uno studio precedente aveva dimostrato che AKAP121 svolge un ruolo come repressore dell'ipertrofia dei cardiomiociti (Abrenica et al.,2009). Il silenziamento di AKAP121 in vitro comportava un aumento delle dimensioni dei cardiomiociti in assenza di stimoli pro-ipertrofici (Abrenica et al.,2009). Sebbene i nostri dati confermino il ruolo di AKAP121 come freno della crescita dei cardiomiociti, in altri studi e dai nostri dati si denota l'assenza di alterazioni cardiache basali nei topi *Akap1*$^{-/-}$ (Newhall et al., 2006; Schiattarella et al., 2016, 2018). La caratterizzazione approfondita della struttura e della funzione cardiaca nei topi *Akap1*$^{-/-}$ ha rivelato che l'assenza di *Akap1* non causa nel tempo IVS e SC. Tuttavia, i topi *Akap1*$^{-/-}$ sottoposti al sovraccarico di pressione, sviluppano una maggiore risposta ipertrofica e mostrano una progressione accelerata verso lo SC, confermando l'attività di *Akap1* come repressore dell'ipertrofia dei cardiomiociti. Il fatto che, solo se stressato, il cuore *Akap1*$^{-/-}$ mostra una ipertrofia pronunciata potrebbe essere in contrasto con l'idea precedente che l'assenza di AKAP121 in vitro influisca di per sé sulla dimensione dei cardiomiociti. Tuttavia, questa discrepanza può essere spiegata dal fatto che, in vivo, *Rab32*, un target mitocondriale che lega le proteine AKAP, potrebbe esercitare effetti compensativi in caso di assenza di *Akap1* (Alto et al., 2002; Bui et al., 2010).

L'assenza di *Akap1* in modo vario è stata associata con un incremento della produzione di ROS e disfunzione mitocondriale in parecchi modelli di malattie cardio e cerebrovascolari come nel cancro (Feliciello et al., 1998; Scorziello et al., 2013; Schiattarella et al., 2016; Rinaldi et al., 2017). Nonostante non siano state riscontrate differenze basali nella respirazione mitocondriale tra il

cuore *Akap1*$^{-/-}$ e *wt* dopo infarto del miocardio, i topi *Akap1*$^{-/-}$ hanno mostrato un livello aumentato di ROS mitocondriale e molte più alterazioni nella morfologia e nel comportamento dei mitocondri comparati ai controlli wt (Schiattarella et al., 2016). Dopo una settimana dalla procedura TAC, i topi *Akap1*$^{-/-}$ e *wt* non hanno mostrato differenze nella funzione respiratoria dei mitocondri cardiaci (Figura 6). Tuttavia, noi non è possibile escludere che le alterazioni della funzione mitocondriale si possano verificare in un momento successivo al sovraccarico pressorio nei cuori *Akap1*$^{-/-}$*.* Questi risultati suggeriscono che la morfologia mitocondriale e le alterazioni funzionali indotte dall'assenza di *Akap1* potrebbero essere influenzate dalla natura e/o dalla durata dello stress che guida alla disfunzione cardiaca. Come accennato in precedenza, in altri sistemi cellulari l'assenza di *Akap1* porta alla mancanza di attivazione di *Akt* ed ipotizziamo che *Akt* possa mediare gli effetti della delezione di *Akap1* anche nellp sviluppo di IVS. *Akt* è al crocevia di vie di segnalazione che regolano la crescita cardiaca e la funzione contrattile (Aoyagi and Matsui, 2011; Chaanine and Hajjar, 2011). La fosforilazione di *Akt* è stata trovata aumentata nell'IVS patologica come risposta iniziale allo stress (Chaanine and Hajjar, 2011) e l'attivazione di *Akt* nel TAC è stata riconosciuta come una via di segnalazione adattativa pro-sopravvivenza (Matsui et al., 1999; Fujio et al., 2000; Cannavo et al., 2013). Coerentemente con queste nozioni, i topi *Akap1*$^{-/-}$ sottomessi al TAC esibivano un aumento della morte delle cellule cardiache e una progressione accelerata verso lo scompenso cardiaco accoppiato con l'assenza dell'attivazione di Akt. Un numero di molecole nella via di segnalazione sono ridotte a valle di Akt. Infatti, da tenere in considerazione i meccanismi target della rapamicina (mTOR) che giocano un ruolo centrale nell'ipertrofia cardiaca (Morales et al., 2016). Recentemente, *Akap1* mostrava controllare mTOR, regolatore della crescita cellulare tumorale (Rinaldi et al., 2017). Tuttavia, i meccanismi per i quali *Akap1* influenza la via di segnalazione di Akt/mTOR rimangono poco

compresi. Akt localizza in diversi compartimenti sub-cellulari, incluso i mitocondri, dove esso contribuisce alla fosforilazione dei target chiave mitocondriali (Bijur and Jope, 2003; Miyamoto et al., 2008; Lim et al., 2016). L'assenza di *Akap1* porta alla riduzione di Akt fosforilata nell'IVS come nella disfunzione vascolare (Schiattarella et al., 2018), suggerendo che le mitoAKAP potrebbero anche contribuire alla distribuzione subcellulare di *Akt* per promuovere la sopravvivenza cellulare. Pertanto, è possibile ipotizzare che le mitoAKAP possano fungere da piattaforma di segnalazione contribuendo a stabilizzare la localizzazione mitocondriale di *Akt* per preservare la funzione mitocondriale e promuovere la sopravvivenza. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire i meccanismi precisi con cui la perdita di *Akap1* impedisce l'attivazione di Akt su diversi fattori di stress.

Conclusioni

I nostri risultati supportano il ruolo critico dei mitoAKAP nella risposta cardiaca al sovraccarico di pressione, identificando *Akt* come potenziale mediatore dei loro effetti.

Bibliografia

Abrenica, B., Alshaaban, M., and Czubryt, M. P. (2009). **The A-kinase anchor protein AKAP121 is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy.** *J. Mol. Cell Cardiol.* 46, 674–681. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.01.018

Alto, N. M., Soderling, J., and Scott, J. D. (2002). **Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics.** *J. Cell Biol.* 158, 659–668. doi: 10.1083/jcb.200204081

Angrisano, T., Schiattarella, G. G., Keller, S., Pironti, G., Florio, E., Magliulo, F., et al. (2014). **Epigenetic switch at atp2a2 and myh7 gene promoters in pressure overload-induced heart failure.** *PLoS One* 9:e106024. doi: 10.1371/journal.pone.0106024

Aoyagi, T., and Matsui, T. (2011). **Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure.** *Curr. Pharm. Des.* 17, 1818–1824. doi: 10.2174/138161211796390976

Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., and Hill, J. A. (2005). **Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H8–H16. doi: 10.1152/ajpheart.01303.2004

Bijur, G. N., and Jope, R. S. (2003). **Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation.** *J. Neurochem.* 87, 1427–1435. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02113.x

Bui, M., Gilady, S. Y., Fitzsimmons, R. E., Benson, M. D., Lynes, E. M., Gesson, K., et al. (2010). **Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties.** *J. Biol. Chem.* 285, 31590–31602. doi: 10.1074/jbc.M110.101584

Burchfield, J. S., Xie, M., and Hill, J. A. (2013). **Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2.** *Circulation* 128, 388–400. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001878

Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D., Pironti, G., Scimia, M. C., Scudiero, L., et al. (2013). **Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation.** *Apoptosis* 18, 1252–1261. doi: 10.1007/s10495-013-0876-9

Carlucci, A., Adornetto, A., Scorziello, A., Viggiano, D., Foca, M., Cuomo, O., et al. (2008a). **Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during cellular hypoxia and brain ischaemia.** *EMBO J.* 27, 1073–1084. doi: 10.1038/emboj.2008.33

Carlucci, A., Lignitto, L., and Feliciello, A. (2008b). **Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP,**

AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol.* 18, 604–613. doi: 10.1016/j.tcb.2008.09.006

Carnegie, G. K., Soughayer, J., Smith, F. D., Pedroja, B. S., Zhang, F., Diviani, D., et al. (2008). **AKAP-Lbc mobilizes a cardiac hypertrophy signaling pathway.** *Mol. Cell* 32, 169–179. doi: 10.1016/j.molcel.2008.08.030

Cattaneo, F., Parisi, M., Fioretti, T., Sarnataro, D., Esposito, G., and Ammendola, R. (2016). **Nuclear localization of Formyl-Peptide Receptor 2 in human cancer cells.** *Arch. Biochem. Biophys.* 603, 10–19. doi: 10.1016/j.abb.2016.05.006

Chaanine, A. H., and Hajjar, R. J. (2011). **AKT signalling in the failing heart.** *Eur. J. Heart Fail.* 13, 825–829. doi: 10.1093/eurjhf/hfr080

Chien, K. R. (1999). **Stress pathways and heart failure.** *Cell* 98, 555–558. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80043-4

Diviani, D., Dodge-Kafka, K. L., Li, J., and Kapiloff, M. S. (2011). **A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1742–H1753. doi: 10.1152/ajpheart.00569.2011

Ellison, G. M., Waring, C. D., Vicinanza, C., and Torella, D. (2012). **Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms.** *Heart* 98, 5–10. doi: 10.1136/heartjnl-2011-300639

Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G. G., Borgia, F., Sannino, A., et al. (2011). **EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy.** *Basic Res. Cardiol.* 106, 577–589. doi: 10.1007/s00395-011-0163-2

Esposito, G., Schiattarella, G. G., Perrino, C., Cattaneo, F., Pironti, G., Franzone, A., et al. (2015). **Dermcidin: a skeletal muscle**

myokine modulating cardiomyocyte survival and infarct size after coronary artery ligation. *Cardiovasc. Res.* 107, 431–441. doi: 10.1093/cvr/cvv173

Feliciello, A., Gottesman, M. E., and Avvedimento, E. V. (2001). **The biological functions of A-kinase anchor proteins.** *J. Mol. Biol.* 308, 99–114. doi: 10.1006/jmbi.2001.4585

Feliciello, A., Rubin, C. S., Avvedimento, E. V., and Gottesman, M. E. (1998). **Expression of a kinase anchor protein 121 is regulated by hormones in thyroid and testicular germ cells.** *J. Biol. Chem.* 273, 23361–23366. doi: 10.1074/jbc.273.36.23361

Frey, N., and Olson, E. N. (2003). **Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly.** *Annu. Rev. Physiol.* 65, 45–79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243

Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N., and Walsh, K. (2000). **Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.** *Circulation* 101, 660–667. doi: 10.1161/01.CIR.101.6.660

Heineke, J., and Molkentin, J. D. (2006). **Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 589–600. doi: 10.1038/nrm1983

Hill, J. A., and Olson, E. N. (2008). Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* 358, 1370–1380. doi: 10.1056/NEJMra072139

Kim, H., Scimia, M. C., Wilkinson, D., Trelles, R. D., Wood, M. R., Bowtell, D., et al. (2011). **Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia.** *Mol. Cell* 44, 532–544. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.045

Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B., and Castelli, W. P. (1990). **Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study**. *N. Engl. J. Med.* 322, 1561–1566. doi: 10.1056/NEJM199005313222203

Lim, S., Smith, K. R., Lim, S. T., Tian, R., Lu, J., and Tan, M. (2016). **Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation.** *Cell Biosci.* 6:25. doi: 10.1186/s13578-016-0089-3

Matsui, T., Li, L., Del Monte, F., Fukui, Y., Franke, T. F., Hajjar, R. J., et al. (1999). **Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3′-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro.** *Circulation* 100, 2373–2379. doi: 10.1161/01.CIR.100.23.2373

Miyamoto, S., Murphy, A. N., and Brown, J. H. (2008). **Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II.** *Cell Death Differ.* 15, 521–529. doi: 10.1038/sj.cdd.4402285

Morales, C. R., Li, D. L., Pedrozo, Z., May, H. I., Jiang, N., Kyrychenko, V., et al. (2016). **Inhibition of class I histone deacetylases blunts cardiac hypertrophy through TSC2-dependent mTOR repression.** *Sci. Signal.* 9:ra34. doi: 10.1126/scisignal.aad5736

Newhall, K. J., Criniti, A. R., Cheah, C. S., Smith, K. C., Kafer, K. E., Burkart, A. D., et al. (2006). **Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation.** *Curr. Biol.* 16, 321–327. doi: 10.1016/j.cub.2005.12.031

Perrino, C., Feliciello, A., Schiattarella, G. G., Esposito, G., Guerriero, R., Zaccaro, L., et al. (2010). **AKAP121 downregulation impairs protective cAMP signals, promotes mitochondrial dysfunction, and increases oxidative stress.** *Cardiovasc. Res.* 88, 101–110. doi: 10.1093/cvr/cvq155

Perrino, C., Naga Prasad, S. V., Mao, L., Noma, T., Yan, Z., Kim, H. S., et al. (2006). **Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular**

rarefaction. *J. Clin. Invest.* 116, 1547–1560. doi: 10.1172/JCI25397

Perrino, C., and Rockman, H. A. (2007**). Reversal of cardiac remodeling by modulation of adrenergic receptors: a new frontier in heart failure.** *Curr. Opin. Cardiol.* 22, 443–449. doi: 10.1097/HCO.0b013e3282294d72

Perrino, C., Schiattarella, G. G., Sannino, A., Pironti, G., Petretta, M. P., Cannavo, A., et al. (2013). **Genetic deletion of uncoupling protein 3 exaggerates apoptotic cell death in the ischemic heart leading to heart failure.** *J. Am. Heart Assoc.*2:e000086. doi: 10.1161/JAHA.113.000086

Rababa'h, A., Singh, S., Suryavanshi, S. V., Altarabsheh, S. E., Deo, S. V., and Mcconnell, B. K. (2014). **Compartmentalization role of A-kinase anchoring proteins (AKAPs) in mediating protein kinase A (PKA) signaling and cardiomyocyte hypertrophy.** *Int. J. Mol. Sci.* 16, 218–229. doi: 10.3390/ijms16010218

Rinaldi, L., Sepe, M., Delle Donne, R., Conte, K., Arcella, A., Borzacchiello, D., et al. (2017). **Mitochondrial AKAP1 supports mTOR pathway and tumor growth.** *Cell Death Dis.* 8:e2842. doi: 10.1038/cddis.2017.241

Schiattarella, G. G., Cattaneo, F., Carrizzo, A., Paolillo, R., Boccella, N., Ambrosio, M., et al. (2018). **Akap1 regulates vascular function and endothelial cells behavior.** *Hypertension* 71, 507–517. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10185

Schiattarella, G. G., Cattaneo, F., Pironti, G., Magliulo, F., Carotenuto, G., Pirozzi, M., et al. (2016). **Akap1 deficiency promotes mitochondrial aberrations and exacerbates cardiac injury following permanent coronary ligation via enhanced**

mitophagy and apoptosis. *PLoS One* 11:e0154076. doi: 10.1371/journal.pone.0154076

Schiattarella, G. G., and Hill, J. A. (2015). **Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload.** *Circulation* 131, 1435–1447. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.013894

Schiattarella, G. G., Hill, T. M., and Hill, J. A. (2017). **Is load-induced ventricular hypertrophy ever compensatory?** *Circulation*136, 1273–1275. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030730

Scorziello, A., Savoia, C., Sisalli, M. J., Adornetto, A., Secondo, A., Boscia, F., et al. (2013). **NCX3 regulates mitochondrial Ca(2+) handling through the AKAP121-anchored signaling complex and prevents hypoxia-induced neuronal death.** *J. Cell Sci.*126, 5566–5577. doi: 10.1242/jcs.129668

Torrealba, N., Aranguiz, P., Alonso, C., Rothermel, B. A., and Lavandero, S. (2017). **Mitochondria in structural and functional cardiac remodeling.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 982, 277–306. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_15

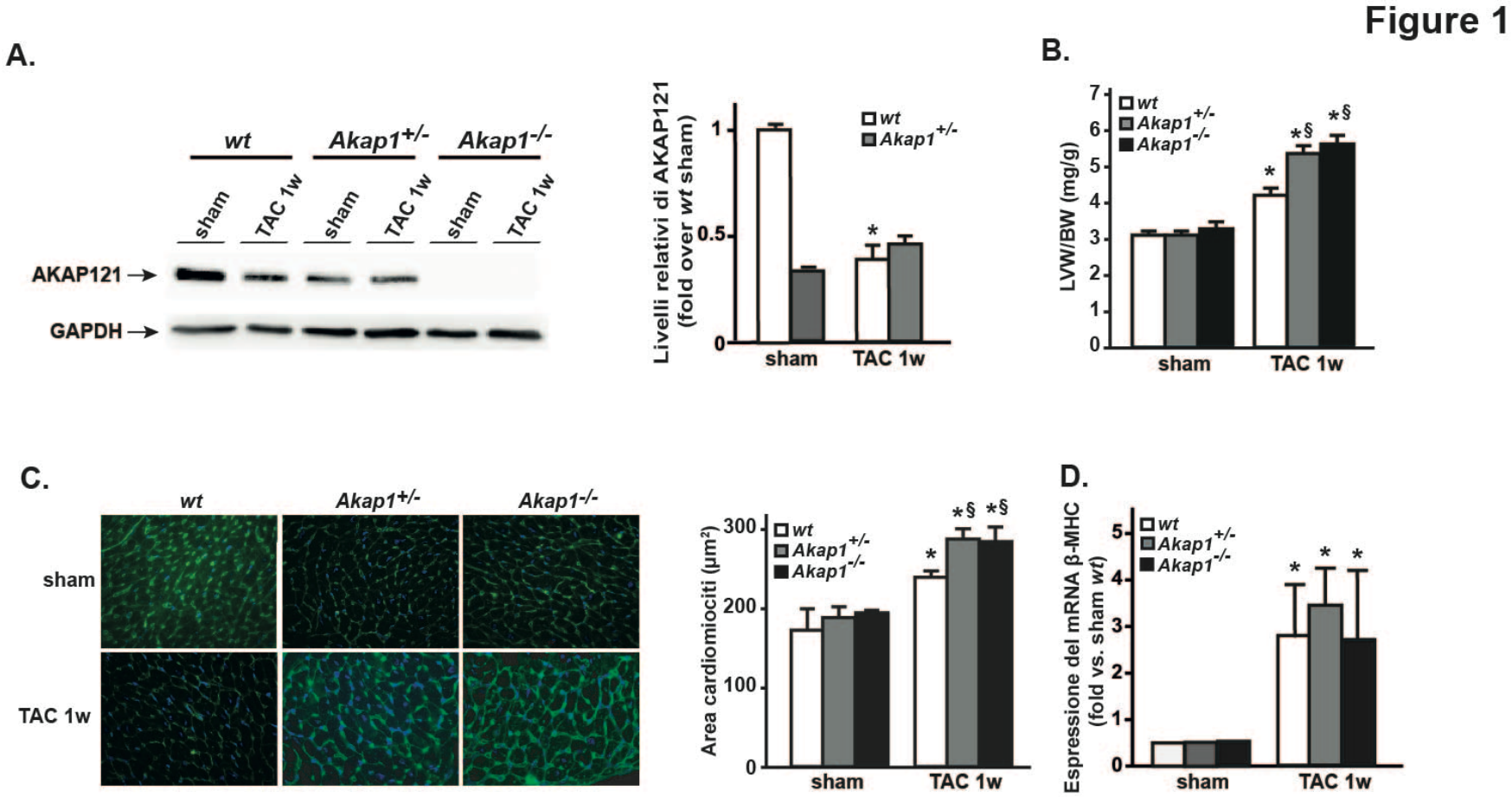

FIGURE 1 | Il deficit di Akap1 esarcerbera l'ipertrofia dopo sovraccarico di pressione. (A) Immunoblot rappresentativo (sinistra) e analisi densitometrica (destra) dei livelli della proteina AKAP121 in cuori sham (n=5) e 1 settimana dopo costrizione dell'aorta trasversa (TAC 1w; n=7) di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$. GAPDH era usato come controllo per il caricamento del campione (*p<0.05 vs. sham; §p < 0.05 vs. wt TAC 1w; n = 7 cuori per gruppo). **(B)** Bar graf mostra risultati del peso del ventricolo sinistro (LVW) rispetto il peso corporeo (BW) a una settimana dalla procedura sham o TAC in *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$ (*p<0.05 vs. sham; §p < 0.05 vs. wt TAC 1w; n = 7 cuori per gruppo). **(C)** (Sinistra) Immagine rappresentativa di staining di wheat germ agglutinin (WGA) di sezioni trasverali di cuore di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$ dopo una settimana dalla procedura sham o TAC. Il DAPI è stato utilizzato per identificare i nuclei. Scala bar: 20mm. (Destra) Bar graph mostra i risultati di piu esperimenti indipendenti e analizza l'area dei cardiomiociti in cross-sectional (p<0.05 vs. sham; §p < 0.05 vs. wt TAC 1w; n=5 cuori per gruppo). **(D)** Livelli di mRNA della catena pesante β-miosina (β-MHC) da campioni cardiaci di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$ dopo una settimana dalla procedura sham o TAC (*p < 0.05 vs. sham; n =5 cuori per gruppo).

Figura 2

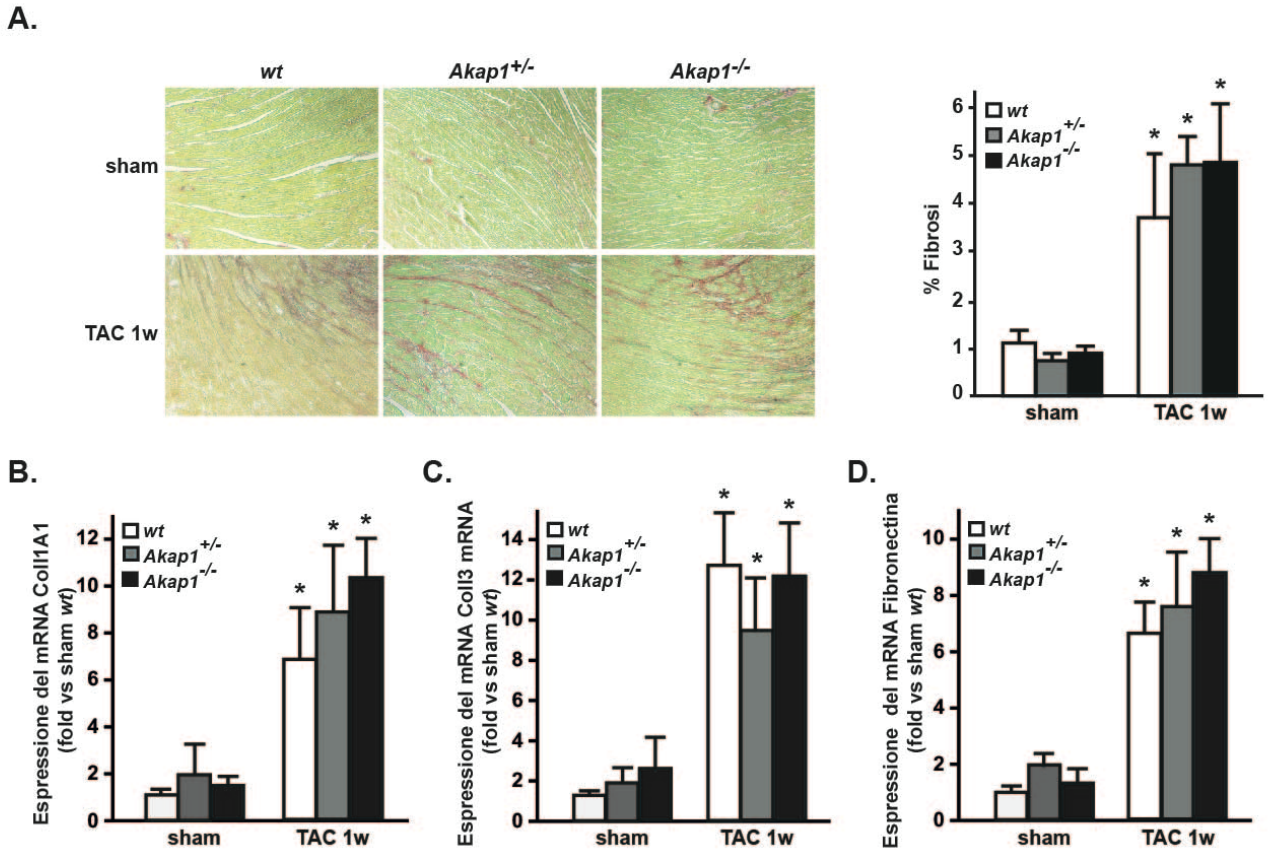

Figura 2. | La perdita di Akap1 non ha effetti sulla fibrosi cardiaca dopo sovraccarico di pressione. (A) (Sinistra) Immagine rappresentativa della colorazione chimica Picrosirius Red di sezioni trasversali di cuore di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$*, Akap1*$^{-/-}$ dopo una settimana dalla procedura sham o TAC. Scale bar: 40 mm. (Destra) Bar graph che mostra i risultati delle analisi di esperimenti indipendenti in percentuale di fibrosi (*$p < 0.05$ vs. sham wt; n = 5 cuore/gruppo). Livelli di espressione dell'mRNA di collagene **(Coll1A1,B)**, mRNA di collagene di tipo III **(Coll3;C)**, e mRNA di fibronectina **(D)** in campioni di tessuto cardiaco di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$*, Akap1*$^{-/-}$ dopo 1 settimana di sham o di TAC (*$p < 0.05$ vs. sham wt; n=5 cuore per gruppo).

Figura 3

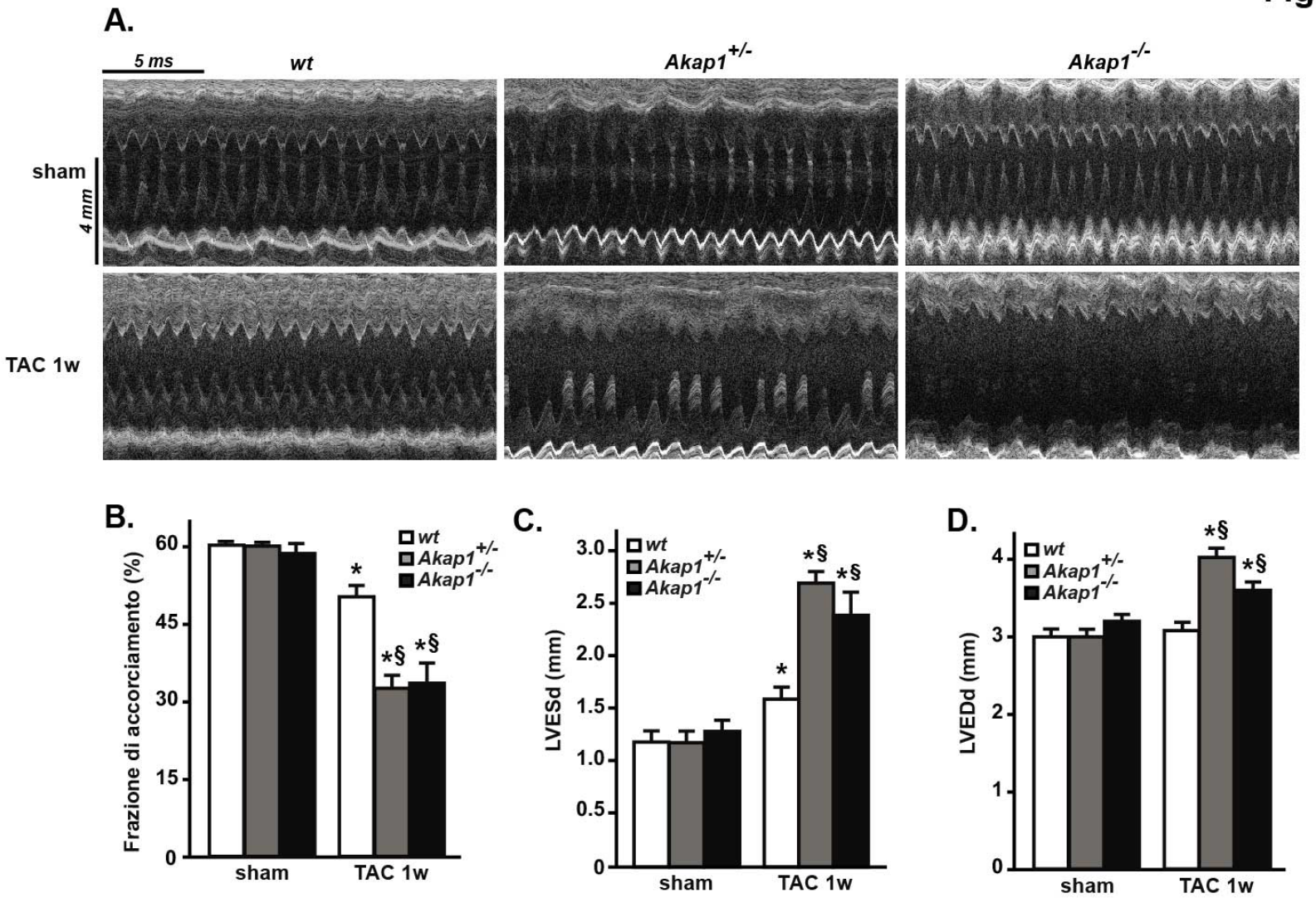

Figura 3. | La perdita di Akap1 non ha effetti sulla fibrosi cardiaca dopo sovraccarico di pressione. (A) Traccia ecocardiografica M-mode (2M) del ventricolo sinistro di topi *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$ dopo una settimana dalla procedura sham o TAC (n = 7 topi per gruppo). Risultati della frazione di accorciamento in % **(B)**, diametro del ventricolo sinistro in sistole **(LVESd;C)** e diametro del ventricolo sinistro in diastole **(LVEDd;D)** in topi *wt, Akap1*$^{+/-}$, *Akap1*$^{-/-}$ dopo una settimana dalla procedura sham o TAC (*$p < 0.05$ vs. sham; §$p < 0.05$ vs. TAC 1w wt; n = 5 cuori per gruppo).

Figure 4

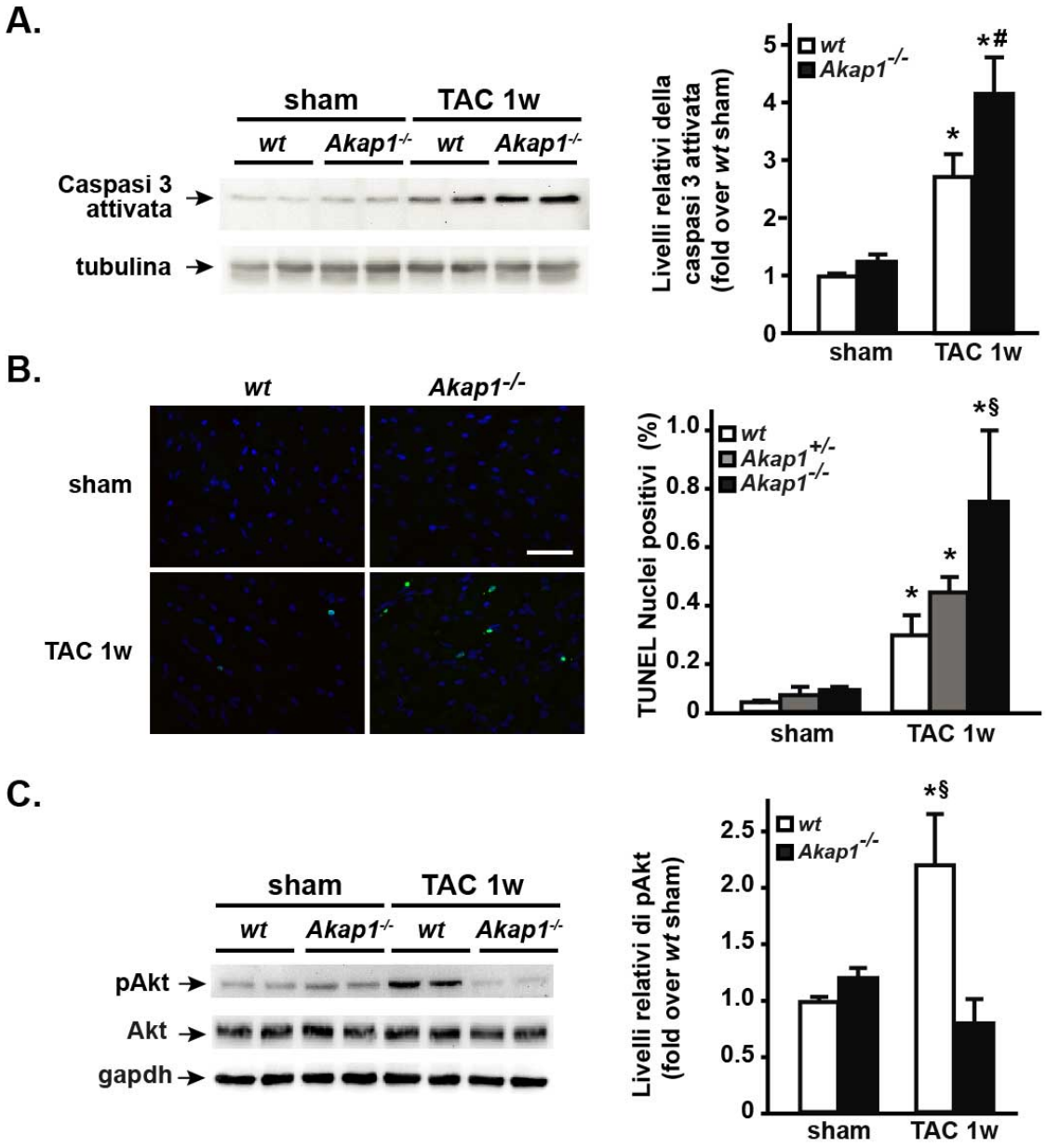

Figura 4. | Incremento della apoptosi cardiaca e assenza di Akt attivata in topi Akap1$^{-/-}$ dopo TAC. **(A)** Immunoblot rappresentativo (sinistra) e analisi densitometrica (destra) dei livelli della proteina caspasi 3 attivata in topi *wt* e *Akap1$^{-/-}$* dopo procedura sham o TAC ($p < 0.05$ vs. sham; §$p < 0.05$ vs. wt TAC 1w; n = 5 cuori/gruppo). La tubulina era usata come controllo della corsa del campione. **(B)** (Sinistra) Immagine rappresentativo di DAPI e TUNEL di sezioni cardiache di topi *wt* e *Akap1$^{-/-}$* dopo una settimana dalla procedura sham o TAC. Scale bar :20 mm. (Destra) Bar graph dei risultati di esperimenti indipendenti per valutare cellule TUNEL positive ($p < 0.05$ vs. sham; §$p < 0.05$ vs. wt TAC 1w; n = 5 cuore/gruppo). **(C)** Immunoblot rappresentativo (sinistra) e analisi densitometriche (destra) di Akt fosforilata nella serina 473 (pAkt) e *Akt* in topi *wt* e *Akap1$^{-/-}$* dopo procedura sham o TAC. GAPDH era usata come controllo della corsa del campione ($p < 0.05$ vs. sham; §$p < 0.05$ vs. wt TAC 1w; n = 5 cuore/gruppo).

Figura 5

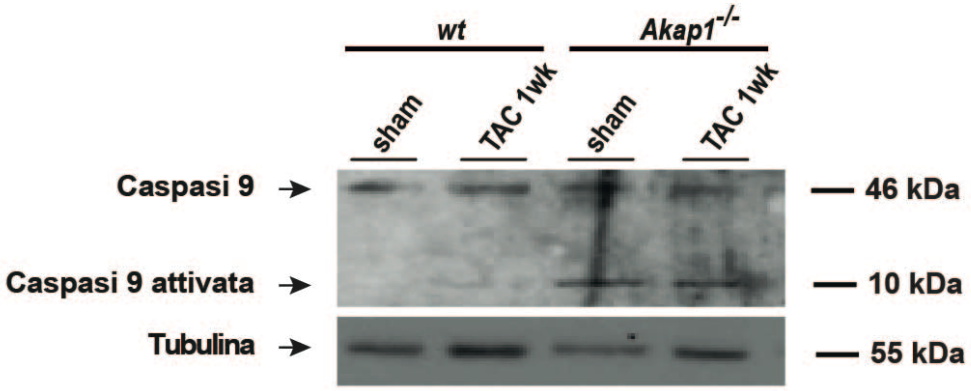

Figura 5. | Caspasi 9 attivata in campioni di tessuto cardiaco di topi *wt* **e** *Akap1*$^{-/-}$ **dopo procedura sham o TAC.** La proteina tubulina era usata come controllo della corsa.

Figura 6

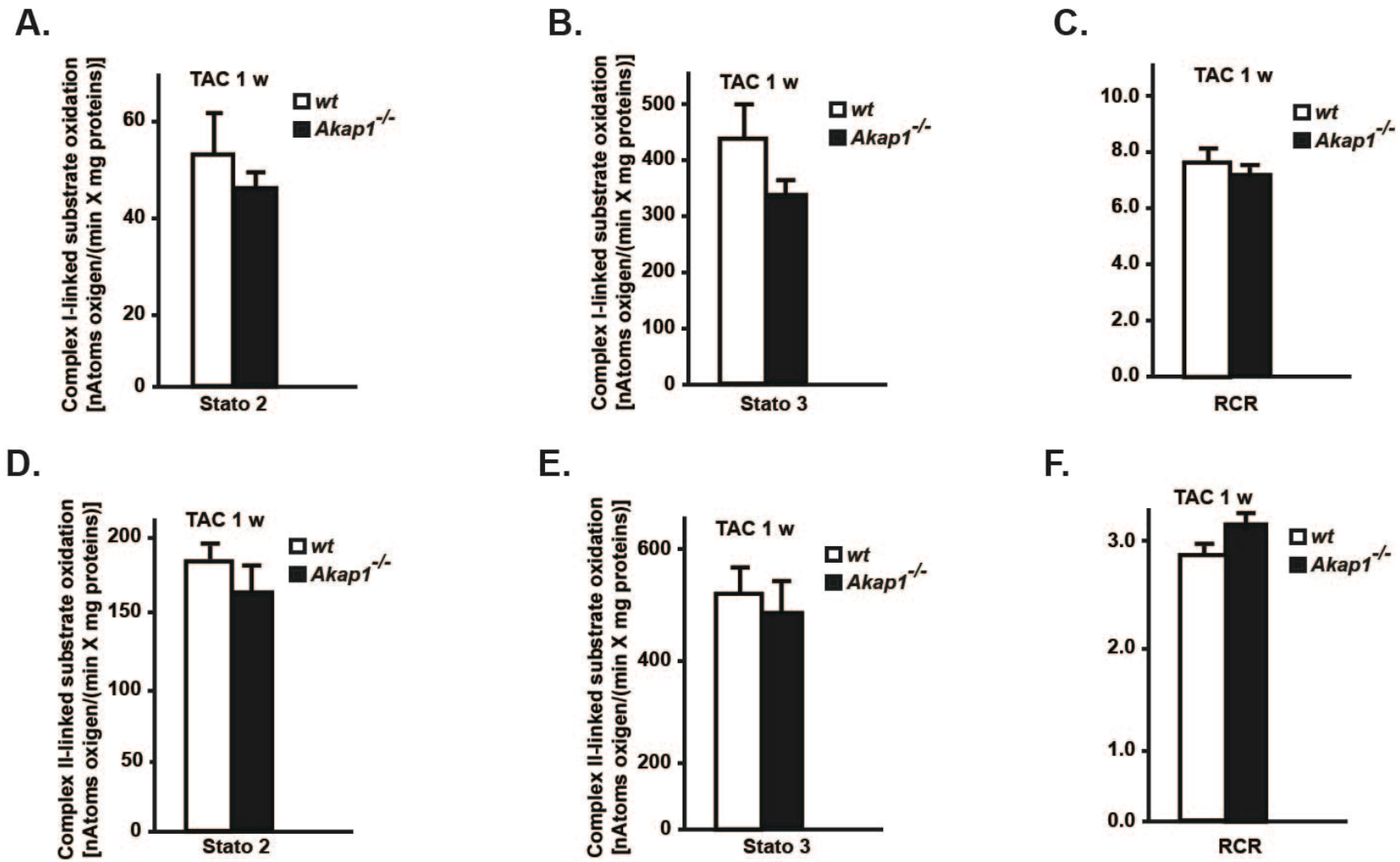

Figura 6 | Assenza di differenza nella risposta mitocondriale fra *wt* e *Akap1*$^{-/-}$ in cuore ipertrofico. Paremetri della respirazione mitocondriale [Stato 2, Stato 3 e ratio del controllo della respirazione (RCR) in cuori *wt* e *Akap1* dopo una settimana di TAC]. I parametri eranno valutati in presenza dei substrati che legano il complesso I (Piruvato+malato) (A-C) e substrati per il complesso II (succinato+rotenone) (D-E). Bar Graph mostrano la media ± s.e.m. di 4 cuori/gruppo.

Tabella 1| Analisi ecocardiografica e morfometrica in differenti gruppi sperimentali di topi.

	wt		***Akap1*$^{+/-}$**		***Akap1*$^{-/-}$**	
	sham	**TAC 1w**	**sham**	**TAC 1w**	**sham**	**TAC 1w**
	(n=8)	(n=12)	(n=6)	(n=13)	(n=6)	(n=9)
Morfometria						
BW, g	27.3 ± 1.4	23.0 ± 0.7*	23.3 ± 0.8	23.6 ± 0.9	23.4 ± 1.1	23.0 ± 0.5
LVW, mg	84.9 ± 4.9	100.4 ± 5.9*	73.6 ± 3.3	124.0 ± 4.4*§	76.9 ± 7.0	99.6 ± 5.3*#
LAW, mg	8.9 ± 1.0	9.3 ± 0.7	6.4 ± 0.5	9.6 ± 0.9*	7.4 ± 0.7	10.7 ± 0.8*
HW, mg	112.5 ± 7.0	131.8 ± 7.8	95.8 ± 4.7	154.6 ± 4.7*§	105.8 ± 10.2	135.1 ± 7.3*#
LVW/BW, mg/g	3.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2*	3.1 ± 0.1	5.4 ± 0.2*§	3.3 ± 0.2	5.7 ± 0.6*§
HW/BW, mg/g	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.3*	4.1 ± 0.1	6.6 ± 0.2*	4.5 ± 0.3	5.9 ± 0.3*
Ecocardiografia						
LVEDd, mm	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1*§	3.2 ± 0.1	3.6 ± 0.1*§
LVESd, mm	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1*§	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.2*§
IVSd, mm	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.0*	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0*	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0*
PWd, mm	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0*	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0*	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.1
FS, %	60.6 ± 1.8	50.3 ± 2.3*	60.0 ± 1.2	32.5 ± 2.8*§	58.6 ± 2.3	33.5 ± 3.4*§
HR, bpm	573 ± 11	583 ± 17	595 ± 30	584 ± 23	681 ± 19	661 ± 16

BW, peso corporeo; **LVW**, peso del ventricolo sinistro; **HW**, peso del cuore; **LVEDd**, diametro del ventricolo sinistro in diastole; **LVESd**, diametro del ventricolo sinistro in sistole; **IVSd**, diametro del setto interventricolare in diastole ; **PWd**, diametro della parete posteriore in diastole; **FS**, frazione di accorciamento; **HR**, frequenza cardiaca (*$p<0.05$ vs. corrispondente sham; §$p<0.05$ vs. *wt* TAC 1 w; #$p<0.05$ vs. *Akap1*$^{+/-}$ TAC 1 w).