

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI  
NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Tesi di Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale - XXII° Ciclo

Coordinatore: Ch.<sup>mo</sup> Prof. Gianni Marone

## Analisi dei Meccanismi Molecolari di Citoprotezione in Risposta allo Stimolo Ipossico

Anno Accademico 2008/2009

Tutor  
Ch.<sup>mo</sup> Prof. Bruno Trimarco

Candidato  
Dott. Alessandro Bellis

## Indice

---

Indice.....	- 2 -
Introduzione .....	- 4 -
Capitolo 1 .....	- 9 -
1.1 Reagenti e Sostanze Chimiche.....	- 9 -
1.2 Colture Cellulari .....	- 9 -
1.3 Ipossia .....	- 9 -
1.4 Stima della Produzione di Ossido Nitrico (NO).....	- 10 -
1.5 Valutazione di Apoptosi e Necrosi .....	- 11 -
1.6 Saggio di Attività di Protein Chinasi A (PKA).....	- 11 -
1.7 Immunoblotting ed Immunoprecipitazione .....	- 12 -
1.8 Transfezione Transitoria .....	- 13 -
1.9 Preparazione degli Estratti Nucleari.....	- 14 -
1.10 Analisi Statistica.....	- 14 -
Capitolo 2 .....	- 15 -
2.1 Il PC Protegge le Cellule Endoteliali dalla Morte Cellulare Indotta dall' Ipossia.....	- 15 -
2.2 Il PC Induce Sintesi di NO in Cellule Endoteliali .....	- 16 -
2.3 PKA e PI3K Mediano la Sintesi di NO durante il Precondizionamento Tardivo.....	- 17 -
2.4 Il PC Attiva PKA ed Akt.....	- 18 -
2.5 PKA e Akt Mediano la Protezione Cellulare durante il PC Tardivo .....	- 19 -
2.6 Il Donatore di NO (NOC-12) non Conferisce Protezione dall' Apoptosi indotta da Ipossia in bAEC .....	- 21 -
2.7 PKA e PI3K Mediano l' Attivazione di Akt Indotta dal PC .....	- 21 -
2.8 PKA è Primariamente Interessata nella Protezione Indotta dal PC .....	- 22 -
Capitolo 3 .....	- 24 -
Bibliografia .....	- 28 -
Figure .....	- 34 -

Legende delle figure..... - 50 -

Tabelle ..... - 58 -



## Introduzione

---

E' ben noto che le cellule endoteliali svolgono la funzione di proteggere l'organismo dal rischio di sviluppare malattia aterosclerotica e trombotica. Un ruolo fondamentale, in questo senso, è esercitato dalla ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS), un enzima che genera la molecola vasoprotettiva ossido nitrico (NO).

NO vascolare ha la capacità di dilatare i vasi sanguigni stimolando l'enzima guanilato-ciclasasi solubile ed aumentando il quantitativo di guanosina monofosfato ciclico (cGMP) nelle cellule muscolari lisce (1). NO è, inoltre, un potente inibitore dell'aggregazione e dell'adesione piastrinica, impedisce l'adesione dei leucociti alla parete vasale interferendo nel legame delle molecole di adesione CD11/CD18 alla superficie dell'endotelio e riduce l'espressione delle suddette proteine di superficie nelle cellule della serie bianca. Tali effetti, uniti alle proprietà antimitotiche esercitate sulle cellule muscolari lisce, rendono NO la principale difesa, presente nei vasi, contro l'aterosclerosi e la trombosi.

In presenza di fattori di rischio cardiovascolare, è frequente il riscontro di disfunzione endoteliale, caratterizzata da alterazioni dell'attività catalitica di eNOS. I meccanismi molecolari responsabili di tale fenomeno sono differenti e, probabilmente, ancora non completamente noti, ma presentano tutti un comune

denominatore: l'aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

In modelli sperimentali di ipertensione arteriosa (2), diabete mellito (3) ed ipercolesterolemia (4) si è osservato un incremento della espressione e/o dell'attività delle NADPH Ossidasi (NOX) nella parete vascolare, con conseguente produzione di ROS. I ROS, in particolare il radicale libero dell'ossigeno  $O_2^-$ , reagiscono molto rapidamente con NO, dando origine a composti reattivi denominati perossinitriti ( $ONOO^-$ ) responsabili del disaccoppiamento e della disfunzione enzimatica di eNOS.

L'azione degli  $ONOO^-$  può essere diretta (ossidazione della tetraidrobiopterina e dei residui tiolici presenti nella proteina) oppure indiretta, mediata cioè dall'attivazione di alcuni enzimi con potere inibitorio (protein-chinasi AMP ciclico-dipendente [AMPK]) (5) e dalla nuova espressione di altri (arginasi e N-metil-trasferasi), che riducono il substrato (arginina) (6) o producono un antagonista (dimetil-arginina asimmetrica) (7) di eNOS.

Tuttavia, un recente studio (8) ha dimostrato che esiste una regolazione positiva del pathway di fosforilazione di eNOS da parte dei ROS e che tale controllo è dose-dipendente. In particolare, è stato dimostrato che basse concentrazioni di  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ) inducono la fosforilazione di eNOS tramite fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), mentre maggiori concentrazioni di tale agente, così come la deplezione dei gruppi tiolici di membrana, hanno evidenziato una riduzione dell'attivazione enzimatica.

Inoltre, esperimenti condotti su colture cellulari di bAEC (bovine Aortic Endothelial Cells) hanno mostrato come l'applicazione di "shear stress" (stress di parete), tramite produzione di piccole quote di ROS, sia in grado di determinare fosforilazione di eNOS mediante un pathway coinvolgente protein chinasi A (PKA) e Akt (9).

Da ciò si può desumere che, probabilmente, i ROS a basse concentrazioni siano capaci, ossidando i gruppi tiolici delle proteine di membrana, di modificare la

conformazione sterica di alcuni recettori, che si fanno, poi, promotori dei meccanismi di difesa attraverso l'attivazione della produzione di NO da parte di eNOS con un meccanismo PKA/Akt-dipendente.

Il **Precondizionamento Ischemico (PC)** è definito come il fenomeno fisiologico in cui brevi e ripetuti cicli di ischemia/riperfusione, conferiscono protezione contro la morte cellulare indotta da ipossia a quegli organi che sono composti da cellule differenziate in maniera terminale, come il cuore ed il cervello. Tale effetto è stato associato al rilascio di NO indotto, in questi organi, dalla formazione di modeste quote di ROS.

Successivamente, studi condotti da Richard et al. (10) hanno evidenziato come il PC non sia prerogativa peculiare del cuore e del cervello, ma sia anche in grado di proteggere l'endotelio dal danno provocato da ischemia/riperfusione, inducendo sintesi di NO. In aggiunta, Sun et al. (11) hanno dimostrato che la somministrazione di una combinazione di anti-ossidanti (super-ossido dismutasi [SOD] + catalasi + mercaptopropionil-glicina [MPG]), durante la fase ischemica di induzione del PC, previene lo sviluppo della protezione contro il danno endoteliale coronarico indotto da riperfusione in cuori di porcellini d'India.

Il riscontro della capacità di preconditionamento da parte dell'endotelio ha aperto importanti prospettive nell'ambito della ricerca scientifica riguardante la protezione contro il danno d'organo indotto da ischemia/riperfusione. Infatti, effetti positivi sul danno da riperfusione si sono osservati anche in organi (cuore, rene, cervello, fegato) (12-15) siti a distanza dal distretto vascolare preconditionato, lasciando immaginare la possibilità di indurre protezione in un determinato distretto dell'organismo, pur senza applicare direttamente su di esso lo stimolo preconditionante.

Quest'ultima osservazione assume un notevole rilievo, dal momento che il PC endoteliale è l'unico a poter essere riprodotto anche negli uomini: a livello del sistema circolatorio periferico, in volontari sani, esso previene sia il

disaccoppiamento della vasodilatazione flusso-mediata nell'arteria radiale che la perdita della risposta vasodilatatoria alla stimolazione con acetilcolina nell'avambraccio dopo prolungata ischemia locale (16).

Nonostante sia già noto che gli effetti del PC endoteliale rispecchiano i tempi di quello osservato a livello cardiaco (*immediati* e di breve durata [1 h]; *tardivi* e di lunga durata [24-72 h]), ancora non sono ben chiari i meccanismi molecolari che risultano determinanti per la protezione in questo distretto.

Nella fase precoce o "early" del PC è stata evidenziato il ruolo di mediatori svolto da NO, dalle chinine (17) e dalle prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) (18), così come quello di effettori della protezione esercitato dalla protein chinasi C (PKC) (19) e dai canali del K<sup>+</sup> - ATP sensibili (20).

Sulla fase tardiva o "late" del PC, viceversa, le nozioni sono ancora frammentarie ed una certa unanimità di pareri è presente soltanto riguardo la funzione di primo piano svolta da eNOS, la cui inibizione provoca un'abolizione della protezione, mentre non indispensabile appare la sintesi di NO dipendente dalla forma inducibile (iNOS) (21).

Recentemente è stato dimostrato che Akt, una serin/treonin chinasi, gioca un ruolo fondamentale nella genesi di NO in cellule endoteliali, inducendo la fosforilazione di eNOS in serina1177 (ser1177) e, conseguentemente, un aumento dell'attività di tale enzima (22). Ancor più interessante è l'osservazione che Akt viene attivata da numerosi sistemi ligando-recettore dimostratisi protettivi nei confronti della morte cellulare, come l'insulina (23), IGF-1 (23) e gp130 (24). Inoltre, è stato riportato che, in cellule endoteliali in coltura, gli effetti anti-apoptotici indotti dallo "shear stress" (25) e dal PC (26) sono mediati da un meccanismo Akt-dipendente.

E' quindi possibile ipotizzare che il PC attivi Akt. In tal caso, la fosforilazione/attivazione di Akt potrebbe contribuire in maniera diretta alla protezione cellulare indotta dal PC mediante la promozione della sopravvivenza

cellulare e stimolando la sintesi di NO.

Scopo di questo studio è stato, quindi, quello di esplorare i meccanismi molecolari coinvolti nella protezione cellulare indotta dal PC tardivo mediante un modello di PC riprodotto in cellule endoteliali in coltura ed, in particolare, di investigare il ruolo specifico di Akt ed NO.





## Capitolo 1

---

### Materiali e Metodi

#### 1.1 Reagenti e Sostanze Chimiche

H89, LY294002, Go6983, N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil-estere (L-NAME), 1400W, N-Acetil-Cisteina (NAC), N-naftil-etilen-diamina diidrocloreuro, sulfanilamide, nitrito di sodio, acido fosforico, kemptide e NOC-12 sono stati acquistati presso la Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, MO; USA).

#### 1.2 Colture Cellulari

Per gli esperimenti sono state utilizzate bAEC tra i passaggi 3<sup>o</sup> - 8<sup>o</sup>, acquistate da Lonza Biologics Inc (Portsmouth, USA), coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza Biologics Inc; Portsmouth, USA), arricchito con Siero Bovino Fetale (10%) (Lonza Biologics Inc; Portsmouth, USA), Penicillina-Streptomicina (1%) (Lonza Biologics Inc; Portsmouth, USA) e Glutamina (1%) (Lonza Biologics Inc; Portsmouth, USA) e mantenute a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

#### 1.3 Ipossia

Le bAEC sono state piastrate in dischi di 100 mm e portate ad una confluenza del

90-95%. Le condizioni ipossiche sono state ricreate utilizzando un mezzo di coltura privo di nutrienti e fattori di crescita (NaCl 116 mM, KCl 54mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 800 µM, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, Glicina 10 mM e Rosso Fenolo 0.001%, pH 7.3), precedentemente saturato per 10 minuti ad 1 Atm con una miscela di Azoto 95% - CO<sub>2</sub> 5%, ed incubando le cellule in una camera dedicata, riempita con la medesima miscela di gas e mantenuta a 37°C. Il pH, la PO<sub>2</sub> e la PCO<sub>2</sub> del mezzo, prima dell'applicazione dello stimolo ipossico ed al suo termine, sono risultate rispettivamente di 7.36 ± 0.2, 45.3 ± 1.2 mmHg, e 35.3 ± 0.8 mmHg e 7.32 ± 0.9, 32.6 ± 1.1 e 37.9 ± 2.1 mmHg (27).

## 1.4 Stima della Produzione di Ossido Nitrico (NO)

### 1.4.1 Saggio di conversione di L-arginina in L-citrullina

Le colture cellulari, giunte al 90-95% di confluenza in piastre di 100 mm e poste in quiescenza per 12 ore prima dell'esperimento, sono state sottoposte al protocollo di preconditionamento. A tempi predefiniti di stimolazione (0, 1, 6, 12, 24, 48 ore), sono state omogeneizzate in Tris HCl 25 mmol/L, pH 7.4, EDTA 1 mmol/L, e EGTA 1 mmol/L. Il pellet è stato recuperato dopo centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti e 20 µg di proteina sono stati incubati in Tris HCl 25 mmol/L, tetraidrobiopterina 3 µmol/L, flavin-adenin-dinucleotide 1 µmol/L, flavin-adenin-mononucleotide 1 µmol/L, NADPH 25 µmol/L, CaCl<sub>2</sub> 10 µmol/L, e [3H]arginine 2 nCi/µL (Bcs Biotech SpA; Italia) per 60 minuti a 37°C. La reazione è stata arrestata con un equal volume di HEPES 50 mmol/L e EDTA 5 mmol/L e, successivamente, è stata effettuata cromatografia su colonne Dowex AG50WX-8. Il flusso è stato valutato mediante aggiunta di liquido di scintillazione e lettura al gamma-counter. La produzione di citrullina è stata misurata in picomoli per minuto per milligrammo di proteina ed espressa come variazioni unitarie del volume basale (28).

#### 1.4.2 Reazione di GRIESS

L'accumulo di nitriti è stato misurato all'interno del mezzo di coltura mediante la reazione di GRIESS (29). In breve, le cellule sono state coltivate in dischi multipli e poste in quiescenza per la notte. Il giorno successivo, le cellule sono state stimolate come descritto, ed il mezzo di coltura è stato rimosso e centrifugato a 1000 rpm per rimuovere le cellule morte. Il sopranatante è stato successivamente testato con una soluzione 1 : 1 di  $\alpha$ -naftil-etilenediamina (stock solution 0.1% w/v in H<sub>2</sub>O) e sulfanilamide (stock solution 1% w/v, in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) per 10 minuti e mantenuto in condizioni di buio a 23°C. La produzione di nitriti è stata registrata con uno spettrofotometro a luminescenza Perkin-Elmer LS 55 (Perkin-Elmer Ltd, Beaconsfield, England) mediante la valutazione dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 550 nm. Per quantificare la produzione di nitriti ottenuta durante gli esperimenti è stata utilizzata una curva standard di NaNO<sub>2</sub>.

#### 1.5 Valutazione di Apoptosi e Necrosi

Le cellule cresciute su vetrini sono state colorate con Annessina V (AV) e con Propidio Ioduro (PI) (Annexin-V- FLUOS Staining Kit, Roche). Le cellule apoptotiche sono risultate positive all' AV, mentre quelle necrotiche sia all'AV che al PI. La percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche è stata calcolata dividendo il numero di cellule AV-positive/PI-negative e AV-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente (27).

#### 1.6 Saggio di Attività di Protein Chinasi A (PKA)

L'attività di PKA è stata testata mediante analisi della fosforilazione del peptide sintetico kemptide (Kp; substrato specifico di PKA). Il saggio è stato condotto come precedentemente descritto (30). Le bAEC sono state lisate in un buffer

contenente  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, NaF 1 mM, EGTA 1.5 mM, NONIDET P-40 1%, EDTA 1 mM, PMSF 0.1 mM, leupeptina 10  $\mu$ g/ml, aprotinina 10  $\mu$ g/ml e DTT 1 mM. La fosforilazione è stata condotta in un volume finale di 50  $\mu$ l contenenti HEPES 50 mM (pH 7.5),  $MgCl_2$  10 mM e Kp 1  $\mu$ g. La fosforilazione è stata iniziata mediante l'aggiunta di [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP 10  $\mu$ M (6 Ci/mmol; Bcs Biotech SpA; Italia). La reazione è stata fatta procedere per 20 minuti a temperatura ambiente e bloccata mediante l'aggiunta di sample buffer (Tris 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerolo 10%, bromofenolo blu 0.006%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%) e bollitura per 3 minuti a 95 °C. I campioni sono stati risolti su gel SDS-PAGE 10% e sottoposti ad autoradiografia. La fosforilazione di Kp da parte della subunità catalitica di PKA (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO; USA) è stata utilizzata come controllo positivo.

## 1.7 Immunoblotting ed Immunoprecipitazione

Le cellule, cresciute in piastre di 100 mm e portate ad una confluenza del 90-95%, sono state lavate due volte con Dulbecco PBS  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -free freddo e lisate con un buffer contenente HEPES 50 mM (pH 7.6), EDTA 1 mM, EGTA 5 mM,  $MgCl_2$  10 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 50 mM, vanadato 1 mM, fluoruro di sodio 10 mM, sodiopirofosfato 30 mM, ditiotreitolo 2 mM, AEBSF 1 mM, per la rilevazione della fosforilazione di Akt da parte di anticorpi anti-fosfo-Akt (serina473 e treonina308) (Cell Signaling Technology). Per i restanti immunoblotting, le cellule sono state lisate con un buffer contenente NaCl 150 mM, Tris 50 mM (pH 7.5), acido deossicolico 0.5%, NP-40 1% (IGEPAL CA-630), SDS 0.1%, sodio ortovanadato 0.1 mM, fluoruro di sodio 1 mM, PMSF 0.5 mM, aprotinina 0.5  $\mu$ g/ml, e leupeptina 0.5  $\mu$ g/ml (RIPA Buffer).

Per verificare la presenza di un complesso funzionale deputato all'attivazione della sintesi di NO, abbiamo utilizzato la tecnica della co-immunoprecipitazione. Le bAEC sono state lisate con RIPA e, una volta effettuata la normalizzazione per

il contenuto proteico, 250 µg per ciascun campione sono stati immunoprecipitati con 1 µg di anticorpo anti-Akt totale (Santa Cruz Biotechnology, Inc) oppure 1 µg di anticorpo anti-subunità catalitica di PKA (Santa Cruz Biotechnology, Inc), in presenza di 30 µl di proteina A/G Sefarosio (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Gli immunoprecipitati sono stati risolti su gel Nu-Page 4-12%, trasferiti ad una membrana in polivinilidene difluoruro (PVDF) e saggiati con anticorpi primari. Abbiamo utilizzato i seguenti anticorpi primari: anti-fosfo-ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) serina1177 (ser1177), anti-Bad, anti-fosfo-Bad serina112 e serina136 (ser112 e ser136), anti-caspasi-3, anti-caspasi-3 clivata, anti-nitrotirosina (Cell Signaling Technology); anti-ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS), anti-actina, anti-Akt, anti-subunità catalitica di PKA (Santa Cruz Biotechnology, Inc); anti-eNOS (BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup>; San Jose, CA USA); anti-emagglutinina (HA; Covance, Princeton, New Jersey).

Anticorpi perossidasi-coniugati (Cell Signaling e Santa Cruz Technology) sono stati utilizzati come anticorpi secondari. Il legame dell'anticorpo secondario è stato rilevato mediante aumento della chemiluminescenza (Amersham Pharmacia Biotech).

## 1.8 Transfezione Transitoria

E' stato prodotto uno short interfering RNA selettivo per l' isoforma endoteliale della NOS bovina (beNOS-siRNA) dalla sequenza localizzata 1824 coppie di basi dopo il codone di inizio della trascrizione (GAGTTACAAGATCCGCTTC; EUROGENTEC S.A., Belgium) (31).

Le bAEC sono state coltivate ad una densità di  $1 \times 10^6$  per piastra in dischi multipli. Ventiquattro ore dopo, il mezzo è stato sostituito con un Dulbecco modificato Eagle/Ham F-12 senza supplemento di Siero Bovino Fetale. Le transfezioni sono state eseguite usando LipofectAMINA 10 µl/ml (Life Technologies) in 1 ml/piastra di DMEM. Quattro ore dopo la transfezione, il mezzo

di coltura è stato sostituito con un mezzo di coltura contenente siero. Quarantotto ore dopo la transfezione, le bAEC sono state poste in quiescenza per la notte e stimolate come descritto.

## 1.9 Preparazione degli Estratti Nucleari

Le proteine nucleari sono state estratte come descritto (32). Le cellule sono state lavate e staccate dalle piastre con un buffer salino di Tris. Dopo la centrifugazione, le cellule sono state risospese in 200  $\mu$ l di buffer A freddo (HEPES 10 mM, pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1 mM, ditiotreitolo 1 mM, AEBSF 0.5 mM) e lasciate in ghiaccio per 15 minuti. Le cellule sono state lisate mediante l'aggiunta di 12.5  $\mu$ l di NONIDET P-40 10% e vigorosa agitazione per 10 secondi, seguito da centrifugazione (12,000 rpm) per 30 secondi. Il sopranatante è stato recuperato come frazione citosolica. Il pellet è stato risospeso in 50  $\mu$ l di buffer B freddo (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1 mM, ditiotreitolo 1 mM, AEBSF 0.5 mM) e posto su rocker per 15 min. I campioni sono stati centrifugati a 14,000 rpm per 5 minuti. Il sopranatante è stato recuperato come frazione nucleare. L'intera procedura è stata condotta a 4°C. I campioni sono stati conservati a -85 °C.

## 1.10 Analisi Statistica

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  DS. Le analisi statistiche sono state effettuate usando la analisi della varianza. Il confronto post-test è stato ottenuto con il metodo di Tukey. La significatività accettata è stata quella con un valore di  $p < 0,05$ .

## Capitolo 2

### Risultati

#### 2.1 Il PC Protegge le Cellule Endoteliali dalla Morte Cellulare Indotta dall'Ipossia

Abbiamo condotto un esperimento pilota per valutare la possibilità di riprodurre un modello in vitro di PC in cellule endoteliali. A tale scopo, abbiamo analizzato il tasso di mortalità cellulare conseguente a differenti periodi di ipossia. L'ipossia ha indotto un aumento tempo-dipendente della morte cellulare sia per apoptosi che per necrosi (Figura 1 A). In particolare, dopo 1, 6, 12 e 24 ore di ipossia, il tasso di morte cellulare (apoptosi + necrosi) è risultato del 28%, 58%, 81% e 94%, rispettivamente (Tabella I). L'apoptosi è stata rilevata principalmente dopo brevi periodi di ipossia, mentre periodi prolungati di ipossia hanno indotto sia apoptosi che necrosi. L'apoptosi è stata confermata dall'analisi del clivaggio di caspasi-3, che gioca un ruolo chiave nella regolazione della cascata di morte cellulare programmata (33). (Figura 1 B).

Dato che 12 ore hanno rappresentato il punto al quale l'ipossia ha indotto circa il 60% di morte cellulare, principalmente dovuta ad apoptosi, abbiamo testato se brevi periodi di ipossia fossero capaci di ridurre la morte cellulare indotta dall'esposizione a 12 ore di ipossia. Tre cicli ripetuti di 15 minuti di ipossia seguiti da 15 minuti di riossigenazione (Figura 2 A) hanno ridotto la morte cellulare

indotta da 12 ore di ipossia; principalmente responsabile di tale fenomeno è stata una riduzione del tasso apoptotico (Figura 2 B). L'effetto citoprotettivo osservato ha mostrato un trend bifasico, con le finestre precoce e tardiva rilevabili immediatamente e 24 ore dopo che il PC è stato applicato (Tabella II). In particolare, la morte cellulare per apoptosi si è ridotta nelle cellule preconditionate precocemente e tardivamente del  $25\pm 5\%$  e  $28\pm 4\%$ , rispetto al  $48\pm 5\%$  nelle cellule non preconditionate. L'apoptosi è stata valutata anche analizzando il clivaggio della caspasi-3. Tale analisi ha confermato il trend bifasico della citoprotezione indotta da PC (Figura 2 C), con le finestre precoce e tardiva caratterizzate dalla riduzione del clivaggio di caspasi-3 indotto dall'ipossia.

Tali risultati indicano che, in cellule endoteliali, brevi periodi ripetuti di ipossia seguiti da riossigenazione riducono la morte cellulare per apoptosi indotta dall'ipossia con due finestre di protezione (precoce e tardiva), dimostrando che le nostre condizioni sperimentali riproducono il fenomeno del PC.

## 2.2 Il PC Induce Sintesi di NO in Cellule Endoteliali

Dal momento che NO è ritenuto un mediatore chiave del PC, abbiamo misurato la produzione di NO mediante l'accumulo di citrullina ed attraverso il metodo colorimetrico di GRIESS. Il PC ha indotto una produzione di NO dipendente da eNOS con due picchi, riscontrabili immediatamente e a 24 ore dal PC e caratterizzati da un aumento di 1.5 e 1.9 volte nell'accumulo di citrullina, rispettivamente (Figura 3 A). La valutazione della produzione di NO indotta dal PC attraverso la reazione di GRIESS ha mostrato lo stesso trend bifasico (Figura 3 B). L'analisi degli enzimi responsabili della produzione di NO ha mostrato che entrambi eNOS ed iNOS sono coinvolte nella sintesi di NO indotta dal PC. In particolare, la fosforilazione/attivazione di eNOS in serina1177 (ser1177) e l'espressione di iNOS sono state rilevate immediatamente e 24 ore dopo il PC (Figura 3 C e 3 D).



Tali risultati indicano che, in cellule endoteliali, il PC induce produzione di NO, attivazione di eNOS ed espressione di iNOS.

### 2.3 PKA e PI3K Mediano la Sintesi di NO durante il Precondizionamento Tardivo

Dal momento che il PC tardivo (LPC) conferisce una finestra di protezione cellulare più lunga, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui pathway molecolari che regolano la produzione di NO indotta dal LPC. Inoltre, in altri modelli sperimentali è stato dimostrato che diversi meccanismi sono coinvolti nella produzione di NO durante LPC, inclusi l'attivazione di PKA (34), di PI3K (22) e di PKC (35) e la produzione di ROS (36). Allo scopo di studiare quali meccanismi molecolari siano coinvolti nella produzione di NO indotta da LPC in cellule endoteliali, abbiamo misurato la produzione di NO indotta da LPC in presenza di inibitori di PKA, PI3K, PKC, ed iNOS, di inibizione aspecifica di NOS e di un antiossidante (NAC).

L'inibizione selettiva di iNOS da parte di 1400W (20 $\mu$ M, 15 minuti di pretrattamento) ha ridotto significativamente la produzione di NO indotta da LPC, mentre la somministrazione dell'inibitore aspecifico della sintesi di NO (L-NAME; 1 mM, 15 minuti di pretrattamento), da solo o in combinazione con 1400W, l'ha abrogata del tutto.

Anche il pretrattamento con H89 (inibitore di PKA; 10  $\mu$ M, 30 minuti di pretrattamento) e LY294002 (inibitore di PI3K; 30  $\mu$ M, 30 minuti di pretrattamento) ha abrogato la produzione di NO indotta da PC; l'esposizione a NAC (10 mM, 30 minuti di pretrattamento) l'ha ridotta, mentre l'inibizione di PKC mediante Go6983 (1  $\mu$ M, 60 minuti di pretrattamento) non ha prodotto alcuna modifica nella sintesi di NO (Figura 4 A e 4 B). Allo stesso tempo, la fosforilazione/attivazione di eNOS indotta da LPC è stata inibita da H89, LY294002 e NAC (Figura 5 A). Inoltre, l'espressione di iNOS indotta da LPC è stata inibita dal pretrattamento con H89 e

NAC, ed è stata significativamente ridotta da LY294002 (Figura 5 B).

Successivamente, dal momento che NAC inibisce la sintesi di NO indotta da LPC, abbiamo testato la produzione di ROS indotta da PC. La genesi di ROS è stata valutata mediante quantizzazione delle proteine nitrosilate (37). LPC ha indotto un aumento nel contenuto di proteine nitrosilate (3.2 volte vs controllo), che è stato significativamente minore di quelli riscontrati a 1, 6 e 12 ore dall'applicazione del PC (6.1 volte vs controllo; Figura 4 C). Il pretrattamento delle bAEC preconditionate tardivamente con NAC ha abrogato la formazione di proteine nitrosilate (Figura 4 D).

Nel complesso, tali dati indicano che PKA, PI3K e i ROS giocano un ruolo chiave nella produzione di NO durante la fase tardiva del PC.

## 2.4 Il PC Attiva PKA ed Akt

Avendo riscontrato che la produzione di NO indotta da LPC è mediata da pathway dipendenti sia da PKA che da PI3K, abbiamo esplorato se LPC sia in grado di attivare tali chinasi.

L'attivazione di PKA è stata valutata mediante fosforilazione del kemptide (Kp), substrato sintetico di PKA. Sia il PC precoce che quello tardivo hanno indotto la fosforilazione di Kp. In particolare, la fosforilazione di Kp è aumentata di 3.8 volte durante LPC, rispetto al controllo (Figura 6).

Abbiamo poi studiato Akt, la serin/treonin chinasi a valle di PI3K, che promuove la sintesi di NO attraverso l'attivazione di eNOS (22). LPC ha prodotto la fosforilazione/attivazione di Akt in treonina308 (thr308; 3.2 volte vs controllo,  $p < 0,001$ ) (Figura 7 A) e serina473 (ser473; 5.8 volte vs controllo,  $p < 0,001$ ) (Figura 7 B).

Per confermare che l'attivazione di PKA ed Akt indotta da PC rende conto della produzione di NO attraverso la fosforilazione/attivazione di eNOS, abbiamo valutato se vi è un'interazione fisica tra PKA, Akt e fosfo-eNOS(ser1177) durante

il PC. A tale scopo, i lisati cellulari ottenuti a differenti tempi dall'induzione del PC sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro la subunità catalitica di PKA ed Akt. I prodotti della immunoprecipitazione sono stati blottati con un anticorpo anti-fosfo-eNOS(ser1177). Il PC precoce ha indotto la formazione di un complesso tra PKA e fosfo-eNOS, mentre LPC ha indotto la formazione di un complesso tra Akt e fosfo-eNOS (Figure 7 C e 7 D).

Insieme, questi esperimenti indicano che il PC attiva PKA ed Akt, i quali, a turno, interagiscono fisicamente con eNOS e la fosforilano. In particolare, PKA è principalmente coinvolta nella fosforilazione di eNOS durante la fase precoce del PC, mentre Akt rende conto della fosforilazione di eNOS nella fase tardiva del PC.

## 2.5 PKA e Akt Mediano la Protezione Cellulare durante il PC Tardivo

Successivamente, abbiamo analizzato il meccanismo coinvolto nella protezione cellulare indotta da LPC. A tale scopo, abbiamo valutato la morte cellulare indotta da ipossia ed il clivaggio di caspasi-3 durante LPC in presenza ed assenza di inibitori specifici di PKA, PI3K e PKC, di inibizione aspecifica della produzione di NO e di chelanti dei ROS. La morte cellulare per apoptosi e necrosi indotta dall'ipossia (Figura 8 A e Tabella III), così come il clivaggio di caspasi-3 (Figura 9 A), è stata ridotta da LPC. Questo fenomeno non è stato alterato dall'inibizione di PKC (Go6983) e della produzione di NO (L-NAME+1400W), ma è stato abolito dall'inibizione di PKA (H89), di PI3K (LY294002) e dalla neutralizzazione dei ROS (NAC). Il clivaggio di caspasi-3 indotto dall'ipossia riscontrato durante inibizione di PKA e PI3K è risultato drammaticamente aumentato rispetto a quello indotto dalla sola ipossia. Per stabilire definitivamente il contributo di iNOS ed eNOS nella protezione cellulare indotta da LPC, abbiamo valutato la morte cellulare ed il clivaggio di caspasi-3 durante LPC, in seguito a pretrattamento con 1400W (Figure 8 A e 8 B) e inibizione dell'espressione di eNOS mediante transfezione con beNOS-siRNA (Figure 11 A e 9 B). L'efficacia della transfezione di beNOS-

siRNA nelle bAEC è stata valutata mediante misurazione dell'espressione proteica e dell'attività enzimatica di eNOS. Le cellule transfettate hanno mostrato una riduzione sia nell'espressione di eNOS (Figura 9 B) che nella produzione di nitriti (Figura 10 A). Il trattamento con 1400W e con beNOS-siRNA non ha alterato l'effetto citoprotettivo di LPC, valutato attraverso la misurazione del tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi ed il clivaggio di caspasi-3.

Infine, per esplorare se PKA e PI3K siano necessarie per la protezione cellulare indotta da LPC, abbiamo valutato l'effetto di LPC sulla morte cellulare indotta dall'ipossia e sul clivaggio di caspasi-3 in cellule con espressione transitoria di mutanti dominanti negativi di PKA (DN PKA) ed Akt (DN Akt), che è la serin/treonin chinasi regolatrice di molti effetti biologici dipendenti da PI3K, inclusa la sopravvivenza cellulare (38). La transfezione sia del plasmide codificante per il DN PKA che di quello per il DN Akt, ha inibito la protezione cellulare conferita dal LPC. Infatti, entrambi i plasmidi hanno abolito la protezione contro la morte cellulare per apoptosi e per necrosi indotta dall'ipossia (Figura 11 A e Tabella IV) e la riduzione del clivaggio di caspasi-3 indotto da LPC (Figure 9 C e 9 D). L'efficacia della transfezione di DN PKA e DN Akt nelle bAEC è stata valutata mediante immunoblotting. L'espressione di HA è stata riscontrata soltanto nelle cellule transfettate con DN PKA (Figura 11 B) e DNA Akt (Figura 11 C). Similmente, l'espressione di PKA ed Akt è risultata aumentata nelle cellule transfettate con DN PKA e DN Akt, rispetto a quelle transfettate con pcDNA3.

Infine, per stabilire un possibile meccanismo che renda conto della protezione cellulare indotta da LPC, abbiamo saggiato la fosforilazione di Bad nelle cellule preconditionate tardivamente. Bad agisce come una molecola anti-apoptotica quando fosforilata in ser112 e ser136 (39). Il LPC ha indotto la fosforilazione in entrambi i siti: questi ultimi costituiscono i "consensus-sites" per la fosforilazione da parte di PKA ed Akt, rispettivamente (Figura 8 C).

Nell'insieme questi dati indicano che, in cellule endoteliali, l'effetto citoprotettivo

indotto da LPC richiede un pathway dipendente da PKA e PI3K/Akt.

## 2.6 Il Donatore di NO (NOC-12) non Conferisce Protezione dall' Apoptosi indotta da Ipossia in bAEC

Per escludere definitivamente l'ipotesi che, nel nostro modello sperimentale, NO giochi un ruolo nella protezione cellulare mediata da LPC, indipendentemente dall'attività di eNOS ed iNOS, abbiamo valutato l'effetto citoprotettivo di un donatore a lungo termine di NO (NOC-12) in cellule preconditionate esposte ad ipossia. Come atteso, il PC precoce e tardivo ha ridotto significativamente il clivaggio di caspasi-3 indotto dall'ipossia. L'effetto citoprotettivo è stato parzialmente perso dopo 1 ora ed è risultato indeterminabile dopo 48 ore dall'applicazione del PC. Rispetto al controllo, NOC-12 ha aumentato l'accumulo di nitriti nel mezzo di coltura di 6.4 volte, ma non ha ridotto il clivaggio di caspasi-3 osservato in cellule esposte a 12 ore di ipossia dopo 1 e 48 ore dall'applicazione dello stimolo preconditionante (Figura 12).

Tali risultati indicano che il rilascio di NO da parte di donatori di NO non induce protezione cellulare in questo modello sperimentale di PC.

## 2.7 PKA e PI3K Mediano l' Attivazione di Akt Indotta dal PC

Dal momento che entrambi i pathway dipendenti da PKA e da PI3K/Akt sono coinvolti nell'effetto citoprotettivo indotto da LPC, abbiamo valutato l'esistenza di un cross-talk tra queste due vie. Innanzitutto, abbiamo analizzato il meccanismo dell'attivazione di Akt indotta da LPC. A tale scopo, la fosforilazione di Akt indotta da LPC è stata valutata in presenza di H89, LY294002, Go6983, L-NAME, 1400W e NAC. La fosforilazione di Akt indotta da LPC, in thr308 e ser473, è stata abrogata dal pretrattamento con H89 e NAC, ma solo ridotta da LY294002 (Figure 13 A e 13 B), suggerendo che PKA gioca un ruolo critico nell'attivazione di Akt

durante LPC. Quindi, ci siamo chiesti se PKA ed Akt interagiscano fisicamente in corso di PC. A tale scopo, i lisati provenienti dalle cellule sottoposte a PC sono stati immunoprecipitati con anticorpi diretti contro la subunità catalitica di PKA e poi blottati con anticorpo anti-fosfo-Akt (thr308/ser473). Sia il PC precoce che quello tardivo hanno indotto la formazione di immunocomplessi tra PKA e fosfo-Akt (Figure 14 A e 14 B). Quindi, per verificare che Akt sia un substrato di PKA durante PC, abbiamo immunoprecipitato i lisati cellulari utilizzando un anticorpo anti-Akt e blottato con un anticorpo che riconosce i substrati fosforilati di PKA. Il PC ha aumentato il riconoscimento di Akt da parte dell'anticorpo anti-substrato fosforilato di PKA, confermando che Akt viene fosforilato da PKA durante PC (Figura 14 C).

Questi risultati indicano che sia PKA che PI3K sono necessarie per l'attivazione di Akt indotta da LPC e che Akt è un substrato di PKA.

## 2.8 PKA è Primariamente Interessata nella Protezione Indotta dal PC

Per confermare l'ipotesi che il pathway coinvolgente PKA, piuttosto che quello dipendente da PI3K, sia primariamente responsabile della protezione cellulare indotta da PC precoce (EPC), abbiamo saggiato la morte cellulare mediante incubazione con AV/PI ed il clivaggio di caspasi-3 nelle bAEC preconditionate precocemente, in presenza ed assenza di inibitori di PKA e PI3K (rispettivamente H89 e LY294002) (Figura 15 A). H89 (10  $\mu$ M, 30 minuti di pretrattamento) ha abrogato la protezione cellulare indotta da EPC, determinando un aumento nella morte cellulare per apoptosi e necrosi (Tabella V), mentre LY294002 (30  $\mu$ M, 30 minuti di pretrattamento) non ha avuto tale effetto. Contemporaneamente, l'inibizione del clivaggio di caspasi-3 indotta da EPC è stato abrogato da H89 (Figura 15 B). Inoltre, la fosforilazione di Akt in ser473 indotta da EPC è stata inibita da H89 e non da LY294002 (Figura 15 C), suggerendo che l'attivazione di Akt durante EPC è un fenomeno PKA-dipendente.

Tali risultati indicano che PKA, piuttosto che PI3K, è coinvolta in modo critico nella induzione della protezione cellulare mediata da EPC.



## Capitolo 3

### Discussione

Il presente studio è stato focalizzato sui meccanismi molecolari alla base dell'effetto citoprotettivo indotto da PC in cellule endoteliali. I nostri dati appaiono in contrasto con precedenti pubblicazioni in cui la produzione di NO è stata ritenuta indispensabile per la citoprotezione indotta da PC. Molti fattori possono spiegare queste discrepanze. Innanzitutto, il nostro modello sperimentale è stato completamente differente da quelli usati da altri autori, dato che noi abbiamo utilizzato colture cellulari, mentre Xuan et al (40) hanno valutato l'estensione di infarto in topi transgenici e Laude et al (41) hanno analizzato la vasodilatazione coronarica in cuori di ratto preconditionati. Inoltre, noi abbiamo valutato esclusivamente i meccanismi molecolari coinvolti nella sopravvivenza cellulare, mentre tali autori hanno investigato differenti aspetti funzionali del PC. Questi dati contrastanti sottolineano la necessità di stabilire definitivamente i meccanismi alla base delle diverse componenti biologiche del PC.

In questo studio, abbiamo rilevato che il PC induce l'attivazione di Akt, che a sua volta è responsabile della protezione cellulare indotta dal PC stesso. Questo meccanismo permette la speculazione che la produzione di NO indotta da PC, più che essere un mediatore di sopravvivenza cellulare, sia un epifenomeno dell'attivazione di Akt. Comunque, non escludiamo la possibilità che in un sistema



biologico più complesso, come modelli sperimentali in vivo, NO giochi un ruolo critico nella citoprotezione indotta da PC. In aggiunta, bisogna notare che il nostro setting sperimentale ha escluso il contributo dell'infiammazione alla risposta endoteliale. Ciò potrebbe spiegare l'assenza di effetto protettivo di NO nella protezione endoteliale indotta da PC.

I nostri dati mostrano che, in cellule endoteliali, l'effetto citoprotettivo indotto da PC è mediato dall'attivazione di Akt dipendente da PKA e PI3K. Un gran numero di dati indica che l'attivazione PI3K-dipendente di Akt, in risposta a diversi stimoli, è responsabile di un effetto citoprotettivo in differenti tipi cellulari. D'altro canto, è stato dimostrato che l'attivazione di PKA, più che generare un segnale di sopravvivenza, promuove l'apoptosi in diversi tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali (42). Akt può essere attivato da meccanismi differenti, inclusi pathway wortmannina-sensibili ed -insensibili (43), ed è stato riportato che Akt può essere attivato da un meccanismo PKA-dipendente in cellule endoteliali (44). Nel presente studio, abbiamo riscontrato che l'attivazione di Akt durante LPC richiede PKA, che PKA forma un complesso fisico con Akt e, soprattutto, che Akt agisce come un substrato di PKA. Ciò suggerisce che, in cellule endoteliali, l'effetto citoprotettivo indotto da PC è mediato dal cross-talk tra PKA ed Akt, che interagiscono direttamente. Quindi, PKA non agisce esclusivamente come una chinasi pro-apoptotica, ma può anche svolgere azioni citoprotettive.

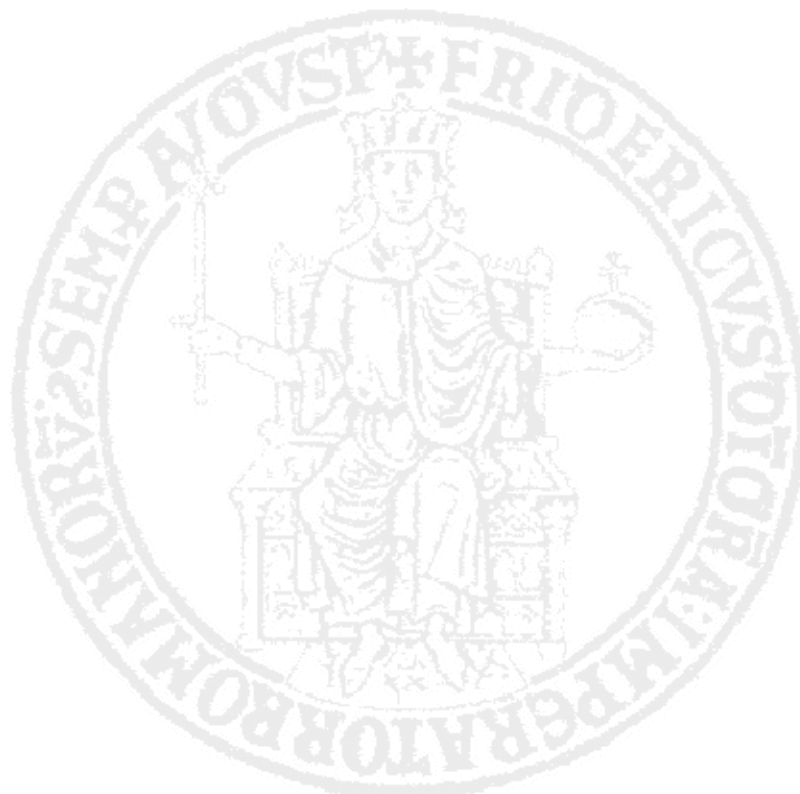
Abbiamo, poi, scoperto che la fosforilazione di Akt indotta da LPC viene ridotta, ma non completamente inibita, dal pretrattamento con LY294002, suggerendo che, in cellule endoteliali, PI3K gioca un ruolo parziale nella protezione cellulare indotta da PC. E' ragionevole speculare che la differente rilevanza di PKA e PI3K nel promuovere la protezione cellulare dipenda dalle caratteristiche degli stimoli di sopravvivenza. Ad esempio, i meccanismi PI3K-dipendenti giocano un ruolo chiave nella citoprotezione indotta da insulina (27) o da IGF-1 (45). D'altra parte, meccanismi PKA-dipendenti spiegano alcune risposte biologiche protettive

evocate dall' esposizione ad uno stimolo ipossico (46).

Abbiamo, inoltre, notato che NAC abroga la protezione indotta da LPC in bAEC, suggerendo un importante ruolo dei ROS in tale fenomeno. Valutando la sintesi di ROS in corso di PC mediante analisi del contenuto di proteine nitrosilate, abbiamo scoperto che essa è massima tra il PC precoce e tardivo, cioè quando l'effetto protettivo è abolito. Questi dati sottolineano la necessità di chiarire il ruolo della produzione dei ROS. In particolare, basse dosi di ROS, riducendo i residui tiolici nei recettori transmembrana, inducono l'attivazione di pathway protettivi a valle, mentre alte dosi di ROS, alterando la struttura terziaria di tali recettori, inibiscono l'attivazione dei meccanismi protettivi (8). Infine, ad alte concentrazioni, i ROS reagiscono con NO, inducendo la generazione di perossinitriti, che disaccoppiano la funzione eNOS (5). Abbiamo anche riscontrato che l'espressione di beNOS-siRNA ha ridotto in maniera significativa la produzione di nitriti indotta da LPC. Questo dato può essere spiegato dall'evidenza che la traslocazione nucleare di eNOS è richiesta per l'espressione di iNOS (47). In aggiunta, abbiamo ricercato se questo meccanismo trascrizionale possa anche giustificare l'espressione di iNOS indotta da LPC in bAEC. A tale scopo, inizialmente abbiamo valutato i cambiamenti nella localizzazione sub-cellulare di eNOS nelle bAEC in corso di PC. Sono state preparate le frazioni nucleare e citoplasmatica e sono state eseguite le analisi di immunoblot. In condizioni di controllo, LPC ha aumentato l'espressione nucleare di eNOS (Figura 10 B). Contemporaneamente, le analisi di immunoblot della frazione citosolica hanno mostrato una riduzione progressiva di eNOS dopo l'applicazione dello stimolo preconditionante (Figura 10 C). Successivamente, abbiamo esaminato se la soppressione della sintesi di eNOS mediante transfezione di beNOS-siRNA alteri l'espressione di iNOS indotta da LPC. A tale scopo, le bAEC sono state transfettate con beNOS-siRNA (20 µg), e poi sottoposte a LPC. La transfezione di beNOS-siRNA ha esitato in una inibizione dell'espressione di iNOS normalmente indotta dal LPC (Figura 10 D).

Questi dati indicano che, nelle bAEC, il LPC induce la traslocazione nucleare di eNOS e che l'espressione di iNOS indotta da LPC richiede un pathway trascrizionale eNOS-dipendente.

In conclusione, i nostri dati indicano che, in cellule endoteliali, l'effetto protettivo di LPC contro l' ipossia è mediato dall'attivazione di Akt, dipendente da PKA e PI3K, e dalla generazione di ROS.



## Bibliografia

---

1. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
2. Li H, Witte K, August M, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(12):2536-44.
3. Hink U, Li H, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88(2):E14-22.
4. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999;99(15):2027-33.
5. Zou MH, Hou XY, Shi CM, Nagata D, Walsh K, Cohen RA. Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2002;277(36):32552-7.
6. Bachetti T, Comini L, Francolini G, et al. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37(2):515-23.
7. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):41-51.

8. Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 2005;38(9):1231-42.
9. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 2002;277(5):3388-96.
10. Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994;89(3):1254-61.
11. Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF, Bolli R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J Clin Invest* 1996;97(2):562-76.
12. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 1997;96(5):1641-6.
13. Ates E, Genc E, Erkasap N, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002;74(9):1247-51.
14. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, et al. Importance of brain-gut axis in the gastroprotection induced by gastric and remote preconditioning. *J Physiol Pharmacol* 2004;55(1 Pt 2):165-77.
15. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2006;93(6):762-8.
16. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 2001;103(12):1624-30.
17. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol* 1998;123(3):413-

20.

18. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Participation of prostaglandin E2 in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45(2):418-27.

19. Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Preconditioning of bovine endothelial cells. The protective effect is mediated by an adenosine A2 receptor through a protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996;78(1):73-81.

20. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 2):H1801-6.

21. Laude K, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Thuillez C. Evidence against a role of inducible nitric oxide synthase in the endothelial protective effects of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 2000;130(7):1547-52.

22. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399(6736):601-5.

23. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 1996;15(23):6541-51.

24. Negoro S, Oh H, Tone E, et al. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation* 2001;103(4):555-61.

25. Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 1998;83(3):334-41.

26. Zhang Y, Park TS, Gidday JM. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(6):H2573-81.

27. Morisco C, Marrone C, Trimarco V, et al. Insulin resistance affects the

cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. *Cardiovasc Res* 2007.

28. Lembo G, Iaccarino G, Vecchione C, et al. Insulin enhances endothelial  $\alpha_2$ -adrenergic vasorelaxation by a pertussis toxin mechanism. *Hypertension* 1997;30(5):1128-34.

29. Scorziello A, Santillo M, Adornetto A, et al. NO-induced neuroprotection in ischemic preconditioning stimulates mitochondrial Mn-SOD activity and expression via Ras/ERK1/2 pathway. *J Neurochem* 2007;103(4):1472-80.

30. Portela P, Howell S, Moreno S, Rossi S. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem* 2002;277(34):30477-87.

31. Kang-Decker N, Cao S, Chatterjee S, et al. Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 3):492-501.

32. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17(15):6419.

33. Condorelli G, Roncarati R, Ross J, Jr., et al. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(17):9977-82.

34. Yayama K, Hiyoshi H, Imazu D, Okamoto H. Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. *Hypertension* 2006;48(5):958-64.

35. Motley ED, Eguchi K, Patterson MM, Palmer PD, Suzuki H, Eguchi S. Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by thrombin. *Hypertension* 2007;49(3):577-83.

36. Thomas SR, Chen K, Keaney JF, Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway.

J Biol Chem 2002;277(8):6017-24.

37. Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, et al. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 2003;92(1):81-7.

38. Ohashi H, Takagi H, Oh H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res* 2004;94(6):785-93.

39. Downward J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1999;1(2):E33-5.

40. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Bolli R. Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon p44/42 mitogen-activated protein kinase pSer-signal transducers and activators of transcription1/3 pathway. *Circulation* 2007;116(5):535-44.

41. Laude K, Favre J, Thuillez C, Richard V. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(6):H2053-60.

42. Kim S, Bakre M, Yin H, Varner JA. Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J Clin Invest* 2002;110(7):933-41.

43. Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG, Denton RM. Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272(12):7713-9.

44. Kou R, Michel T. Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem* 2007;282(45):32719-29.

45. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of



cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000;101(6):660-7.

46. Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG. Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 2006;281(4):2061-70.

47. Gobeil F, Jr., Zhu T, Brault S, et al. Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem* 2006;281(23):16058-67.



**Figure**

---

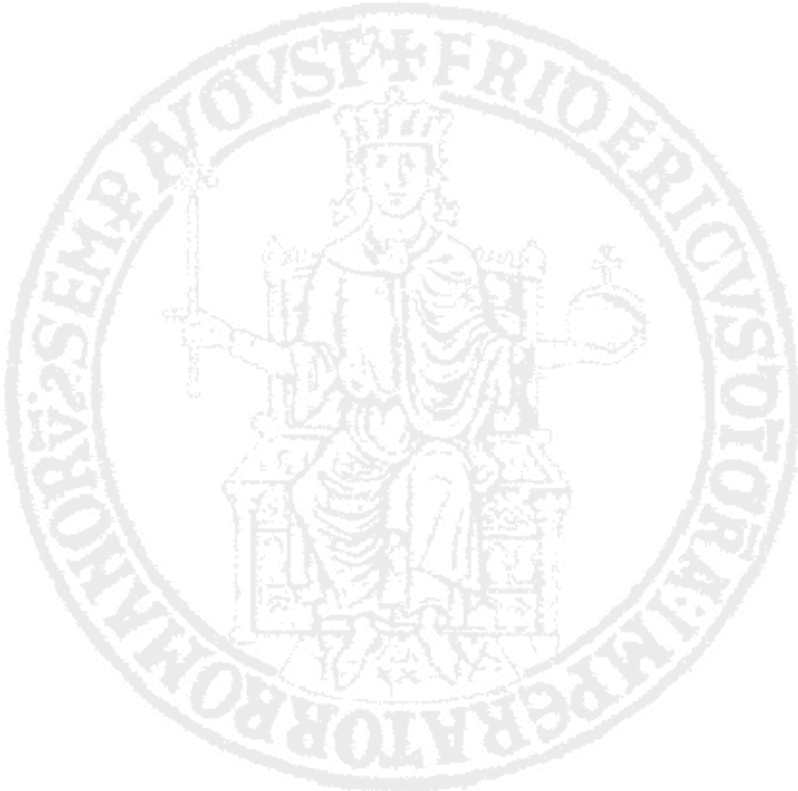
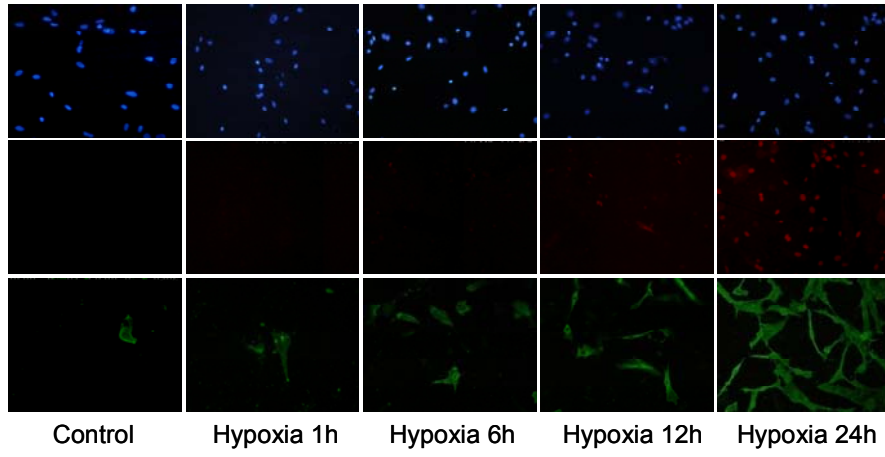


Figura 1

**A**



**B**

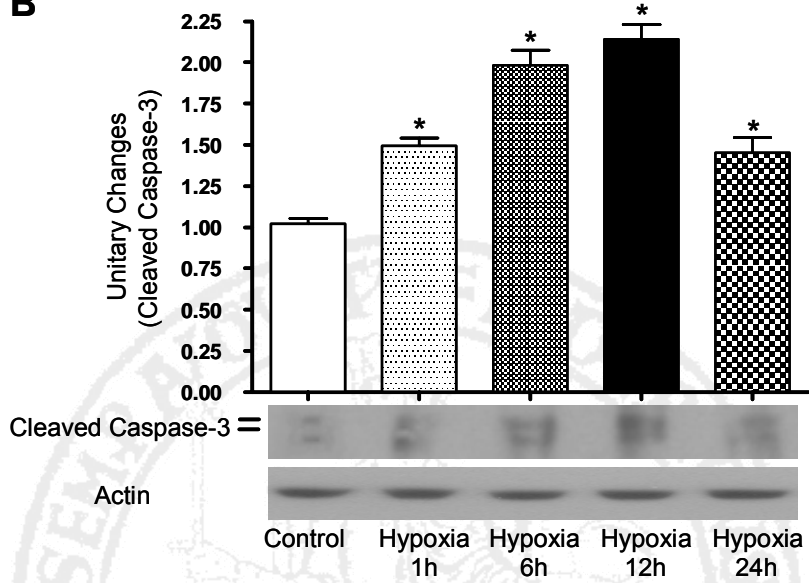


Figura 2

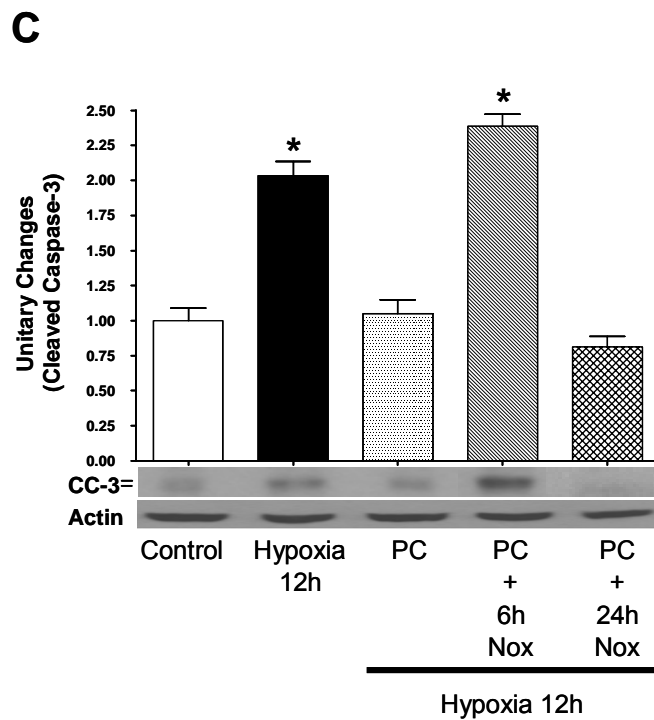
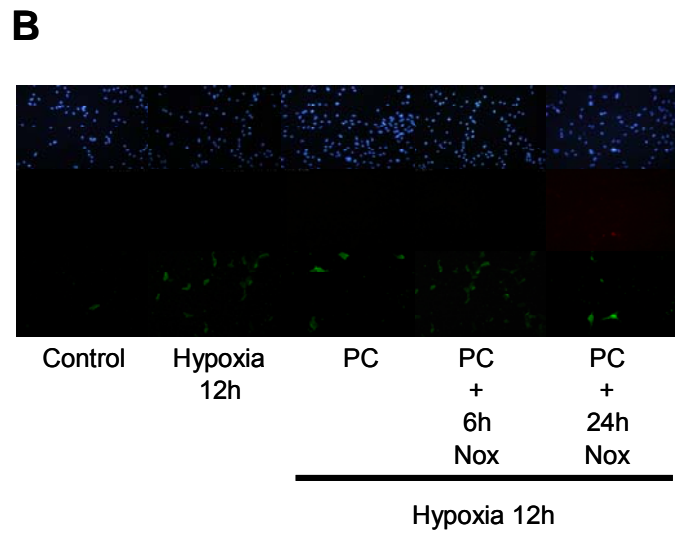
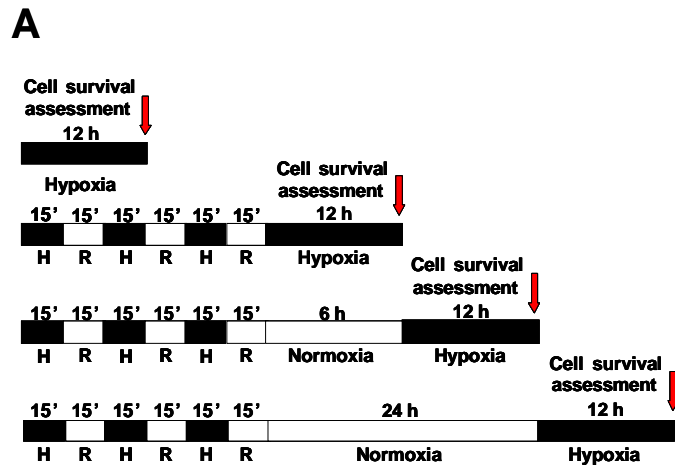


Figura 3

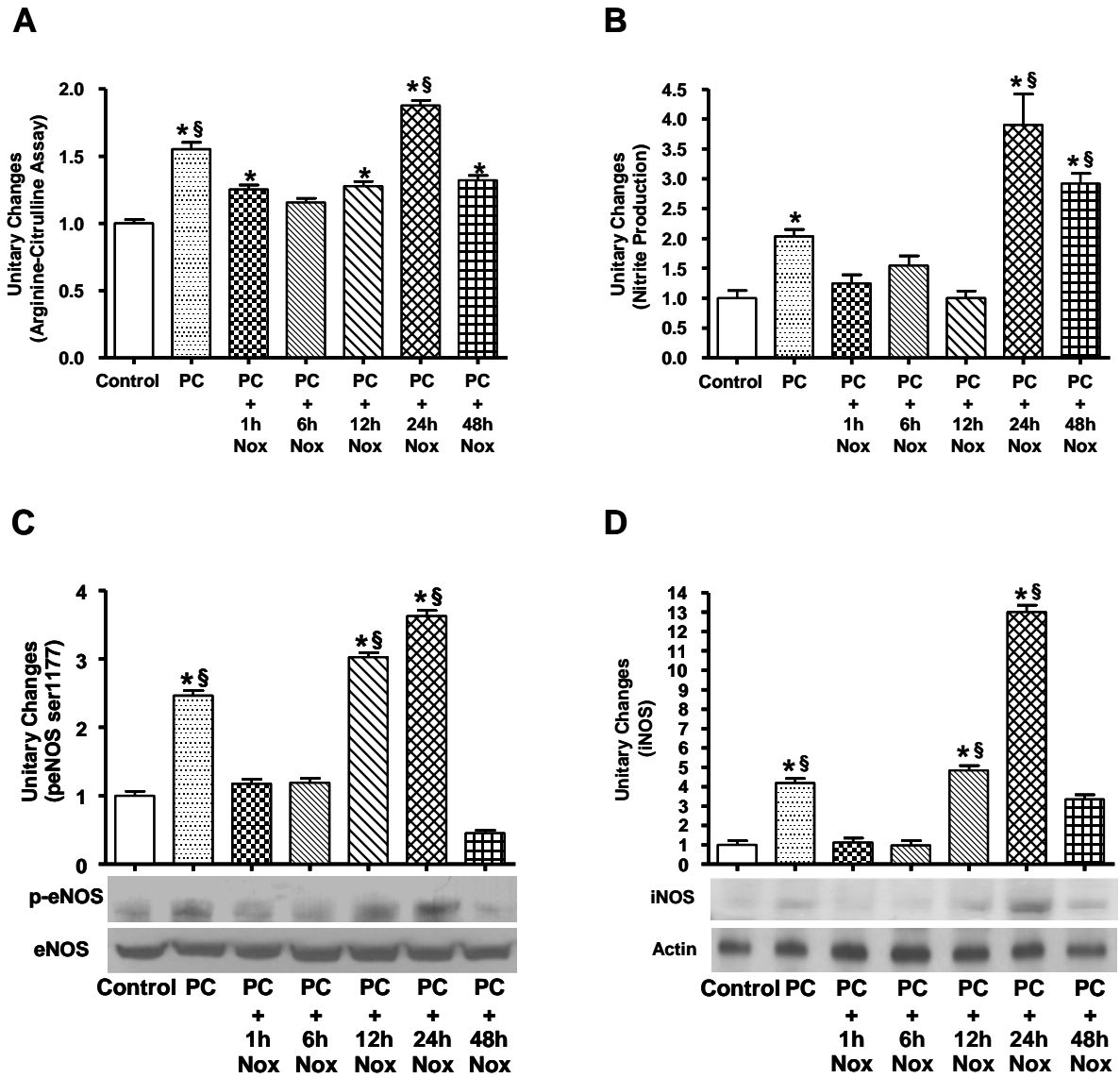


Figura 4

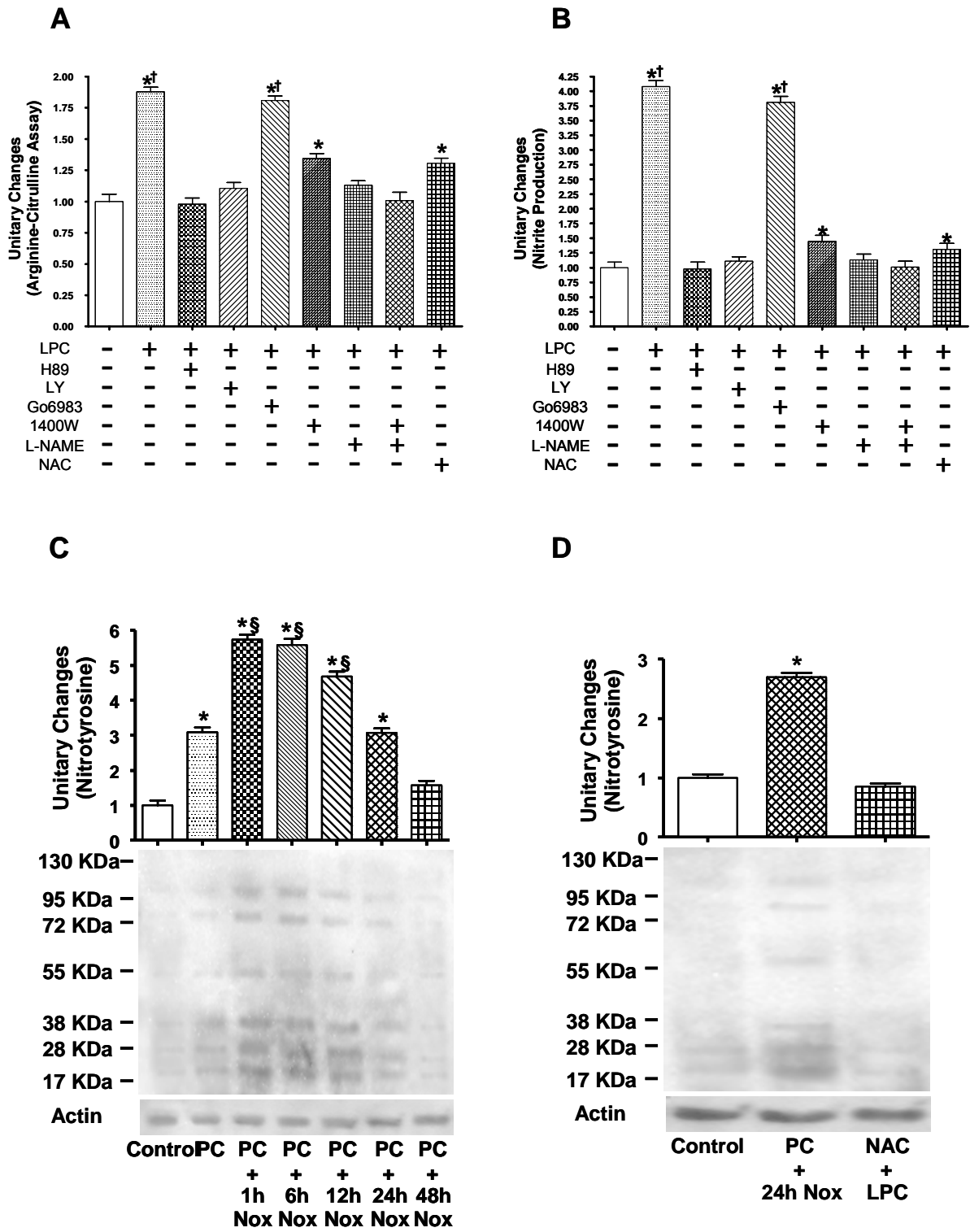


Figura 5

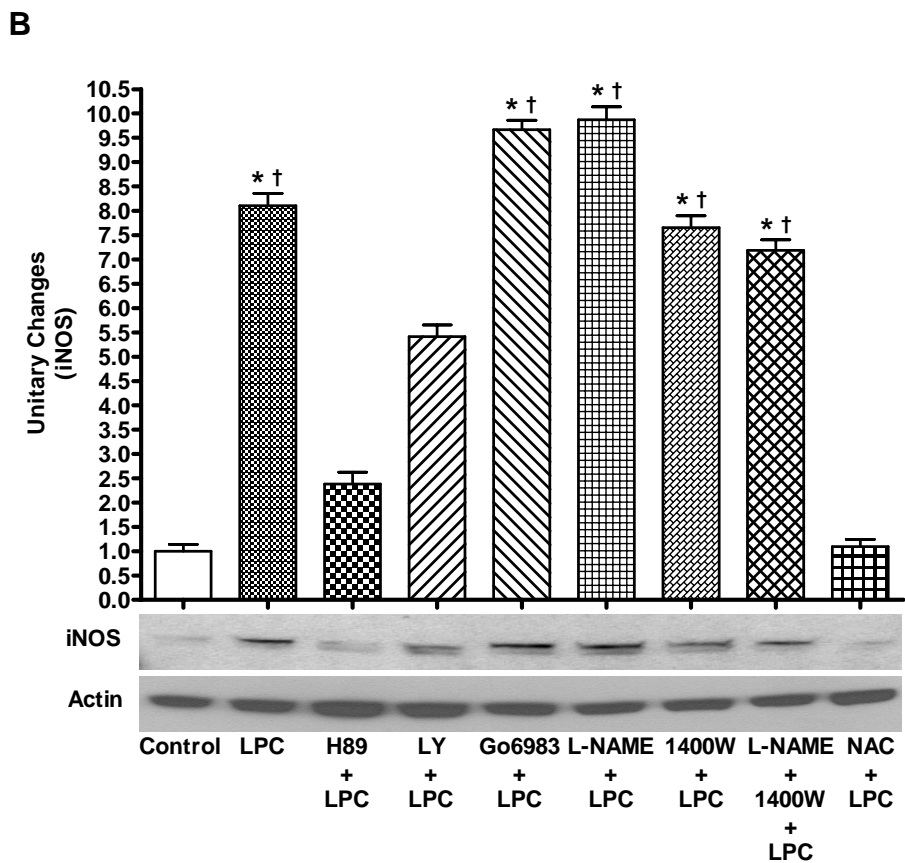
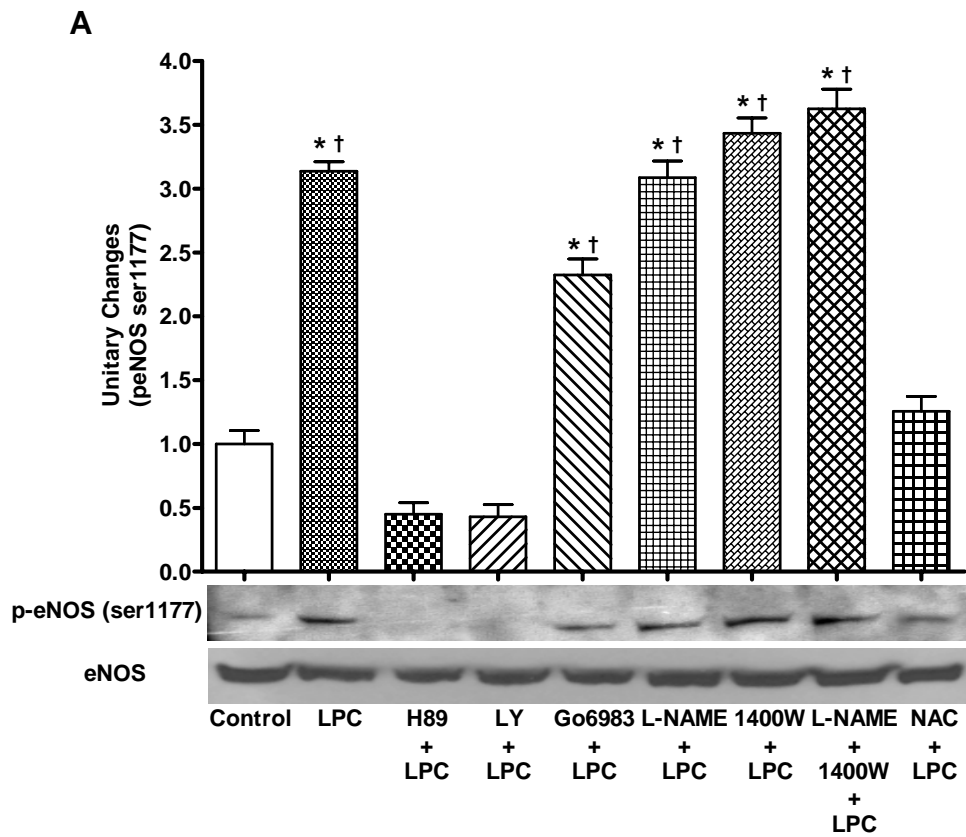


Figura 6

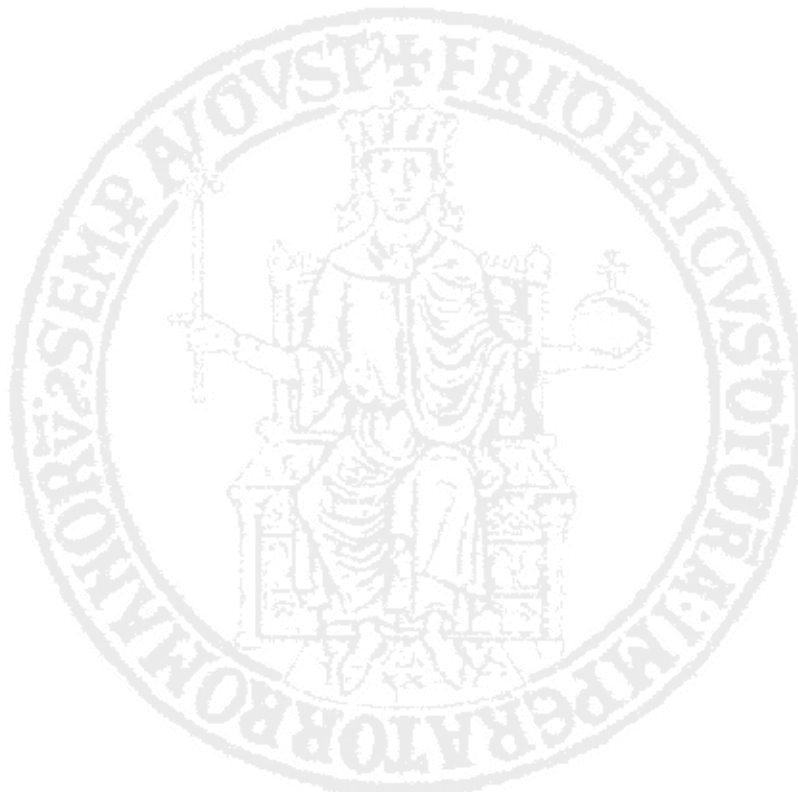
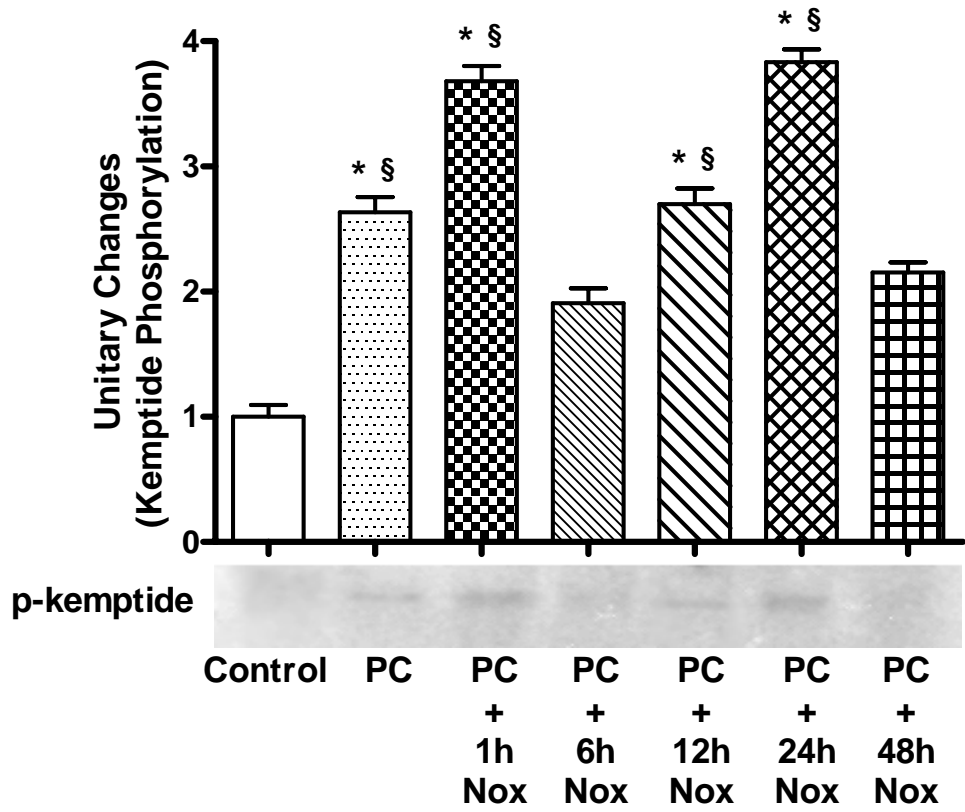




Figura 7

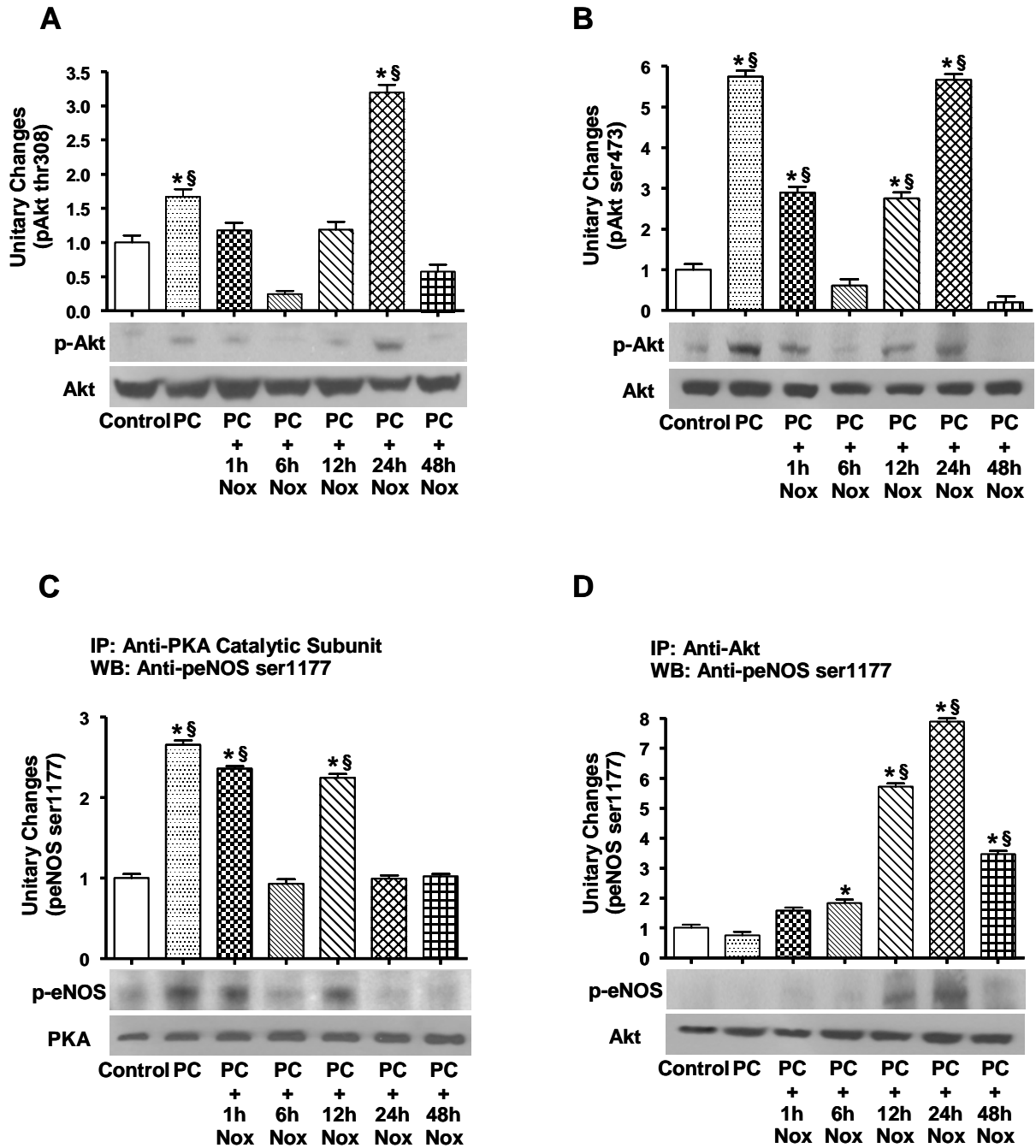
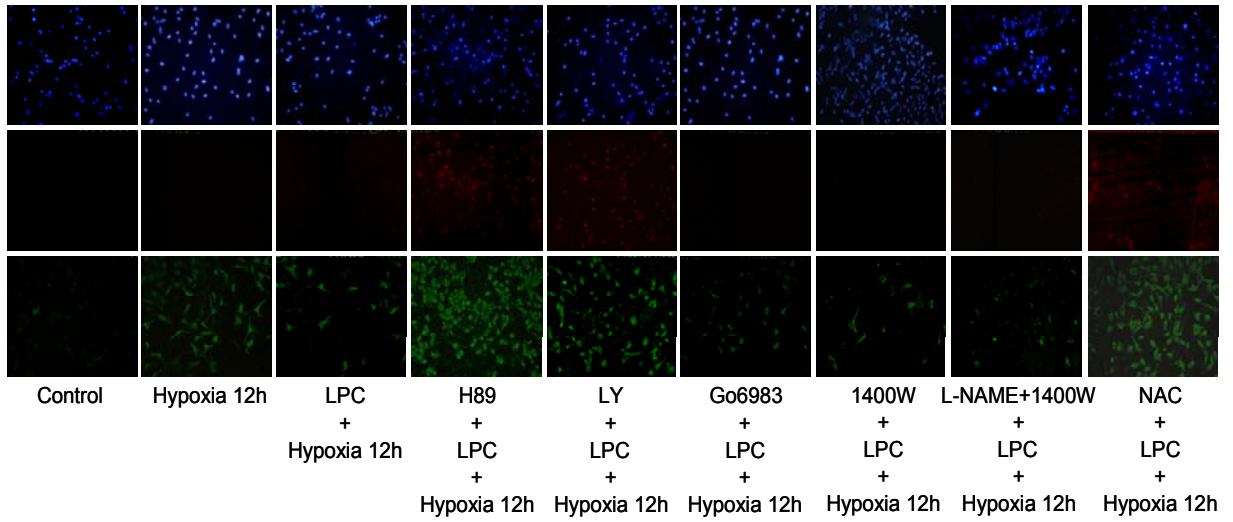
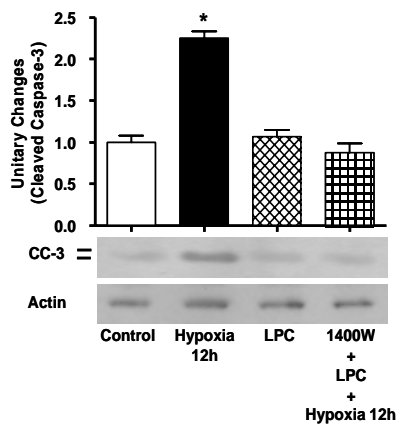


Figura 8

A



B



C

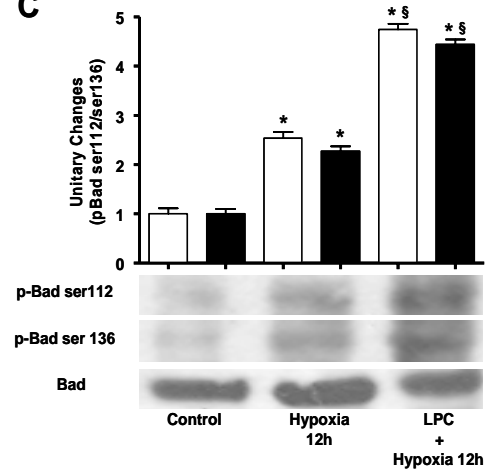
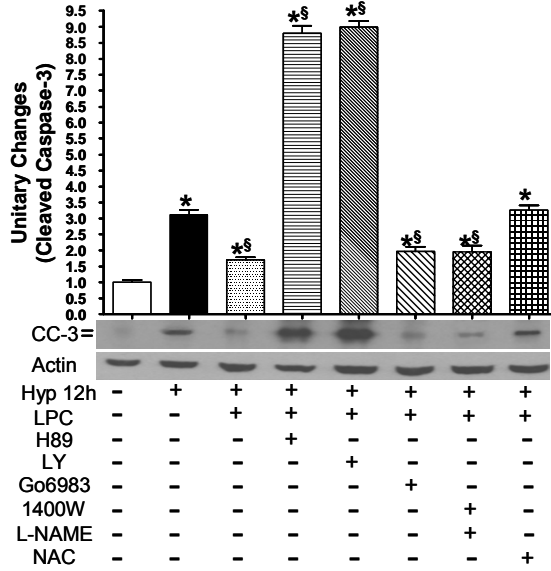
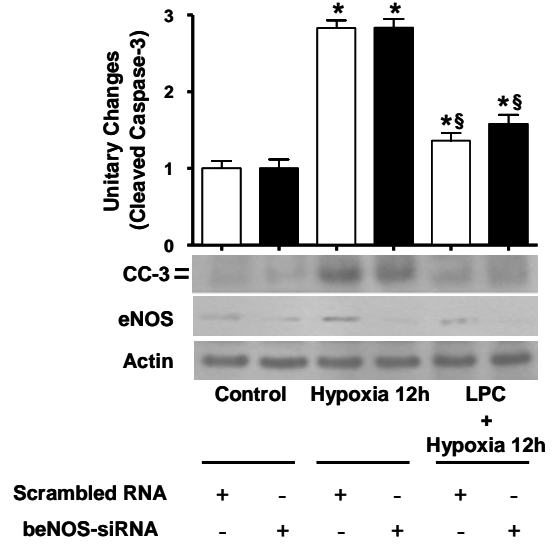


Figura 9

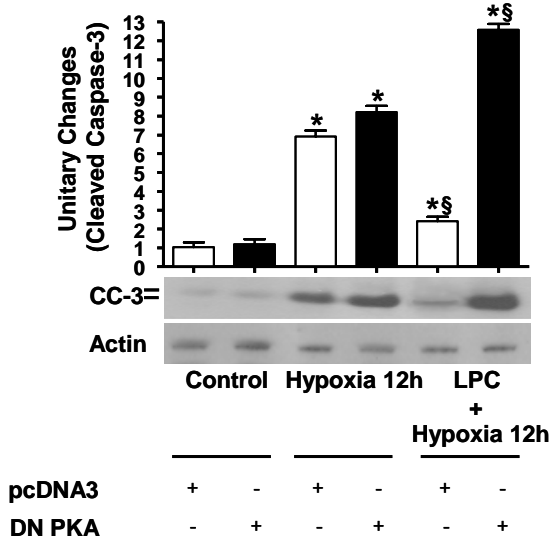
**A**



**B**



**C**



**D**

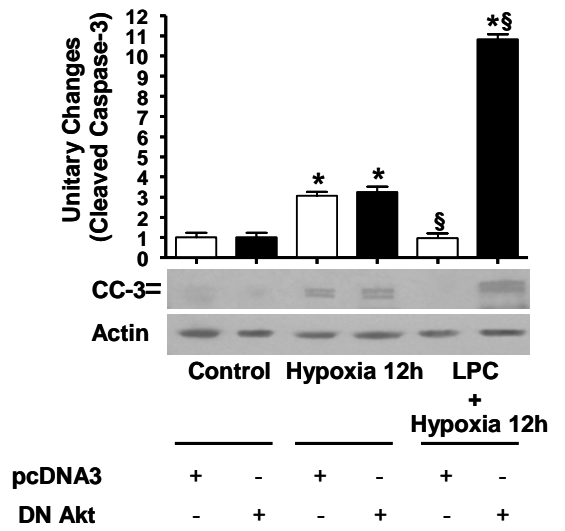
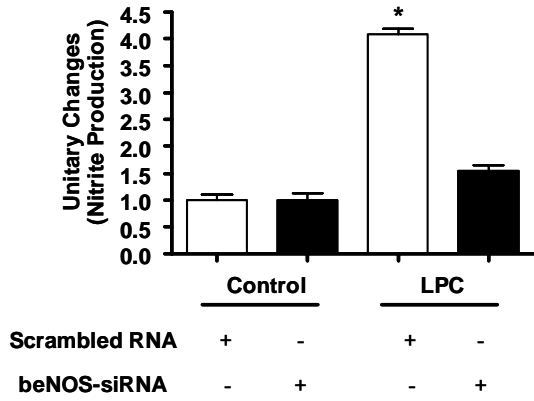
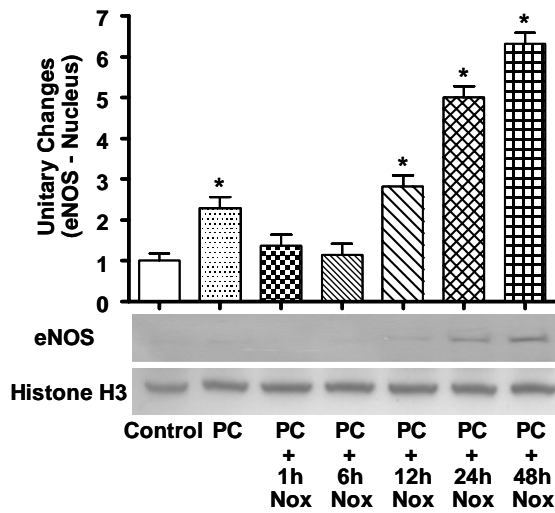


Figura 10

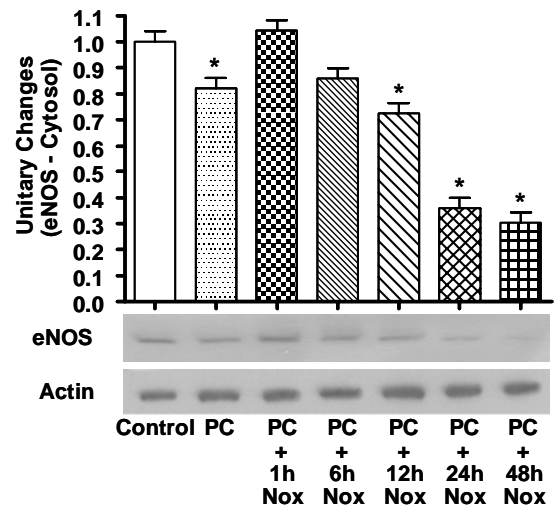
A



B



C



D

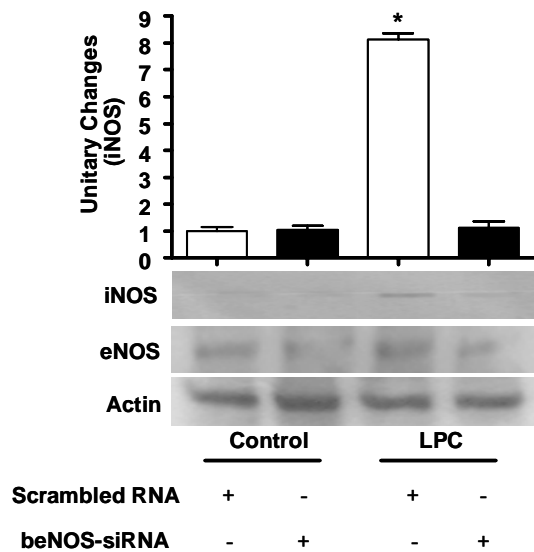
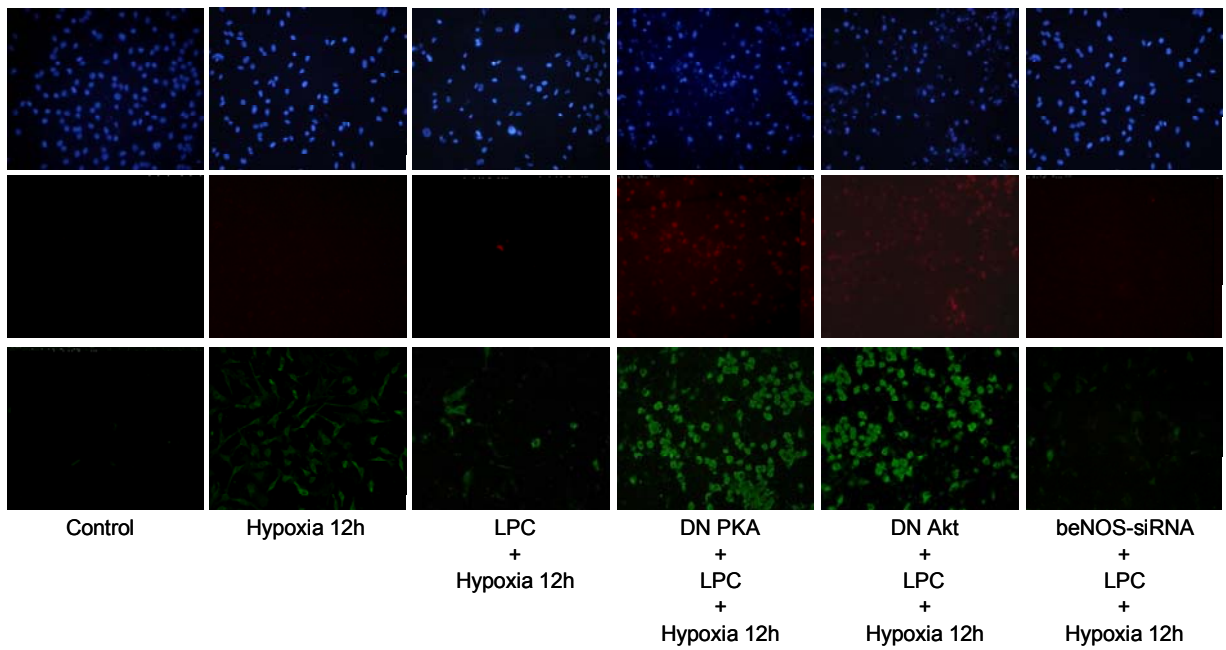
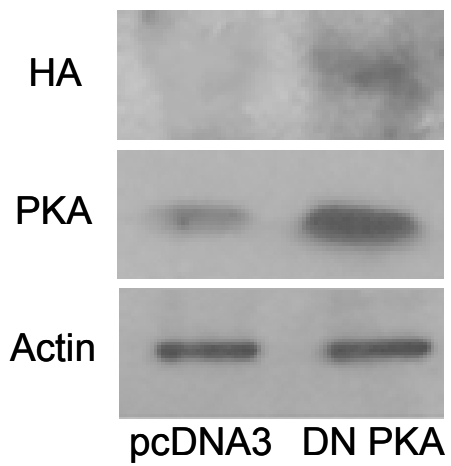


Figura 11

**A**



**B**



**C**

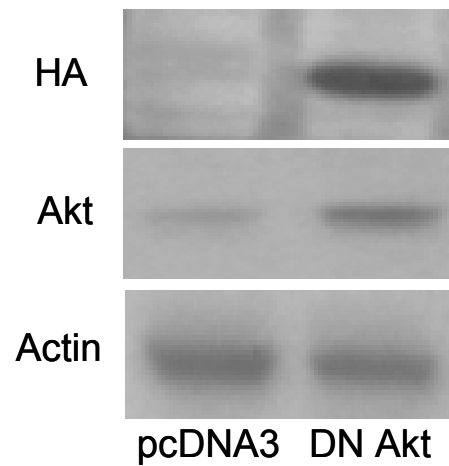


Figura 12

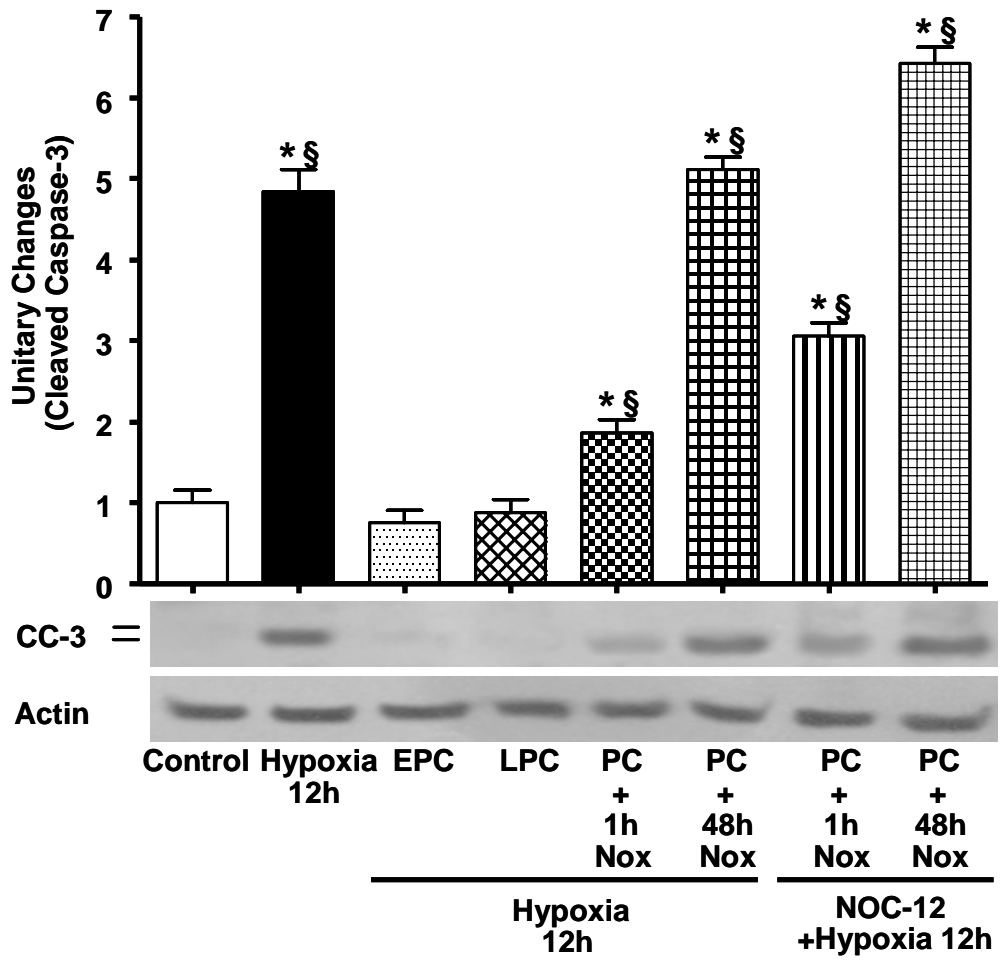


Figura 13

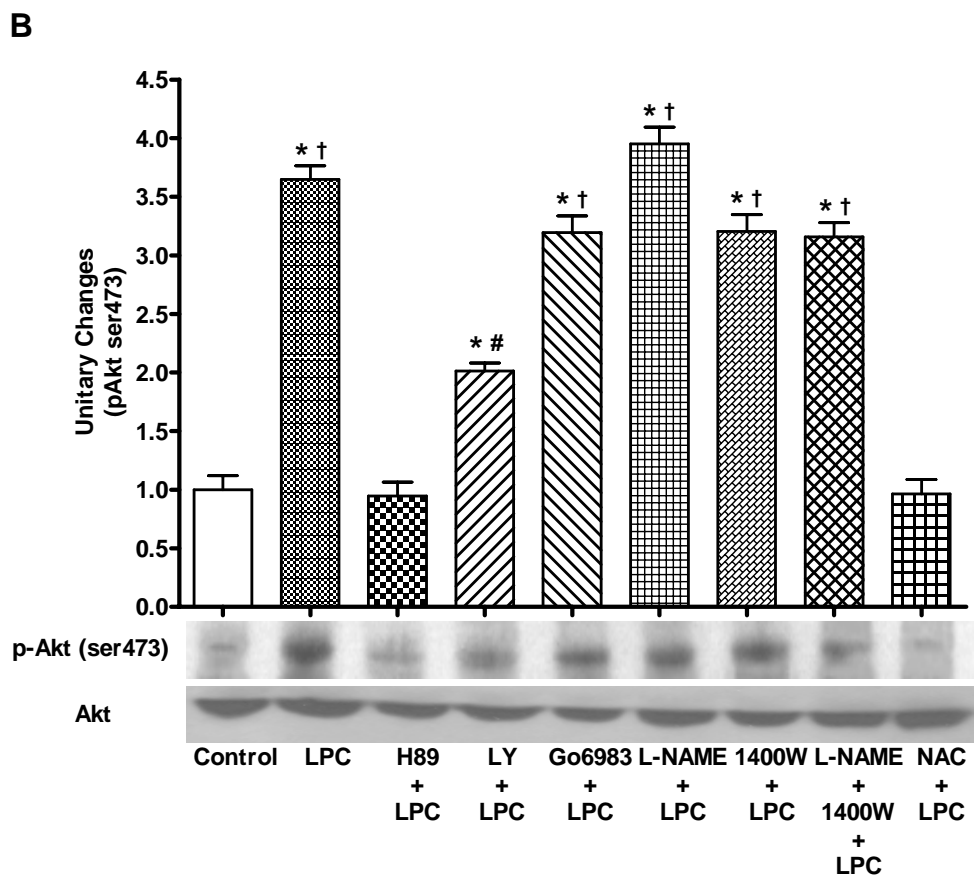
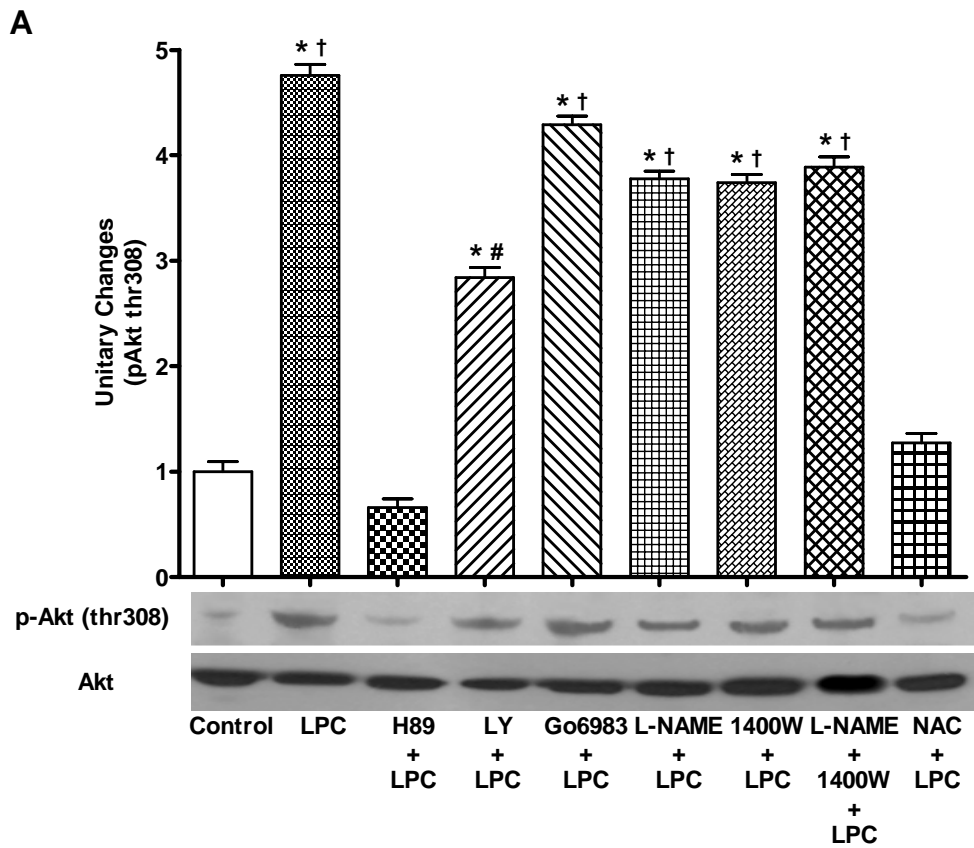


Figura 14

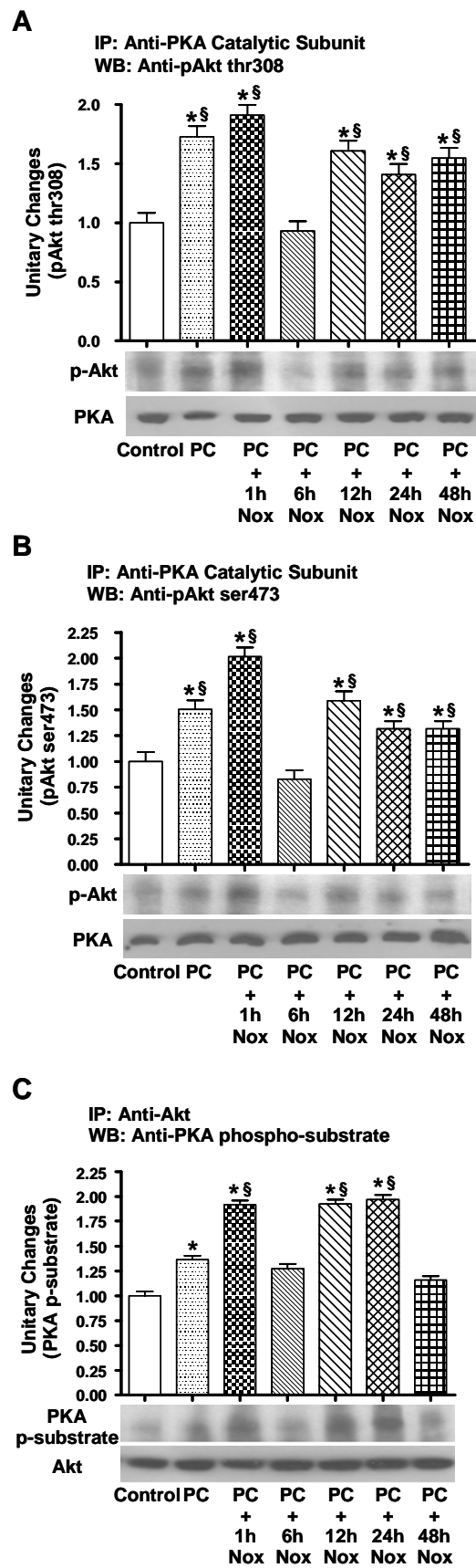
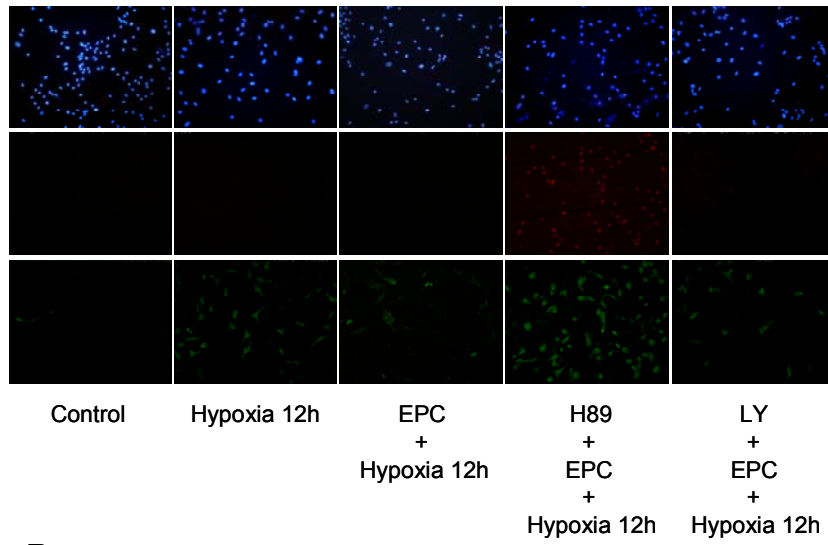


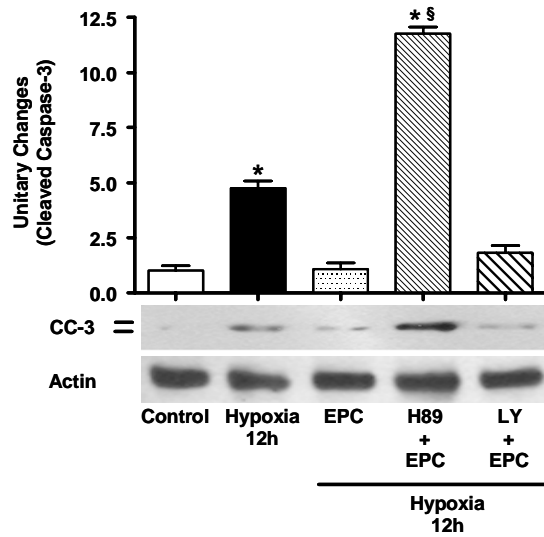


Figura 15

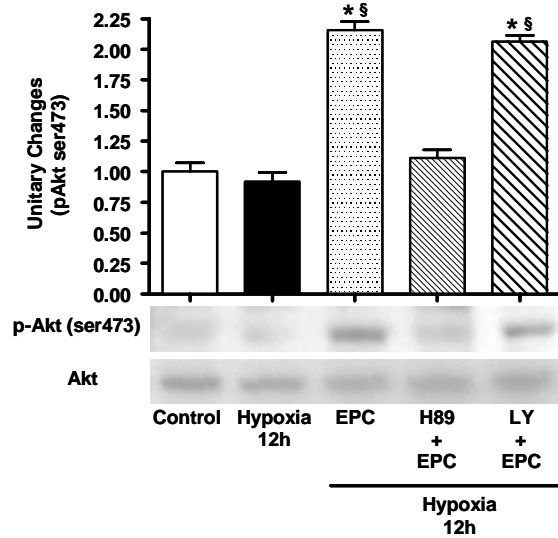
**A**



**B**

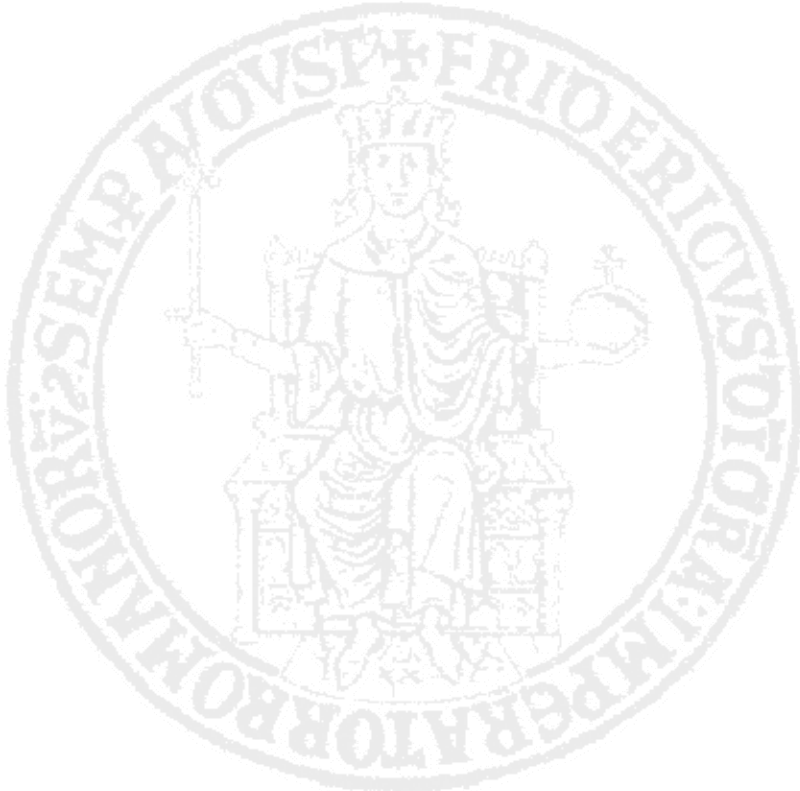


**C**



# Legende delle Figure

---



**Figura 1.** (A) Le cellule sono state sottoposte ad ipossia, come indicato. L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione con Annessina V (verde), la necrosi mediante Propidio Ioduro (rosso) ed i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). La figura rappresenta la media di sei esperimenti indipendenti. (B) Le cellule sono state sottoposte ad ipossia, come indicato. Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media $\pm$ DS, espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. CC-3: caspasi-3 clivata.

\*p<0,001 vs controllo.

**Figura 2.** (A) Protocollo di preconditionamento ischemico (PC). (H: Ipossia; R: Riossigenazione). (B) Le cellule sono state sottoposte ad ipossia dopo il PC, come indicato. L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione con Annessina V (verde), la necrosi mediante Propidio Ioduro (PI) (rosso) ed i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). I tassi di apoptosi e necrosi sono stati rispettivamente calcolati dividendo il numero di cellule Annessina V-positive/PI-negative ed Annessina V-positive/PI-positive per il numero totale dei nuclei rilevati con colorazione DAPI. La percentuale di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stata calcolata in sei esperimenti indipendenti. (Nox: normossia). (C) Le cellule sono state sottoposte ad ipossia dopo il PC, come indicato. Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media $\pm$ DS, espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. CC-3: caspasi-3 clivata.

\*p<0,001 vs controllo.

**Figura 3.** Le cellule sono state sottoposte al preconditionamento ischemico (PC). La produzione di citrullina (A) e l'accumulo di nitriti (B) sono stati valutati a

differenti tempi dopo il PC. (Nox: normossia). Il grafico a colonne mostra l'aumento relativo, espresso come  $\text{media} \pm \text{DS}$ , nella produzione di citrullina e dell'accumulo di nitriti rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. (C) La fosforilazione della ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) e (D) l'espressione della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) sono state valutate a differenti tempi dopo il PC. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella fosforilazione o nella espressione proteica rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. ser1177: serina1177.

\* $p < 0,001$  vs controllo; §  $p < 0,001$  vs PC + 6h Nox.

**Figura 4.** Le cellule sono state sottoposte a preconditionamento tardivo (LPC) in presenza ed assenza di diversi inibitori, come riportato nel testo. Sono stati valutati la produzione di citrullina (A) e l'accumulo di nitriti (B). Il grafico a colonne mostra la  $\text{media} \pm \text{DS}$  di cinque esperimenti indipendenti. (C) Le bAEC sono state sottoposte al preconditionamento ischemico (PC) e raccolte a differenti tempi. Gli estratti proteici sono stati blottati con un anticorpo anti-nitrotirosina per valutare la nitrosilazione proteica. (D) Il pretrattamento delle cellule preconditionate tardivamente con NAC ha determinato una riduzione nella nitrosilazione proteica rispetto alle cellule di controllo. (Nox: normossia). Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica delle sei bande maggiori,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella nitrosilazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. LY: LY294002; L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginina-metil-estere; NAC: N-acetil-cisteina.

\*  $p < 0,001$  vs controllo; †  $p < 0,001$  vs H89, LY e NAC; §  $p < 0,001$  vs PC e PC+24h Nox.

**Figura 5.** Le cellule sono state sottoposte a preconditionamento tardivo (LPC) in presenza ed assenza di diversi inibitori, come riportato nel testo. Sono state

valutate (A) la fosforilazione di ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) e (B) l'espressione di ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS). Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella fosforilazione e nell'espressione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. ser1177: serina1177.

\*  $p < 0,001$  vs controllo; †  $p < 0,001$  vs H89, LY and NAC.

**Figura 6.** Il preconditionamento ischemico (PC) ha indotto la fosforilazione del kemptide. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella fosforilazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. (Nox: normossia).

\*  $p < 0,001$  vs controllo; §  $p < 0,001$  vs PC + 6h Nox.

**Figura 7.** Il preconditionamento ischemico (PC) ha indotto la fosforilazione di Akt (A, B). Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella fosforilazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. (C, D) Le cellule sono state raccolte ai tempi indicati dopo il PC, poi immunoprecipitate con un anticorpo selettivo per la subunità catalitica di protein chinasi A (PKA) e per Akt, infine immunoblottate con un anticorpo anti-fosfo-eNOS. (Nox: normossia). Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella co-immunoprecipitazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0,001$  vs controllo; §  $p < 0,001$  vs PC + 6h Nox.

**Figura 8.** (A) Le cellule preconditionate tardivamente sono state sottoposte ad ipossia in presenza ed assenza di inibitori specifici, come descritto nel testo. Il tasso apoptotico è stato valutato mediante colorazione con Annessina V (verde) e

quello necrotico mediante Propidio Ioduro (rosso), ed i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). La figura mostra quattro esperimenti indipendenti. (B) Le cellule sono state trattate con un inibitore di ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS; 1400W), e poi sottoposte ad ipossia in presenza di preconditionamento tardivo (LPC). Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il diagramma a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media $\pm$ DS, espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, di quattro esperimenti indipendenti. (C) la fosforilazione di Bad in serina112/serina136 (ser112/ser136) è stata valutata mediante immunoblotting nelle bAEC esposte ad ipossia in presenza ed assenza di LPC. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media $\pm$ DS, espressa come aumento relativo nella fosforilazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. Le colonne bianche rappresentano la fosforilazione in ser112; le colonne nere indicano la fosforilazione in ser136. LPC: preconditionamento tardivo; LY: LY294002. CC-3: caspasi-3 clivata.

\* p<0,001 vs controllo; § p<0,001 vs ipossia 12 h.

**Figura 9.** (A) Le cellule sono state trattate come indicato, e poi sottoposte ad ipossia in assenza o presenza di preconditionamento tardivo (LPC). Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media $\pm$ DS, espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. (B) Le bAEC sono state transfettate con uno short interfering RNA selettivo per la isoforma endoteliale della NOS (beNOS-siRNA, 20  $\mu$ g), e quindi sottoposte ad ipossia in assenza o presenza di LPC. Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. L'espressione proteica di eNOS è stata rilevata nelle cellule transfettate mediante immunoblotting. (C) Le cellule sono state transfettate con plasmidi codificanti per il mutante dominante negativo di protein chinasi A (DN PKA; 6  $\mu$ g) o pcDNA3 (6  $\mu$ g) e sottoposte ad ipossia in

presenza ed assenza di LPC. Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $media \pm DS$ , espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in cinque esperimenti indipendenti. (D) Le cellule sono state transfettate con plasmidi codificanti per il mutante dominante negativo di Akt (DN Akt; 6  $\mu g$ ) o pcDNA3 (6  $\mu g$ ), e poi sottoposte ad ipossia in presenza ed assenza di LPC. Il clivaggio di caspasi-3 è stato valutato mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $media \pm DS$ , espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in cinque esperimenti indipendenti. LY: LY294002; L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginina-metil-estere; NAC: N-acetil-cisteina. CC-3: caspasi-3 clivata.

\*  $p < 0,05$  vs controllo; §  $p < 0,001$  vs Ipossia 12h.

**Figura 10.** (A) Le bAEC sono state transfettate con uno short interfering RNA selettivo per la isoforma endoteliale della NOS (beNOS-siRNA, 20  $\mu g$ ) e poi sottoposte a preconditionamento tardivo (LPC). La produzione di nitriti è stata valutata mediante la reazione di GRIESS. Le cellule sono state staccate ai tempi indicati dopo preconditionamento ischemico (PC). Le frazioni nucleare (50  $\mu g$ ) (B) e citosolica (50  $\mu g$ ) (C) sono state sottoposte ad analisi di immunoblot utilizzando un anticorpo anti-eNOS. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $media \pm DS$ , espressa come aumento/decremento nella traslocazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. (D) Le bAEC sono state transfettate con beNOS-siRNA e poi sottoposte a 12 ore di ipossia in presenza ed assenza di LPC. L'espressione proteica di eNOS e di ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) è stata valutata mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $media \pm DS$ , espressa come aumento relativo nell'espressione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0,001$  vs controllo.

**Figura 11.** (A) Le bAEC sono state transfettate con plasmidi codificanti, rispettivamente, per il mutante dominante negativo di protein chinasi a (DN PKA) e di Akt (DN Akt), entrambi marcati con emoagglutinina (HA), e con uno short interfering RNA selettivo per la isoforma endoteliale della NOS (beNOS-siRNA). Le cellule sono poi state trattate come descritto nel testo. L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione con Annessina V (verde) mentre la necrosi mediante Propidio Ioduro (rosso), ed i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). La figura mostra tre esperimenti indipendenti. L'efficacia della transfezione è stata determinata per DN PKA (B) e per DN Akt (C) sia attraverso la valutazione della espressione di HA, che attraverso l'espressione proteica di PKA ed Akt mediante immunoblotting. LPC: preconditionamento tardivo.

**Figura 12.** Il clivaggio di caspasi-3 indotto dall'ipossia è stato valutato mediante immunoblotting su cellule preconditionate sia precocemente che tardivamente, 1 ora e 48 ore dopo l'applicazione del preconditionamento ischemico (PC). Le cellule preconditionate ad 1 ora e 48 ore dopo l'applicazione del PC sono state, inoltre, trattate con un donatore a lento rilascio di ossido nitrico (NOC-12; 0.1 mM), come descritto nel testo. Il diagramma a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nel clivaggio proteico rispetto alle cellule di controllo, in quattro esperimenti indipendenti. Nox: Normossia; EPC: preconditionamento precoce; LPC: preconditionamento tardivo. CC-3: caspasi-3 clivata.

\*  $p < 0,001$  vs controllo; §  $p < 0,01$  vs EPC e LPC.

**Figura 13.** Le cellule sono state sottoposte a preconditionamento tardivo (LPC) in presenza ed assenza di inibitori, come descritto. La fosforilazione di Akt in entrambe treonina308 (thr308) (A) e serina473 (ser473) (B) è stata valutata mediante immunoblotting. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica,  $\text{media} \pm \text{DS}$ , espressa come aumento relativo nella fosforilazione proteica rispetto



alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti.

p<0,001 vs controllo; † p<0,001 vs H89, LY e NAC; # p<0,001 vs H89.

**Figura 14.** (A, B) Le cellule sono state raccolte ai tempi indicati dopo il preconditionamento ischemico (PC), e quindi immunoprecipitate con un anticorpo diretto contro la subunità catalitica di protein chinasi A (PKA) ed immunoblottate con anticorpi anti-fosfo-Akt. (C) Le cellule sono state raccolte ai tempi indicati dopo il PC, e quindi immunoprecipitate con un anticorpo diretto contro Akt ed immunoblottate con un anticorpo anti-substrato fosforilato di PKA. (Nox: normossia). Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media±SEM, espressa come aumento relativo nella co-immunoprecipitazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti.

\* p<0,001 vs controllo; § p<0,001 vs PC + 6h Nox.

**Figura 15.** (A) Le cellule preconditionate precocemente sono state sottoposte ad ipossia, in presenza ed assenza di H89 e LY294002. L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione con Annessina V (verde) mentre la necrosi mediante Propidio Ioduro (rosso), ed i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). La figura mostra cinque differenti esperimenti. Le bAEC preconditionate precocemente sono state esposte ad ipossia. Il clivaggio di caspasi-3 (B) e la fosforilazione di Akt in serina473 (ser473) (C) sono stati valutati in presenza ed assenza di H89 e LY294002. Il grafico a colonne rappresenta l'analisi densitometrica, media±DS, espressa come aumento relativo nel clivaggio e nella fosforilazione proteica rispetto alle cellule di controllo, in tre esperimenti indipendenti. EPC: preconditionamento precoce; LY: LY294002. CC-3: caspasi-3 clivata.

\* p<0,001 vs controllo; § p<0,001 vs ipossia 12 h.

## Tabelle

---

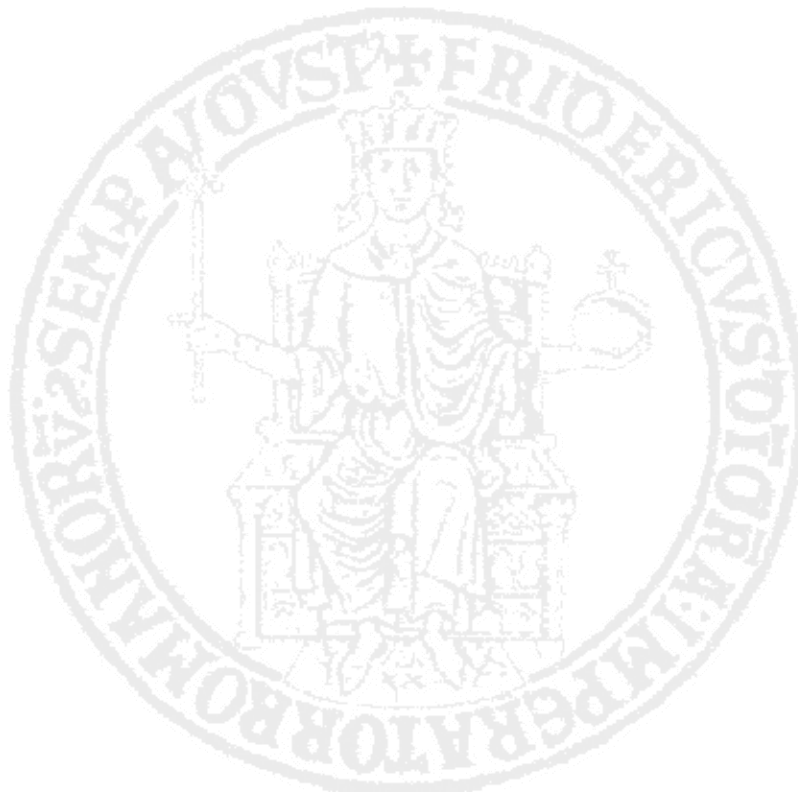


### Tabella I

Tassi di morte cellulare per apoptosi (Annessina V) e per necrosi (Annessina V + Propidio Ioduro) dopo differenti periodi di ipossia.

	Annessina V	Annessina V + Propidio Ioduro
Controllo	7±2%	2±1%
Ipossia 1 h	23±8%*	5±2%
Ipossia 6 h	46±11%*	12±6%*
Ipossia 12 h	54±11%*	27±6%*
Ipossia 24 h	21±8%*	73±5%*

\*  $p < 0,05$  vs controllo. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato dividendo il numero di cellule Annessina-V-positive/PI-negative ed Annessina-V-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato in sei esperimenti indipendenti.

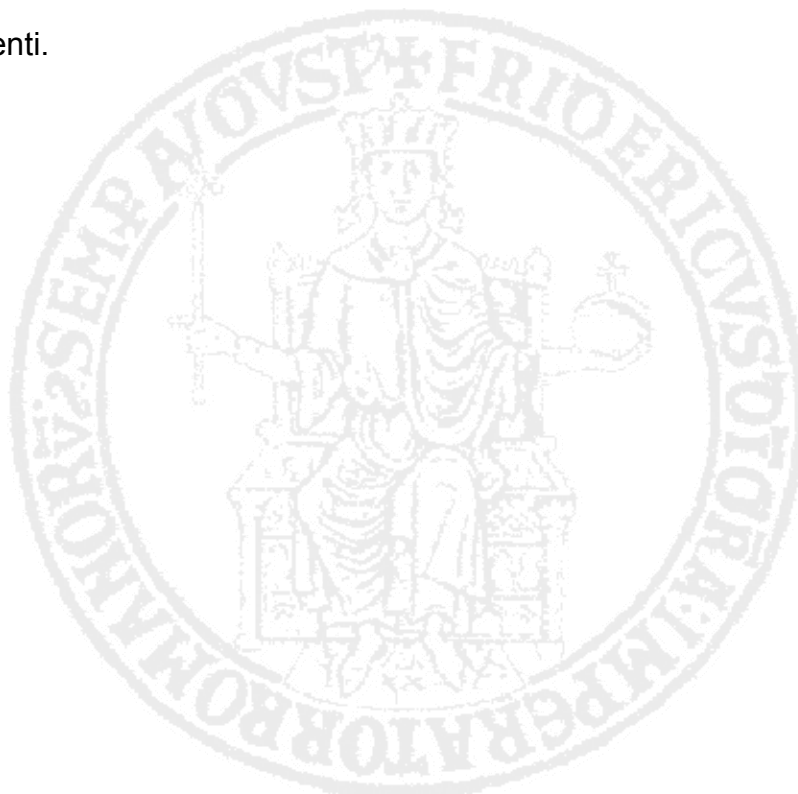


## Tabella II

Tassi di morte cellulare per apoptosi (Annessina V) e per necrosi (Annessina V + Propidio Ioduro) dopo 12 ore di ipossia precedute da preconditionamento ischemico (PC).

	Annessina V	Annessina V + Propidio Ioduro
Controllo	6±3%	3±1%
Ipossia 12 h	48±5%*	12±4%*
PC + Ipossia 12 h	25±5%*§	6±3%§
PC + 6 h Nox + Ipossia 12 h	55±9%*	18±6%*
PC + 24 h Nox + Ipossia 12 h	28±4%*§	8±2%§

\*  $p < 0,05$  vs controllo; §  $p < 0,05$  vs Ipossia 12h. (Nox: normossia). Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato dividendo il numero di cellule Annessina-V-positive/PI-negative ed Annessina-V-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato in sei esperimenti indipendenti.



### Tabella III

Tassi di morte cellulare per apoptosi (Annessina V) e per necrosi (Annessina V + Propidio Ioduro) dopo 12 ore di ipossia precedute da preconditionamento tardivo (LPC) in presenza ed assenza di chelanti dei radicali liberi dell'ossigeno (NAC), inibitori di protein chinasi A (H89), fosfatidil-inositolo-3-chinasi (LY294002), protein chinasi C (Go6983), e ossido nitrico sintasi inducibile (1400W), e di inibizione aspecifica della sintesi di ossido nitrico (L-NAME + 1400W).

	Annessina V	Annessina V + Propidio Ioduro
Controllo	8±4%	4±2%
Ipossia 12 h	51±6%*	16±3%*
LPC + Ipossia 12 h	29±4%*§	9±4%§
H89 + LPC + Ipossia 12 h	61±5*‡	25±6*‡
LY294002 + LPC + Ipossia 12 h	58±4*‡	24±3*‡
Go6983 + LPC+ Ipossia 12 h	34±6*§	9±2§
1400W + LPC + Ipossia 12 h	35±3*§	6±2§
L-NAME + 1400W + LPC Ipossia 12h	33±7*§	8±4§
NAC + LPC +Ipossia 12 h	57±4*‡	23±4*‡

\* p<0,05 vs controllo; § p<0,05 vs ipossia 12 h; ‡ p<0,05 vs LPC + ipossia 12 h. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato dividendo il numero di cellule Annessina-V-positive/PI-negative ed Annessina-V-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato in quattro esperimenti indipendenti. LPC: preconditionamento tardivo, NAC: N-acetil-cisteina, L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginina-metil-estere.

#### Tabella IV

Tassi di morte cellulare per apoptosi (Annessina V) e per necrosi (Annessina V + Propidio Ioduro) dopo 12 ore di ipossia precedute da preconditionamento tardivo (LPC) in presenza ed assenza di transfezione con mutanti dominanti negativi di PKA (DN PKA) ed Akt (DN Akt), e con uno short-interfering RNA selettivo per la ossido nitrico sintasi endoteliale bovina (beNOS-siRNA).

	Annessina V	Annessina V + Propidio Ioduro
Controllo	7±1%	3±1%
Ipossia 12 h	49±2%*	15±2%*
LPC + ipossia 12 h	27±2%*§	6±1%§
DN PKA + LPC + Ipossia 12h	60±5*‡	23±6*‡
DN Akt + LPC + Ipossia 12 h	59±4*‡	24±2*‡
beNOS-siRNA + LPC + Ipossia 12 h	25±2*§	6±2§

\* p<0,05 vs controllo; § p<0,05 vs ipossia 12 h; ‡ p<0,05 vs LPC + ipossia 12 h. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato dividendo il numero di cellule Annessina-V-positive/PI-negative ed Annessina-V-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato in tre esperimenti indipendenti. LPC: preconditionamento tardivo.

### Tabella V

Tassi di morte cellulare per apoptosi (Annessina V) e per necrosi (Annessina V + Propidio Ioduro) dopo 12 ore di ipossia precedute da preconditionamento precoce (EPC) in presenza ed assenza di inibitori di protein chinasi A (H89) e fosfatidil-inositolo-3-chinasi (LY294002).

	Annessina V	Annessina V + Propidio Ioduro
Controllo	5±3%	2±1%
Ipossia 12 h	47±4%*	13±3%*
EPC + Ipossia 12 h	28±3%*§	5±3%§
H89 + EPC + Ipossia 12 h	60±6%*‡	23±6%*‡
LY294002 + EPC + Ipossia 12 h	27±4%*§	6±2%§

\* p<0,05 vs controllo; § p<0,05 vs ipossia 12 h ‡; p<0,05 vs EPC + ipossia 12 h. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato dividendo il numero di cellule Annessina-V-positive/PI-negative ed Annessina-V-positive/PI-positive per il numero totale di nuclei rilevati con colorazione DAPI, rispettivamente. Il tasso di morte cellulare per apoptosi e per necrosi è stato calcolato in cinque esperimenti indipendenti. EPC: preconditionamento precoce.

