

Università degli Studi di Napoli Federico II

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**



**Dottorato di Ricerca in**

**Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale**

XXIV Ciclo

(Coordinatore: Prof. Gianni Marone)

**Tesi di Dottorato**

**La delezione dell'E3 ubiquitina ligasi SIAH2 riduce l'apoptosi  
indotta da ipossia e l'infarct size dopo legatura dell'arteria  
coronaria**

Tutore

**Chiar.mo**

**Prof. Giovanni Esposito**

Candidato

**Dott. Gianluigi Pironti**

# INDICE

INTRODUZIONE	pag. 2
MATERIALI E METODI	pag. 8
RISULTATI	pag. 23
DISCUSSIONE	pag. 30
TABELLE	pag. 37
FIGURE	pag. 40
BIBLIOGRAFIA	pag. 46

## **INTRODUZIONE**

Lo scompenso cardiaco (CHF) è una sindrome clinica complessa, risultato di un disordine cardiaco strutturale o funzionale, che causa un ostacolo al riempimento o allo svuotamento ventricolare. Le manifestazioni cliniche principali sono la dispnea e l'affaticamento, che riducono la tolleranza allo sforzo, e la ritenzione idrica, che provoca congestione polmonare ed edema periferico [1].

Il CHF rappresenta lo stadio finale di una serie di patologie cardiovascolari, quali la cardiomiopatia dilatativa, ipertrofica ed ischemica; in Europa la disfunzione miocardica secondaria a cardiopatia ischemica, generalmente conseguente a infarto miocardio acuto (IMA), corrisponde a circa tre quarti dei casi di CHF [2].

Il numero di pazienti con cardiopatia ischemica è aumentato e le malattie cardiovascolari rappresentano la causa principale di morte nel mondo occidentale. Nonostante lo sviluppo di interventi farmacologici e non-farmacologici, il 33 % degli uomini e il 43 % delle donne muore entro i 5 anni dopo infarto al miocardio (MI) [3]. L'evoluzione da MI a CHF prevede una serie di modificazioni

strutturali, quali l'ipertrofia compensatoria, la fibrosi interstiziale, l'apoptosi cellulare, la riespressione di geni fetali e le alterazioni dei canali ionici e dell'omeostasi del calcio, definite nell'insieme rimodellamento cardiaco post-ischemico e che determinano un progressivo peggioramento della funzione sisto-diastolica del miocardio [4]. Il rimodellamento cardiaco, infatti, predispone il ventricolo sinistro ad una successiva dilatazione ed evoluzione verso lo scompenso, rappresentando, pertanto, un importante fattore predittivo di morbilità e mortalità nel paziente con storia di cardiopatia ischemica.

La fase iniziale dell'infarto al miocardio è caratterizzata principalmente dalla morte per necrosi delle cellule che si trovano nel cuore ischemico. Nei giorni e nelle settimane seguenti, si assiste ad una fase di rimodellamento ventricolare maladattativo i cui fenomeni caratteristici includono: apoptosi persistente dei cardiomiociti, fibrosi, assottigliamento e dilatazione della camera ventricolare; ipertrofia compensatoria dei cardiomiociti che si trovano nell'area non ischemica [5].

Nel miocardio del cuore scompensato si assiste ad una riduzione del fabbisogno energetico. A fronte di una riduzione dell'apporto di ossigeno e di substrati energetici, il cuore riduce la contrattilità, anche in funzione protettiva, per ridurre la possibilità di esacerbazione della sindrome secondaria ad uno squilibrio tra

richiesta e produzione di energia [6]. Esistono dati indicativi di un'alterata funzione mitocondriale nello scompenso, con dimostrazione di una riduzione dell'attività degli enzimi della catena respiratoria, quali la catalasi e la superossido dismutasi, enzimi in grado di neutralizzare i ROS mitocondriali [7, 8]. I mitocondri giocano, pertanto, un ruolo essenziale nella fisiologia dei cardiomiociti e nella regolazione dei pathways di ossido-riduzione, nella risposta allo stress, nell'ischemia miocardica, nello scompenso cardiaco, nell'ipertrofia e nell'invecchiamento mediante la regolazione della produzione dei ROS.

Nonostante i progressi nella terapia delle malattie cardiovascolari, la prognosi dell'insufficienza cardiaca rimane sfavorevole. Numerose variabili sono state associate alla ridotta sopravvivenza nei pazienti con insufficienza cardiaca: l'eziologia, il quadro clinico, la funzione ventricolare, la tolleranza all'esercizio, il profilo neuroendocrino e, più recentemente, marcatori infiammatori e di necrosi tissutale [9].

Negli eucarioti superiori, l'ossigeno rappresenta l'elemento chiave nella respirazione mitocondriale e nella sintesi ossidativa dell'ATP. La concentrazione di ossigeno è mantenuta a livelli fisiologici da sistemi altamente organizzati, quali il respiratorio e il circolatorio. Durante ischemia, l'ostruzione del flusso sanguigno ai

tessuti provoca la riduzione dell'apporto di ossigeno (ipossia) e di metaboliti alle cellule.

Gli organismi pluricellulari rispondono al danno ipossico alterando attività fisiologiche fondamentali come la respirazione e il metabolismo per mantenere l'omeostasi cellulare. Senza un'appropriata risposta all'ipossia organismi multicellulari possono andare in contro a morte cellulare. Negli umani la risposta all'ipossia è caratterizzata da alterazioni fisiologiche a carico del metabolismo, della respirazione, della produzione di cellule emopoietiche e della neovascolarizzazione [10].

L'ipossia viene rilevata rapidamente da un meccanismo ossigeno-sensibile che altera la trascrizione genica. Queste alterazioni hanno un importante ruolo nella commutazione dal metabolismo ossidativo a quello fermentativo.

L'ubiquitinazione delle proteine gioca un ruolo fondamentale durante l'ipossia. Per esempio, durante l'ipossia, l'ubiquitinazione di HIF-1 $\alpha$  e di p53 è inibita, mentre l'ubiquitinazione di MyoD e I $\kappa$ B è promossa [11, 12]. L'ubiquitinazione avviene attraverso un processo di reazioni sequenziali da parte di un enzima attivatore dell'ubiquitina (E1), un enzima trasportatore dell'ubiquitina (E2) e un enzima ubiquitina ligasi (E3) specifico per ogni substrato [13]. I substrati riconosciuti da E3 possono essere mono o poliubiquitinati

per essere poi degradati, o in alcuni casi, alterati in termini di localizzazione subcellulare o interazione proteina-proteina [14].

SIAH (Seven in absentia homologue) rappresenta una famiglia di proteine ubiquitina ligasi con un'alta omologia di sequenza per la proteina della *Drosophila*, Sina, coinvolta nello sviluppo dell'occhio [15, 16]. Nei mammiferi esistono due isoforme, SIAH 1 e SIAH 2, in particolare, i topi esprimono due varianti trascrizionali di SIAH1, 1a e 1b [17]. SIAH2 è un'ubiquitina ligasi E3 con un dominio catalitico ad anello N-terminale, seguita da un motivo a due dita di zinco e un dominio, C-terminale, di legame al substrato (SBD) altamente conservato [18]. Topi knock-out per SIAH2 mostrano un fenotipo normale con un lieve incremento del numero di cellule emopoietiche [19], tuttavia, i doppi knock-out per SIAH1a e SIAH2 mostrano letalità embrionale, dimostrando così che insieme questi geni svolgono un ruolo essenziale nell'embriogenesi.

SIAH2 è coinvolta nella degradazione di diversi substrati tra cui DCC,  $\beta$ -catenina, N-CoR, c-myb, Numb, TRAF2, PHD1 e PHD3 (Tabella 1), ma ciò che rende interessante questa proteina è il fatto che i livelli trascrizionali di SIAH2 aumentano notevolmente nelle cellule già 2 ore dopo l'esposizione a condizioni di ipossia [20]. Questa proteina svolge la sua attività degradando in maniera proteasoma-dipendente diversi substrati che mediano direttamente o indirettamente la risposta cellulare all'ipossia, tra cui AKAP 121

[21]. La proteina di ancoraggio mitocondriale della Proteina chinasi A, AKAP 121, assembla un complesso multivalente di segnalazione sulla membrana mitocondriale esterna che controlla la persistenza e la grandezza del signaling cAMP e src ai mitocondri, e svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo ossidativo e nella sopravvivenza cellulare [21]. In condizioni di ipossia, SIAH2 media la rapida degradazione di AKAP 121 sia in colture cellulari che nel cervello di ratto riducendo pertanto l'attività mitocondriale [21].

In questo studio abbiamo ipotizzato che la proteina SIAH2 possa svolgere un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza cellulare dopo insulto ischemico attraverso la regolazione dei livelli cellulari di AKAP 121 e del metabolismo cellulare. Pertanto, è stata valutata la conseguenza della delezione del gene codificante SIAH2, in seguito al danno da ischemia tessutale, in un modello murino di infarto miocardico acuto e in un modello di ipossia cellulare.



# MATERIALI E METODI

## *Animali inclusi nello studio*

Tutti gli esperimenti effettuati su animali sono stati condotti in conformità alla Guida per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio pubblicato dall'istituto nazionale degli Stati Uniti della Salute (Pubblicazione NIH 85-23, revisione del 1996) e in seguito all'approvazione della regolamentazione del benessere degli animali dell'Università Federico II di Napoli.

Allo scopo di valutare gli effetti derivanti dalla mancata espressione della proteina SIAH2, e per meglio chiarirne il ruolo nel muscolo cardiaco, sono stati utilizzati topi C57 BL6/J, di 8-9 settimane transgenici, privi del gene che codifica per SIAH2 ( $SIAH2^{-/-}$ , n=49), topi knock-out per AKAP121 ( $AKAP121^{-/-}$ , n=15), e topi di controllo wild-type (WT, n=46). Gli animali  $SIAH2^{-/-}$  sono stati ottenuti inserendo nell'esone 4 della sequenza codificante per SIAH2 il gene per resistenza alla neomicina (NeoR) [19]. La struttura "targeting" così prodotta è stata successivamente introdotta in cellule staminali embrionali (ES) di topo mediante elettroporazione. Quindi, trattando queste cellule ES con neomicina, è stato possibile selezionare i cloni mutanti, in quanto solo questi mostravano resistenza alla neomicina. Successivamente, le cellule

ES sono state iniettate in un embrione murino allo stato di blastocisti e quest'ultimo impiantato in un topo femmina che fungeva da madre surrogata. I topi chimerici, contenenti cioè cellule provenienti da due ceppi diversi, sono stati incrociati con topi wild-type per ottenere animali eterozigoti per il gene specifico. Gli animali knock-out sono stati ottenuti facendo accoppiare tra loro animali con genotipo eterozigote per la mutazione su menzionata ( $SIAH2^{-/-}$ ). I topi omozigoti per la mutazione risultavano fertili ed il loro fenotipo non sembrava modificato rispetto agli animali di controllo WT.

### ***Colture primarie di fibroblasti embrionali murini (MEF)***

Le cellule sono state isolate da embrioni murini sia WT e  $SIAH2^{-/-}$ . Gli embrioni sono stati prelevati da femmine gravide al 13°-14° giorno di gestazione. Immediatamente dopo il prelievo, l'utero è stato posto in una piastra petri contenente una soluzione sterile composta da PBS (phosphate buffered saline) e Penicillina/Streptomicina (PEN/STREP) al 2% . Con strumenti sterili da microchirurgia, dopo aver identificato e trasferito i singoli embrioni in nuove piastre petri sterili contenenti PBS e PenStrep 2%, si è proceduto alla rimozione della testa e del fegato. Successivamente gli embrioni sono stati lavati ripetutamente con PBS e PenStrep al 2% sterile, e poi trasferiti in siringhe da 1cc con

ago da 18-gauge, contenenti una soluzione di Tripsina/EDTA. La sospensione risultante dalla omogeneizzazione meccanica degli embrioni è stata incubata a 37°C per 5 minuti; a questo punto, le cellule sono state passate in piastre petri da 100 mm e coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con Siero Bovino Fetale (FBS,10%), Penicillina-Streptomicina (PEN-STREP,1%), Glutamina (2%), Non-essential Amino acid (NEAA ,1%) e mantenute a 37°C in presenza di CO<sub>2</sub> al 5% [22].

### ***Protocollo di ipossia, privazione di ossigeno e glucosio (OGD)***

Per gli esperimenti di ipossia abbiamo utilizzato un modello cellulare che mima la condizione di ischemia tessutale mediante privazione di ossigeno e glucosio (OGD) [23, 24]. Nelle colture cellulari (MEFs) piastrate su dischi di 100 mm e portate ad una confluenza dell'85%, le condizioni ipossiche sono state realizzate nel seguente modo: le cellule MEFs sono state sospese in una soluzione a pH 7,3 composta da NaCl 116 mM, KCl 54 mM, MgSO<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; cinque minuti prima dell'utilizzo questa soluzione veniva saturata con una miscela di gas contenente N<sub>2</sub> 93% - CO<sub>2</sub> 5% - O<sub>2</sub> 2%. Le colture sono state tenute a

37°C in una camera ipossica contenente la mistura di gas precedentemente detta.

***Valutazione mediante immunoblotting dei livelli di AKAP 121, Caspasi 3 e pAKT***

Le colture cellulari ed i ventricoli di sinistra dei cuori espianati quattro settimane dopo infarto del miocardio sono stati lisati in un buffer contenente Tris-HCl [pH 7.5], NaCl, 1%, Nonidet P-40, 0,5% e inibitori di proteasi a 4 °C. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti e poi centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C. La concentrazione proteica di ogni lisato è stata effettuata mediante kit della Bio-Rad e lettura allo spettrofotometro (Bio-Rad) a 750 nm. Le proteine sono state sottoposte a separazione mediante elettroforesi su gel di acrilamide SDS PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Dopo il blocking le membrane sono state incubate con anticorpo primario diretto contro le proteine: Cleaved Caspase 3 (rabbit monoclonal, Cell Signaling; diluizione 1:1000 in latte 5% TBS-T 0.1%, over-night +4°C); pAkt (rabbit policlonal, Santa Cruz; diluizione 1: 500 in latte 5% TBS-t 0.1%, over-night +4°C ); AKAP 121 (goat monoclonal, Santa Cruz; diluizione 1:1000 in latte 5% TBS-t 0.1%, over-night +4°C); GAPDH (mouse monoclonal, Santa Cruz; diluizione 1:1000 in latte

5% TBS-t 0.1%, over-night +4°C). L'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano e scelto in base alla specie animale utilizzata per produrre l'anticorpo primario, è stato utilizzato per evidenziare, tramite la tecnica di chemiluminescenza, il livello di espressione della proteina oggetto dello studio (1:1 ECL Plus, GE Healthcare; Anti-rabbit IgG 1:3000 in latte 5% TBS-T 0,1%, incubato un'ora a temperatura ambiente).

***Valutazione della produzione cellulare di ROS mediante colorante MitoSOX in condizioni basali e dopo stress ipossico***

Per definire l'entità dello stress ossidativo cellulare, in condizioni basali e dopo ipossia, abbiamo utilizzato un indicatore di anione superossido di origine mitocondriale, MitoSOX<sup>TM</sup> Red (Molecular Probes). Cellule WT e SIAH2<sup>-/-</sup> prima e dopo 12 ore di ipossia, sono state incubate con il MitoSOX Red (5µM) a 37°C per 10 minuti, protette dalla luce. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate per tre volte in HBSS/Ca/Mg (GIBCO) tiepido e poi fissate in paraformaldeide all'1%. La produzione mitocondriale di ROS è stata successivamente rilevata mediante microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE 2000-U e analizzata mediante un software di immagini Image J.

### ***Potenziale elettrico trans membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ )***

Nel presente studio, è stato valutato il potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule di entrambi i gruppi (WT e SIAH2<sup>-/-</sup>) in condizioni basali e dopo stress ipossico. Il potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ) è stato valutato, mediante citometria a flusso, utilizzando una molecola non tossica carica positivamente, il tetrametilrodamina etilestere (TMRE, MolecularProbes) che si accumula reversibilmente nello spazio intermembrana del mitocondrio, richiamato dal potenziale di membrana negativo. Le cellule di entrambi i gruppi (WT e SIAH2<sup>-/-</sup>) sono state incubate in 50 nM TMRE per 20 minuti a 37°C al buio. Al termine della incubazione, le cellule sono state sospese in PBS 1%, e conservate in ghiaccio fino al momento dell'analisi al citofluorimetro.

### ***Valutazione della funzionalità mitocondriale mediante saggio MTT***

La funzionalità mitocondriale dei MEF, in condizioni basali e dopo 12 ore di ipossia, è stata stimata mediante valutazione dell'attività della deidrogenasi mitocondriale, un enzima che in cellule vitali converte il reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in cristalli di formazano. In

breve, le cellule sono state sistemate in piastre da 12 pozzetti; prima e dopo ipossia sono state lavate in PBS 1% e successivamente incubate per circa 1 ora a 37°C con il reagente MTT; Infine le cellule sono state distrutte con DMSO (99,9% Sigma-Aldrich) e l'entità della produzione di cristalli di formazano, che è un indice diretto della funzionalità mitocondriale, è stata misurata come valori di assorbanza (540 nm) mediante spettrofotometro (SmartSpec<sup>RM</sup> Plus, Biorad).

#### ***Valutazione dell'apoptosi cellulare mediante metodica TUNEL***

Per la valutazione dell'apoptosi cellulare, i MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> prima e dopo 12 ore di OGD, sono stati esaminati con kit ApopTag Plus Peroxidase In Situ e kit ApopTag Plus Fluorescein In Situ (Chemicon). Le cellule sono state fissate su vetrino con paraformaldeide all'1% per 15 minuti a temperatura ambiente e, successivamente, permeabilizzate con soluzione di etanolo ed acido acetico (2:1) per 5 minuti a -20°C. Dopo 2 lavaggi da 5 minuti in PBS, è stato applicato Equilibration Buffer per 10 secondi, seguito poi da Tdt per 1 ora a 37°C. Al termine della reazione, sono state incubate con Stop/Wash Buffer per 10 minuti e, successivamente, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 1 minuto in PBS. E' stata, poi, applicata anti-Digossigenina fluoresceinata per 30 minuti ed eseguiti

4 lavaggi da 2 minuti con PBS. Infine, i vetrini sono stati montati utilizzando un vetrino copri oggetto e mezzo di montaggio contenente 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), e osservati al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse TE 2000-U). La densità apoptotica è stata valutata mediante il rapporto dei nuclei apoptotici su nuclei di cellule vitali.

### ***Modello murino di infarto miocardico acuto***

Nel presente studio, 55 animali  $SIAH2^{-/-}$ , 15 animali  $AKAP121^{-/-}$  e 60 animali WT sono stati sottoposti ad infarto miocardico acuto mediante legatura del ramo discendente anteriore dell'arteria coronaria sinistra (IMA); 12 animali  $SIAH2^{-/-}$  e 11 animali WT sono stati, invece, utilizzati come gruppo di controllo (SHAM). Dopo anestesia inalatoria di induzione, ottenuta con una miscela gassosa di ossigeno (95%) e Sevofluorano (5%), la trachea di questi animali è stata incannulata con tubo semirigido per consentire la ventilazione meccanica per mezzo di uno specifico strumento per roditori a pressione positiva (HARVARD, MA, USA); durante l'intervento, l'anestesia è stata mantenuta con Sevofluorano al 3%. Dopo stabilizzazione delle condizioni emodinamiche, i topi sono stati sottoposti a toracotomia laterale sinistra in corrispondenza del 5° spazio intercostale sulla linea



emiclaveare e a legatura della arteria coronaria sinistra nel suo tratto prossimale al di sotto dell'auricola sinistra, mediante fili di sutura 8.0. I topi SHAM sono stati anestetizzati e sottoposti a toracotomia laterale sinistra senza legatura della coronaria. Successivamente, è stato introdotto un tubo PE50 nel seno costofrenico sinistro per riportare la pressione intratoracica ai normali valori fisiologici. Nelle ore seguenti, è stato somministrato all'animale un farmaco ad azione analgesica (ibuprofene 0,4 mg/kg sottocute per tre giorni) ed un farmaco antibiotico (enofloxacin 4 mg/kg per os nell'acqua da bere, per sette giorni). Dopo 4 settimane dall'intervento, i topi sono stati anestetizzati mediante somministrazione intramuscolare di una miscela di zoletil (Tietilamina + Zolazepam 1:1) 50 mg/kg, sottoposti ad esame ecocardiografico e sacrificati mediante dislocazione cervicale. I cuori sono stati espianati, le camere cardiache dissezionate e pesate ed il ventricolo sinistro è stato tagliato in due. La parte basale è stata congelata in azoto liquido per poter effettuare studi biochimici, mentre la parte apicale è stata conservata in formalina per le indagini istologiche.

### ***Ecocardiografia trans toracica***

Per valutare la funzione cardiaca dopo IMA , gli animali sono stati sottoposti ad ecocardiografia trans-toracica

bidimensionale *M-Mode*; al tempo zero e, quattro settimane dopo l'intervento chirurgico. Tale analisi è stata eseguita mediante un ecocardiografo VEVO 770 (Visualsonic, Canada) con una sonda meccanica ad alta frequenza specifica per roditori in topi precedentemente anestetizzati con zoletil 50 mg/kg.

I parametri ecocardiografici misurati sono stati i seguenti: dimensione telediastolica del ventricolo sinistro (LVEDD, mm); dimensione telesistolica del ventricolo sinistro (LVESV, mm); percentuale della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro ( $FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \%$ ); spessore della parete posteriore (PWd) e del setto (IVSd); frequenza cardiaca (HR).

### ***Valutazione Morfologica***

Quattro settimane dopo IMA gli animali sono stati sacrificati ed i cuori escissi, pesati e fissati in formalina. Dopo l'inclusione in paraffina, i campioni sono stati sottoposti a taglio con microtomo ottenendo sezioni dello spessore di 4  $\mu\text{m}$ . Le immagini sono state acquisite con potere risolutivo 40X e 25X, mediante videocamera (JVC) collegata al microscopio (Leica).

## *Valutazione dell'indice apoptotico nei cuori mediante saggio TUNEL*

L'apoptosi è un processo selettivo e fisiologico di eliminazione cellulare ed è accompagnata da condensazione del citoplasma, perdita dei microvilli della membrana plasmatica, condensazione e frammentazione del nucleo ed estesa degradazione dei cromosomi in oligomeri di circa 180 bp. E' opinione condivisa che la frammentazione del DNA nucleare è un'impronta biochimica dell'apoptosi. Il metodo di marcatura TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end) permette la visualizzazione in situ della frammentazione del DNA a livello delle singole cellule.

Per la valutazione dello stato di apoptosi cellulare, le sezioni di ventricolo sinistro di 7 topi IMA (4 SIAH2<sup>-/-</sup> e 3 WT) e 7 SHAM (4 SIAH2<sup>-/-</sup> e 3 WT) sono state esaminate con il kit ApopTag Fluorescein Direct in Situ Apoptosis Detection (Chemicon). Dopo deparaffinazione e idratazione in serie alcolica decrescente, le sezioni sono state incubate con Proteinasi K (20 µg/mL), per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo 2 lavaggi da 2 minuti in PBS, è stato applicato Equilibration Buffer per 10 secondi seguito poi da Tdt per 1 ora a 37°C. Al termine della reazione, sono state incubate con Stop/Wash Buffer per 10 minuti e, successivamente, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 1 minuto in PBS. E' stata, poi, applicata anti-

Digossigenina fluoresceinata per 30 minuti ed eseguiti 4 lavaggi da 2 minuti con PBS. Infine, i vetrini sono stati montati utilizzando un vetrino copri oggetto e mezzo di montaggio contenente 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), un composto fluorescente che forma complessi con il DNA e osservati al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse TE 2000-U). La densità apoptotica è stata valutata mediante il rapporto dei nuclei apoptotici su nuclei di cellule vitali.

### ***Valutazione dell'estensione dell'area infartuale***

Per la valutazione della percentuale di area infartuale, sezioni di ventricolo sinistro sono state sottoposte a colorazione con Rosso Sirio per determinare i livelli di deposizione delle fibre di collagene. Dopo deparaffinizzazione ed idratazione in serie alcolica decrescente, le sezioni sono state incubate con Rosso Sirio 1% per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in H<sub>2</sub>O e passaggio in serie alcolica crescente, le sezioni sono state trattate con mezzo di montaggio (Eukitt). La colorazione con Rosso Sirio permette di distinguere il tessuto miocardico vitale da quello fibrotico. La percentuale di area infartuale è stata calcolata come rapporto tra l'estensione in mm<sup>2</sup> dell'area infartuale rispetto l'area totale [25]

### ***Saggio Evans blu-TTC per la determinazione dell'area a rischio***

Per l'identificazione dell'area a rischio e per distinguere l'area necrotica dal miocardio vitale, le sezioni di ventricolo sinistro di 7 topi SIAH2<sup>-/-</sup> 15 AKAP121<sup>-/-</sup> e 7 WT sono state colorate con blu di Evans e triphenyltetrazoliumchloride (TTC). A 24 ore dalla legatura del ramo discendente anteriore dell'arteria coronaria sinistra, i topi sono stati sacrificati e i cuori espianati. Il blu di Evans (1%) è stato iniettato nella cavità ventricolare sinistra, attraverso l'aorta ascendente precedentemente cannulata, in modo da diffondere nell'area di miocardio prossimale alla legatura e delineare così l'area non perfusa definita area a rischio (AAR). Il ventricolo sinistro, separato dal resto del cuore, è stato sezionato in 4 fette trasversali parallele al solco atrio-ventricolare. Le sezioni trasversali sono state incubate per 15 minuti a 37° C in una soluzione salina di TTC al 2% (pH 7.4). Tale colorazione permette di distinguere all'interno dell'area ischemica non colorata di blu, il tessuto cardiaco ancora vitale (rosso) dal tessuto cardiaco necrotico (bianco). Le sezioni trasversali colorate sono state acquisite in formato digitale mediante scanner (EPSON AL-CX21) e analizzate mediante un software per immagini collegato ad un computer (Image J). Per ogni sezione è stata misurata l'area della regione infartuata (IA), l'area della regione a rischio (AAR) e l'area del

ventricolo sinistro (LV); infine è stato calcolato il rapporto, espresso in percentuale, fra l'area infartuata e l'area a rischio ( $IA/AAR \times 100$ ) e fra l'area a rischio e l'area del ventricolo sinistro ( $AAR/LV \times 100$ ) [26].

### ***Valutazione della densità dei capillari***

I capillari dei cuori di 7 topi IMA (SIAH2<sup>-/-</sup> e WT) e 7 topi SHAM (SIAH2<sup>-/-</sup> e WT) di controllo sono stati identificati mediante lectina biotinilata, che si lega in maniera specifica alle glicoproteine presenti sulla superficie delle cellule endoteliali umane, consentendo di distinguerle da tutti gli altri citotipi. Le sezioni dello spessore di 4 µm dei cuori fissati in paraffina, sono state sottoposte ad una fase di deparaffinizzazione ed una di idratazione mediante passaggi in Histolemon e in una serie alcolica decrescente. Le sezioni sono state incubate per 20 minuti in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,3% e per 5 minuti in PBS 1X. I campioni sono stati poi trattati con TNB (0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5% Reagente Bloccante), agitandoli per 45 minuti a temperatura ambiente e incubati con lectina biotinilata (1:100 in TNB), agitando per una notte a temperatura ambiente. Successivamente, le sezioni, prima e dopo trattamento con biotinil-tyramide (reagente di amplificazione), sono state incubate con streptavidina coniugata all'enzima perossidasi di rafano (HRP) e il

segnale è stato visualizzato mediante trattamento per 30 secondi con il substrato cromogenico di-aminobenzidina (DAB). Infine, le sezioni sono state colorate con ematossilina ferrica di Groat, deidratate mediante passaggio in serie alcolica crescente, infine sottoposte a chiarificazione con Xilolo e ad una fase di montaggio mediante montante acquoso. Nell'area peri-infartuale e nell'area remota il numero dei vasi è stato valutato con il metodo morfometrico. La densità vascolare (numero di vasi per  $\text{mm}^2$ ) è stata valutata con il metodo planimetrico che prevede l'impiego di un reticolo-test inserito nell'oculare di un microscopio ottico. I capillari sono stati riconosciuti come strutture tubolari positive per la lectina.

### ***Analisi Statistica***

I dati continui sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard e confrontati mediante analisi ANOVA con correzione di Bonferroni. Per tutti i parametri, è stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### *L'assenza di SIAH2 previene la degradazione di AKAP121 e promuove la sopravvivenza cellulare dopo deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD)*

La nostra prima indagine è stata rivolta rivolta alla determinazione dei livelli proteici della proteina AKAP121 in condizioni basali e dopo 12 ore di deprivazione di ossigeno e glucosio. Saggi di immunoblotting hanno rivelato che in condizioni basali non esistevano differenze significative per quanto riguarda i livelli cellulari di AKAP121 tra MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup>, tuttavia dopo 12 ore di OGD i MEF SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una riduzione significativa della degradazione di AKAP121 (Arbitrary units Normossia WT: 1348 ± 238; SIAH2<sup>-/-</sup>: 1937 ± 202 ; ipossia WT: 977 ± 115 SIAH2<sup>-/-</sup>: 1709 ± 198 Figura 1A). Inoltre in assenza di SIAH2, dopo OGD, le cellule mostravano una significativa riduzione dei livelli di Caspasi 3 clivata (Arbitrary units Normossia WT: 745,5 ± 397,6; SIAH2<sup>-/-</sup>: 128,9 ± 421,3 ; ipossia WT: 13407,3 ± 378,9 SIAH2<sup>-/-</sup>: 5878,8 ± 636, Figura 2A) e un significativo incremento dei livelli p-Akt (Arbitrary units Normossia WT: 6244,2 ± 521; SIAH2<sup>-/-</sup>: 27681 ± 424 ; ipossia WT: 9946,3 ± 621 SIAH2<sup>-/-</sup>: 40228,2 ± 656 Figura 2B). Questi dati dimostrano che gli



aumentati livelli di AKAP121 potrebbero essere responsabili dell'aumentata sopravvivenza cellulare osservata dopo OGD nei MEF SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai WT.

### ***SIAH2 influenza l'attività mitocondriale dei MEF dopo OGD***

Mediante MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen) abbiamo valutato la produzione mitocondriale di anione superossido in condizioni basali e dopo 12 ore di ipossia. Nei MEF estratti dagli animali SIAH2<sup>-/-</sup> si è evidenziata una produzione di ROS significativamente ridotta rispetto ai MEF estratti dagli animali WT dopo stimolo ipossico. (Indice Medio di Fluorescenza, WT:  $588,2 \pm 43$ , SIAH2<sup>-/-</sup>:  $288,9 \pm 43$ ,  $p < 0.05$ , Figura 1C). Ulteriori conferme della preservata funzionalità mitocondriale derivano dai saggi TMRE ed MTT che hanno evidenziato una minore riduzione del potenziale elettrico trans membrana mitocondriale indotto da stress ipossico nei MEFs SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai MEFs WT (WT: -33 %, SIAH2<sup>-/-</sup>: -23 %,  $p < 0.05$ , Figura 1B) e un aumento dell'attività della deidrogenasi mitocondriale dei MEF SIAH2<sup>-/-</sup> (normossia WT:  $1,9 \pm 0,04$ ; SIAH2<sup>-/-</sup>:  $2 \pm 0,01$ ,  $p < 0.05$ , ipossia WT:  $0,9 \pm 0,02$ ; SIAH2<sup>-/-</sup>:  $1,5 \pm 0,02$ ,  $p < 0.05$  Figura 1D).

### ***Valutazione dell'apoptosi cellulare dopo stress ipossico mediante saggio TUNEL***

La colorazione delle cellule apoptotiche mediante saggio TUNEL, ha evidenziato un minore indice apoptotico delle cellule SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto alle cellule WT solo dopo 12 ore di OGD ma non in condizioni basali (normossia WT:  $1,9 \pm 0,21$  vs SIAH2<sup>-/-</sup>:  $1,8 \pm 0,19$ ; ipossia WT:  $12,8 \pm 0,32$  vs SIAH2<sup>-/-</sup>:  $6,7 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ , Figura 2C). Questo dato mette in relazione l'assenza della proteina SIAH2, lo stress ossidativo generato in condizioni di ipossia e l'apoptosi cellulare. Infatti nelle cellule prive del gene che codifica per la proteina SIAH2 si verifica una produzione di ROS statisticamente minore rispetto ai MEF WT.

### ***Valutazione del rimodellamento cardiaco e della performance cardiaca dopo infarto del miocardio***

E' stata valutata la risposta ipertrofica del miocardio nei topi infartuati rispetto ai topi SHAM mediante la determinazione del rapporto tra il peso del cuore (HW) ed il peso corporeo dell'animale (BW) (Tabella 2). Dopo 4 settimane di infarto i topi SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una ridotta ipertrofia cardiaca rispetto ai topi WT (WT:  $6,8 \pm 0,3$  vs SIAH2<sup>-/-</sup>  $5,3 \pm 0,4$ ; Figura 3C).

In tutti i gruppi sperimentali, la funzione cardiaca è stata valutata mediante ecocardiografia trans toracica, prima e dopo intervento chirurgico. Come atteso, le valutazioni ecocardiografiche hanno evidenziato una riduzione della performance cardiaca 4 settimane dopo infarto al miocardio in topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> (Tabella 2), in particolare è stata osservata una significativa riduzione della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro nei gruppi MI, rispetto ai gruppi SHAM. Sebbene in condizioni basali gli animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una frazione di accorciamento ventricolare simile (WT = 52,1 ± 0,1; SIAH2<sup>-/-</sup> = 50,1 ± 2,3 ), 4 settimane dopo infarto miocardico, gli animali privi del gene SIAH2 mostravano un aumento significativo della funzione ventricolare rispetto ai topi WT di riferimento (WT IMA 4 wk = 22,7 ± 2,4 ; SIAH2<sup>-/-</sup> IMA 4 wk = 37,3 ± 4, p<0,05, Figura 4A).

La valutazione dell'estensione dell'area infartuale, effettuata mediante colorazione dell'area fibrotica con Rosso Sirio su preparazioni allestite per analisi morfometriche, ha evidenziato significative differenze tra i due gruppi sperimentali. In particolare, dopo 4 settimane di infarto al miocardio, i cuori degli animali SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una riduzione significativa dell'area infartuale rispetto ai WT (% IS, WT: 27 ± 0,5; SIAH2<sup>-/-</sup>: 17 ± 0,2, p<0.05, Figura 3B). La colorazione con Evans blu-TTC delle sezioni del ventricolo di sinistra 24 ore dopo infarto al miocardio, ha

evidenziato che a parità di area a rischio (AAR), l'estensione della zona infartuata risultava minore nei topi SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai topi WT (%IA/AAR, WT: 60,8 ± 3,7; SIAH2<sup>-/-</sup>: 40,7 ± 2,3, p<0.05, e %AAR/LV, WT: 34,1 ± 2,9; SIAH2<sup>-/-</sup>: 39,8 ± 2,3, Figura 3A).

### ***Determinazione degli indici di sopravvivenza post-IMA***

Dopo la procedura di infarto miocardico, la sopravvivenza degli animali di entrambi i gruppi sperimentali è stata monitorata per circa 30 giorni. Come atteso, la sopravvivenza dei topi IMA era significativamente ridotta rispetto ai topi SHAM (p<0,05), ma sorprendentemente gli animali SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una sopravvivenza significativamente aumentata rispetto agli animali WT (% Sopravvivenza a 30 giorni WT : 43% versus SIAH2<sup>-/-</sup> : 52%; p<0.05; Figura 4B).

### ***Determinazione dell'indice apoptotico***

Per testare gli effetti dell'ischemia sulla sopravvivenza cellulare, abbiamo effettuato saggi TUNEL su sezioni cardiache di topi MI (SIAH2<sup>-/-</sup> e WT). Il nostro studio ha evidenziato una riduzione significativa del numero di cellule apoptotiche per sezione nei topi MI SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai topi MI WT (% Indice Apoptotico, WT: 2 ± 0,2; SIAH2<sup>-/-</sup>: 1,2 ± 0,1, p<0.05, Figura 5A ).

***Identificazione dei meccanismi molecolari del rimodellamento cardiaco post-ischemico mediante determinazione dei livelli proteici di AKAP 121***

Mediante immunoblotting sono stati valutati i livelli di AKAP 121 nel tessuto cardiaco degli animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> sottoposti ad infarto del miocardio e degli animali di controllo SHAM. Sebbene non sono state osservate differenze tra WT e SIAH2<sup>-/-</sup> nei lisati cardiaci di animali di controllo, dopo insulto ischemico, i cuori degli animali privi della proteina SIAH2 presentavano livelli elevati di espressione di AKAP 121 (Arbitrary units SHAM, WT: 1385,5 ± 88,5 ; SIAH2<sup>-/-</sup>: 1451 ± 128 ; MI WT: 20 ± 19 MI SIAH2<sup>-/-</sup> : 497 ± 175 p<0.05, Figura 6A). Dal punto di vista molecolare questi risultati spiegano la maggiore protezione al danno ischemico osservata nel miocardio dei topi MI SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai topi MI WT, suggerendo che gli elevati livelli di AKAP 121, responsabili della migliorata attività mitocondriale, promuovono la sopravvivenza cellulare dopo insulto ischemico riducendo così l'entità del rimodellamento cardiaco in questi animali. Questa ipotesi è stata confermata dal significativo incremento dell'area infartuata mostrata dai topi AKAP 121<sup>-/-</sup> a parità di area a rischio di topi SIAH2<sup>-/-</sup> e WT

(%IA/AAR AKAP121<sup>-/-</sup> : 83,5 ± 4,3 ; %AAR/LV: 49,2 ± 8,8, Figura 6B).

### ***Valutazione della densità dei capillari***

La valutazione della densità dei capillari, effettuata mediante metodo planimetrico che impiega lectina biotinilata, non ha evidenziato differenze tra cuori MI SIAH2<sup>-/-</sup> e cuori MI WT (Area Perinfartuata WT 1543 ± 32, SIAH2<sup>-/-</sup>: 1508 ± 77; Area Remota WT: 4020 ± 33, SIAH2<sup>-/-</sup>: 3678 ± 21, p<0.05, Figura 5B). Questo dato è molto interessante, in quanto esclude la possibilità che la protezione al danno ischemico del miocardio possa essere dovuta a una maggiore risposta angiogenica.

## DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato, per la prima volta, che l'assenza della proteina SIAH2, prevenendo la riduzione dei livelli cellulari di AKAP121, durante ischemia, migliora l'attività mitocondriale e riduce di conseguenza la produzione di ROS. In questo scenario ne deriva una migliore risposta al danno ischemico, evidenziata principalmente dalla riduzione dell'area infartuale che trova riscontro nell'aumento della percentuale di sopravvivenza degli animali SIAH2<sup>-/-</sup> dopo MI, nel miglioramento della funzione contrattile, e di conseguenza, nella riduzione dell'entità dello scompenso cardiaco. Questi dati suggeriscono che la proteina SIAH2 è selettivamente coinvolta nel rimodellamento cardiaco patologico post-ischemico.

Sebbene numerosi siano gli studi fino ad oggi realizzati su SIAH2, il ruolo di questa proteina nel muscolo cardiaco non è stato ancora chiarito.

I risultati del nostro studio dimostrano che la proteina SIAH2 svolge un ruolo centrale nella modulazione del rimodellamento cardiaco post-ischemico e nella progressione verso lo scompenso cardiaco. Tale ruolo dipende prevalentemente dalla capacità di SIAH2, durante ischemia, di modulare i livelli cellulari di

AKAP121 e di conseguenza la funzione mitocondriale. L'assenza dei geni Siah non comporta alterazione della normale crescita cellulare [27], infatti, in condizioni basali, non è stata osservata alcuna differenza nel fenotipo di topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dimostrando così che l'attività di questa proteina non è indispensabile per la fisiologia cellulare in condizioni di normossia.

Il regolatore principale della risposta cellulare all'ipossia è HIF-1 $\alpha$  che attiva la trascrizione di numerosi geni tra cui VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) e l'eritropoietina. Questi geni svolgono un ruolo chiave durante lo sviluppo e in processi fisiologici come l'angiogenesi, il rimodellamento vascolare, l'eritropoiesi, il trasporto di glucosio, la glicolisi, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. I livelli proteici di HIF-1 $\alpha$  sono regolati, a livello post traduzionale, dalle prolin idrossilasi PHD. In condizioni di normossia, l'idrossilazione di HIF-1 $\alpha$  da parte di PHD2 promuove il legame di HIF-1 $\alpha$  al complesso di Von-Hippel-Lindau e la rapida degradazione da parte del complesso Ubiquitina-proteasoma [28, 29]. Durante ipossia avviene l'induzione dell'espressione della proteina E3 ubiquitina ligasi SIAH2, che grazie al suo dominio a dita ad anello media il trasferimento dei monomeri di Ubiquitina su PHD1/3, contribuendo, insieme ad altre E3 ubiquitina ligasi (SIAH1a), alla degradazione proteasomica delle PHD [20], di conseguenza, HIF-1 $\alpha$  non viene



degradato ed è in grado di attivare la trascrizione di geni indotti dall'ipossia [20, 30]. Sebbene durante le prime 3 ore di ipossia SIAH2 sembra essere il principale responsabile della degradazione di PHD3, dopo 4 ore di ipossia, cellule SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano livelli di PHD3 ridotti dimostrando così che SIAH2 non è la sola E3 ubiquitina ligasi responsabile della degradazione di PHD3 [20]. Questo studio punta l'attenzione su un altro meccanismo cellulare di adattamento fisiologico alla deprivazione di ossigeno che coinvolge la regolazione a livello post-traduzionale di componenti del pathway di trasduzione del segnale che controlla la respirazione ossidativa. SIAH2 induce l'ubiquitazione e la degradazione proteasoma-dipendente della proteina di ancoraggio mitocondriale AKAP121, diminuendo così l'attività basale della respirazione mitocondriale nelle cellule dopo ipossia. Infatti in cellule ipossiche over-esprimenti SIAH2, la degradazione di AKAP121 era accompagnata da una significativa riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) e dell'attività metabolica mitocondriale [21]. Dato il ruolo di questa proteina nella fisiologia mitocondriale, cambiamenti dei livelli proteici di AKAP121 nella cellula potrebbero avere un impatto maggiore sulla trasmissione del segnale PKA nel microambiente mitocondriale [31]. AKAP 121 legando PKA e src sulla membrana mitocondriale esterna controlla la respirazione mitocondriale e amplifica il signaling cAMP [32].

Inoltre PKA fosforila e inattiva la proteina pro-apoptotica BAD, bloccando il legame con Bcl-2 e inibendo così l'apoptosi cellulare [33]. Recentemente è stato dimostrato che AKAP121 regola la risposta allo stress nei cardiomiociti e che la down regolazione di questa proteina potrebbe contribuire allo sviluppo di disfunzioni cardiache [34].

Con la respirazione mitocondriale, la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad anidride carbonica ed acqua, ricavandone energia. Esistono dati indicativi di un'alterata funzione mitocondriale nello scompenso, con riduzione dell'attività degli enzimi della catena respiratoria e del contenuto mitocondriale in citocromo-A [35].

I mitocondri giocano un ruolo essenziale nella fisiopatologia e nella progressione dello scompenso cardiaco e degli eventi di rimodellamento attraverso la regolazione dei pathways di ossido-riduzione e della risposta allo stress in seguito alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), che esplicano il loro effetto dannoso a livello cellulare e tissutale. La generazione mitocondriale di ROS può provocare notevoli danni ossidativi a macromolecole come proteine, DNA e lipidi che hanno come conseguenza l'apoptosi, innescata dalla perdita del potenziale di membrana interno, l'alterazione del flusso intracellulare del  $Ca^{2+}$  e la disfunzione bioenergetica e contrattile dei cardiomiociti [36].

Con il presente studio abbiamo dimostrato l'importante ruolo della proteina SIAH2 nel muscolo cardiaco dopo infarto miocardico acuto, nonché il suo coinvolgimento nello sviluppo e nella progressione verso lo scompenso cardiaco. Nel nostro modello di infarto miocardico acuto, tutti gli animali hanno mostrato un deterioramento della funzione di pompa cardiaca 4 settimane dopo infarto miocardico, tuttavia tale peggioramento era statisticamente minore negli animali SIAH2<sup>-/-</sup>. Gli esami ecocardiografici e le indagini istologiche hanno dimostrato che l'assenza della proteina SIAH2 riduceva il rimodellamento e la disfunzione cardiaca 4 settimane dopo infarto al miocardio. Inoltre, i topi SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una minore tendenza alla risposta ipertrofica cardiaca evidenziata dalla significativa riduzione del rapporto tra il peso del cuore ed il peso del corpo dell'animale (HW/BW). Sebbene non siano state riscontrate differenze tra i due gruppi per quanto riguarda l'area a rischio, mediante colorazione con Evans blu-TTC, i cuori dei topi SIAH2<sup>-/-</sup> mostravano una minore estensione dell'area infartuale rispetto ai WT, sia a 24 ore che dopo 4 settimane di infarto come dimostrano gli esami istologici di preparazioni allestite con colorazione Rosso Sirio. Inoltre gli animali privi del gene AKAP121, 24 dopo MI, mostravano un significativo incremento della percentuale di area infartuale rispetto ai topi SIAH2<sup>-/-</sup> e WT.

La riduzione dell'entità dello scompenso cardiaco negli animali SIAH2<sup>-/-</sup> potrebbe essere la conseguenza della preservata attività mitocondriale per merito della ridotta degradazione della proteina di ancoraggio mitocondriale AKAP121. Come risultato si osserva un minore stress ossidativo indotto dal danno ischemico, con conseguente riduzione dell'apoptosi cellulare; questa ipotesi è dimostrata, infatti, dal saggio TUNEL e dall'immunoblotting per AKAP 121, su sezioni cardiache di topi MI. Inoltre, dati in vitro su fibroblasti embrionali murini (MEF) sottoposti a ipossia hanno evidenziato una riduzione significativa della produzione di ROS nei MEF estratti dai topi SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai topi WT. Tuttavia, le indagini istologiche effettuate su sezioni di cuore dopo 4 settimane di infarto non hanno rivelato differenze per quanto riguarda la densità dei capillari tra animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup>. Questo dato suggerisce che la riduzione dell'entità del rimodellamento cardiaco dopo 4 settimane di infarto, che caratterizza gli animali SIAH2<sup>-/-</sup>, non dipende dal pathway HIF-1 $\alpha$ -dipendente, probabilmente perché durante ischemia cronica altre E3 ubiquitina ligasi, come SIAH1a, potrebbero contribuire alla degradazione di PHD3 e normalizzare quindi l'espressione di HIF-1 $\alpha$ . Il modello in vitro è servito a definire la patogenesi del miglioramento della funzione contrattile dopo MI negli animali SIAH2<sup>-/-</sup>. Lo stress ipossico induce una minore disfunzione mitocondriale nei MEF SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai MEF

WT, come dimostrato dalla minore riduzione del potenziale di membrana mitocondriale. Questo fenomeno è associato ad una aumentata vitalità e proliferazione dei MEF estratti dai topi SIAH2<sup>-/-</sup> rispetto ai MEF WT, verosimilmente come conseguenza della migliorata adattabilità allo stress ipossico in assenza della proteina SIAH2.

Concludendo, l'attivazione trascrizione del gene Siah2 durante ipossia rappresenta un'importante indizio sul potenziale coinvolgimento di questa proteina nella regolazione della risposta ischemica. Questo studio, insieme ai dati forniti dalla letteratura, ha dimostrato che, durante ischemia, SIAH2 regola la funzione mitocondriale modulando la degradazione proteasoma dipendente della proteina di ancoraggio mitocondriale AKAP121. Nell'ottica in cui il deficit energetico e lo stress ossidativo svolgono un ruolo centrale nello scompenso cardiaco, il nostro studio individua SIAH2 come nuovo importante target di strategie terapeutiche per l'infarto miocardico acuto e lo scompenso cardiaco.

## Tabella 1. Substrati di SIAH2

Categoria di substrato	Proteina che interagisce con SIAH	Degradazione	Ruolo conosciuto	Referenza
Regolazione trascrizionale	N-CoR	Si	La degradazione inibisce l'inibizione trascrizionale da parte di N-CoR	[37]
	C-Myb	Si	La degradazione è indotta dalla segnalazione da parte di p53 e down regola HSP	[38]
	BOB-1/OB-1	Si	Trascrizione in cellule B	[39, 40]
	PML	Si	La sua degradazione sopprime la trascrizione mediata dalla forma oncogenica	[41]
	CtIP	Si	Interazione e degradazione. Induce p21 indipendentemente dalla sua degradazione	[42]
	TIEG-1	Si	Regolazione della trascrizione su stimolo TGF- $\beta$	[43]
Enzimi	A-chetoglutarato deidrogenasi	Si	Enzima coinvolto nel ciclo di Krebs, aumentata attività in cellule prive di SIAH	[44]
	PHD	Si	Regolazione dell'espressione di HIF-1 $\alpha$ attraverso l'idrossilazione delle proline	[20]
	FIH	Si	Regolazione dell'attività trascrizionale di HIF-1 $\alpha$ attraverso l'idrossilazione delle asparagine	[45]
Cancro	$\beta$ -catenina	Si	Fattore trascrizionale mutato in molteplici forme di cancro	[46]
	DCC	Si	Interazione e co-localizzazione con SIAH nelle cellule	[30]
Neuronale	AF4	Si	La perdita della sua degradazione aumenta la trascrizione	[47, 48]
	$\alpha$ -sinucleina	Si/No	Interazione e monoubiquitinata da SIAH2 in vitro	[41]
	Sinfilina-1	Si	Interazione con SIAH e degradazione, aumenta il rilascio di dopamina	[41, 42]
	Sinaptofisina	Si	Co-localizza con SIAH	[49]
	Recettore glutammato Gruppo 1	Si	La forma lunga di splicing di mGluR1 è down regolata	[50]
Altri	Peg3/Pw1	Si	Funziona in cooperazione a SIAH per indurre morte cellulare	[51]
	Kid	Si	La sua degradazione altera la mitosi	[52]
	Numb	Si	La degradazione di Numb porta a un incremento del segnale Notch	[53]
	T-STAR	Si	La degradazione modula lo splicing alternativo	[54]
	Tramtrack	Si	Repressore trascrizionale coinvolto nello sviluppo dell'occhio di Drosophila	[16, 55]

<b>Categoria di substrato</b>	<b>Proteina che interagisce con SIAH</b>	<b>Degradazione</b>	<b>Ruolo conosciuto</b>	<b>Referenza</b>
	$\alpha$ -tubulina	No	Proteina del citoscheletro	[52]
	pAPC	No	Inclusa nel complesso di degradazione della $\beta$ -catenina	[46, 56]
	Ubc H5	No	Componente E2 delle proteine di ubiquitinazione	[46]
	Vav	No	Proteina di scambio Rac1-GDP/GTP, la sua attività è inibita da SIAH	[57]
	BAG-1	No	Proteina di legame Hsp70 coinvolta nella proliferazione, morte e migrazione cellulare	[58]
	Dab-1	No	Interazione e inibizione dell'attività di SIAH	[59]
	Peg10	No	Interazione con SIAH, l'overespressione di PEG10 sopprime l'apoptosi	[60]
	Phyllopod	No	Proteina adattatore richiesta per la degradazione di tramtrack da parte di SIAH	[61]
	Spry2	Si	Mancata inibizione di ERK FGF-dipendente	[62]
	AKAP121	Si	Riduzione della funzione mitocondriale	[21]

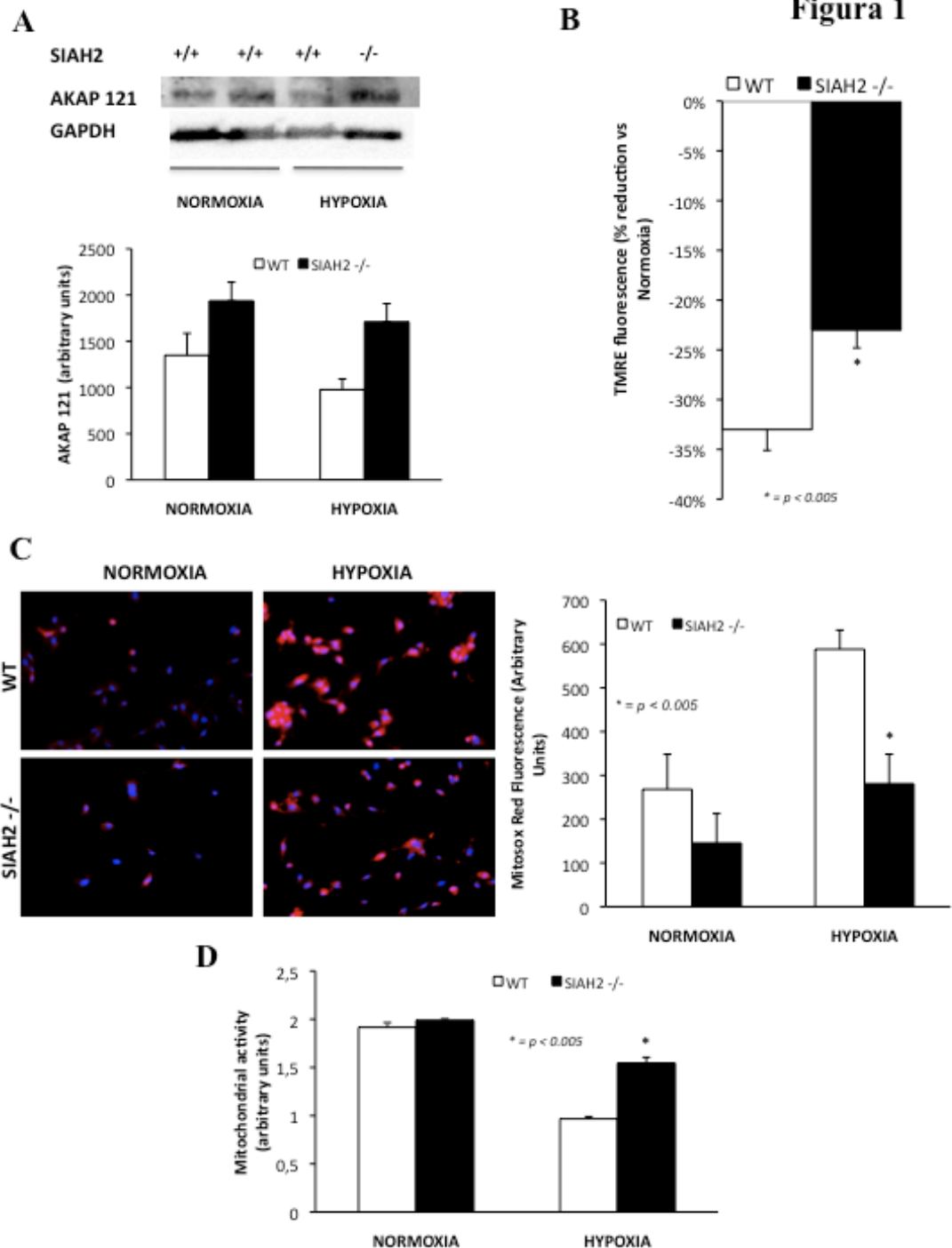
BOB-1, proteina di legame a Oct 1 delle cellule B; OBF1, fattore di legame a Oct 1; PML, proteina delle leucemia promielocitica; CtIP, proteina di legame C-terminale (CtBP) proteina interagente; TIEG-1, gene precocemente inducibile da TGF $\beta$ 1; FIH, fattore inibente HIF; AF4, gene della leucemia linfoblastica acuta 1 fusa dal cromosoma 4; Peg, gene espresso paternamente; Kid, proteina di legame al DNA kinesina-simile; T-STAR, trasduzione del segnale al testicolo e attivazione dell'RNA; BAG, atanogene associato a Bcl-2; Dab, disabled.

**Tabella 2. Parametri morfometrici ed ecocardiografici dei gruppi sperimentali**

	SHAM		MI	
	WT (n = 11)	SIAH2 <sup>-/-</sup> (n = 12)	WT (n = 30)	SIAH2 <sup>-/-</sup> (n = 28)
<b>Morfometria</b>				
<b>BW (g)</b>	26 ± 0,3	26 ± 0,6	27,9 ± 2,2	21,2 ± 0,7
<b>HW (mg)</b>	105 ± 0,7	101 ± 0,5	195,4 ± 34,3 *	112,7 ± 7,1 **
<b>HW/BW (mg/g)</b>	3,8 ± 0,02	3,7 ± 0,05	7 ± 0,9 *	5,3 ± 0,4 **
<b>Ecocardiografia</b>				
<b>LVEDD (mm)</b>	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,8 ± 0,3 *	3,5 ± 0,2 **
<b>LVESD (mm)</b>	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	3,8 ± 0,3 *	2,4 ± 0,3 **
<b>FS (%)</b>	52,2 ± 1,1	50,1 ± 2,3	22,7 ± 2,4 *	34,8 ± 4 **
<b>IVSd (mm)</b>	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,04	0,9 ± 0,08	0,7 ± 0,5
<b>PWD (mm)</b>	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,05	0,9 ± 0,04	0,7 ± 0,4
<b>HR (bpm)</b>	474,7 ± 18	468,1 ± 22,6	408 ± 27,2	423,5 ± 22,1

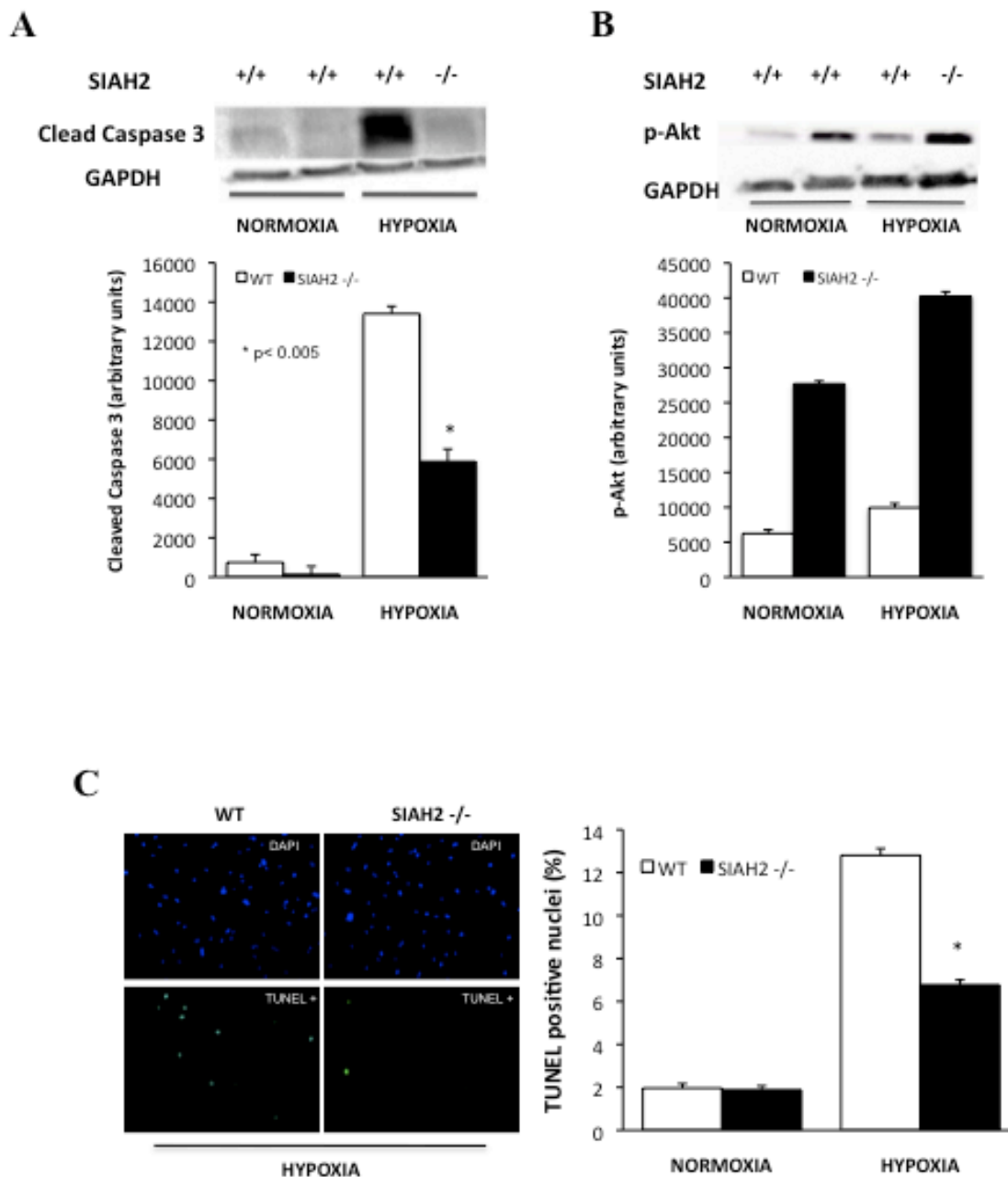
BW: peso corporeo, g; HW: peso del cuore, mg; LVEDD: diametro telediastolico, mm; LVESD: diametro telesistolico, mm; FS: frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (fractional shortening, FS= LVEDD-LVESD/LVEDD), %; IVSd: spessore del setto interventricolare, mm; PWD: spessore della parete posteriore, mm; HR: frequenza cardiaca, bpm; (\* $p < 0.05$  vs SHAM, \*\* $p < 0.05$  vs SHAM e WT IMA).





**SIAH2 regola i livelli di AKAP 121 e la funzione mitocondriale.**

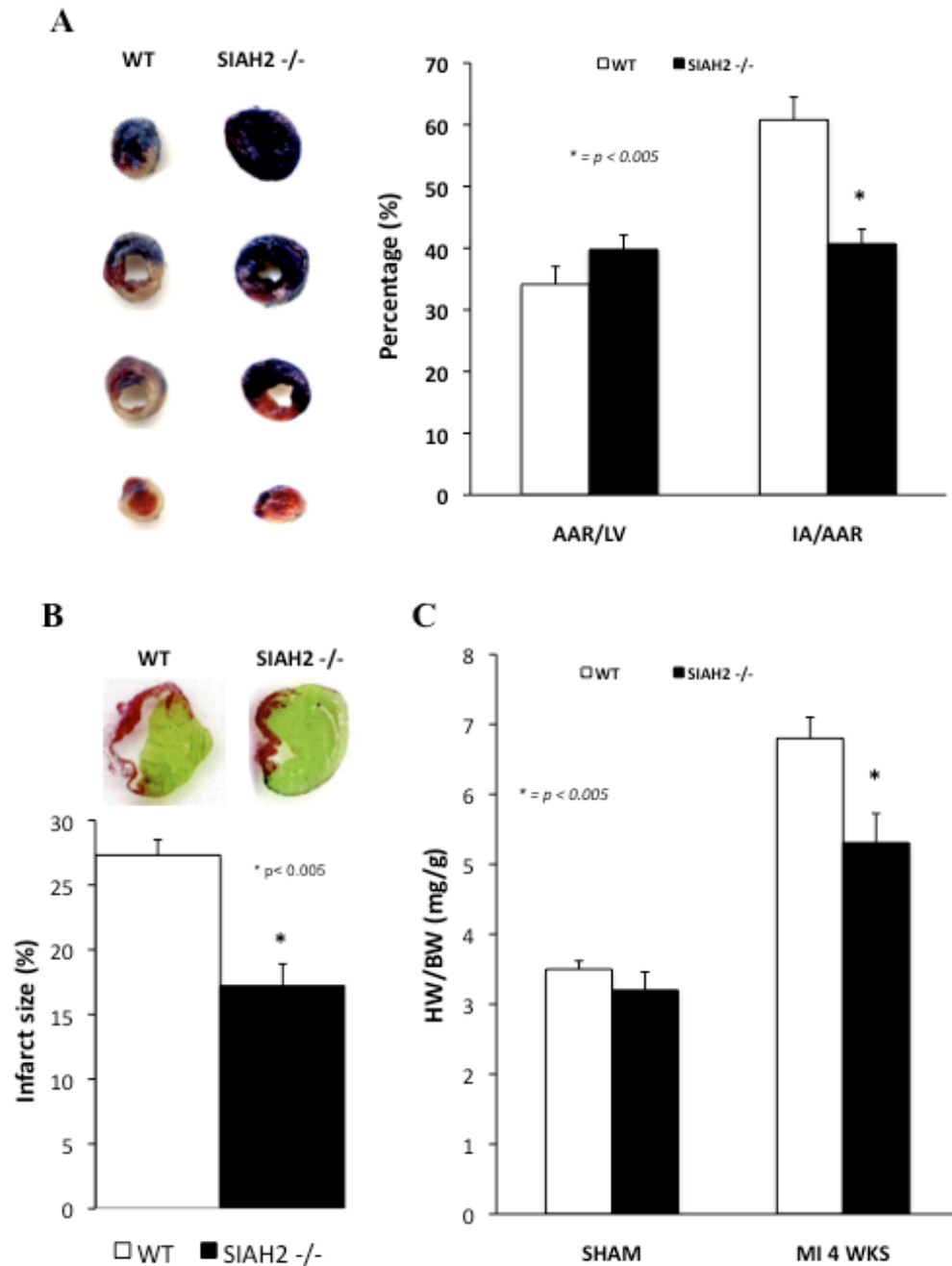
(A) Immunoblot rappresentativo (sopra) e analisi densitometrica (sotto) per valutare i livelli di AKAP 121 in MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni di normossia e dopo 12 ore di ipossia. (B) Potenziale di membrana mitocondriale misurato in cellule WT e SIAH2<sup>-/-</sup> misurato come riduzione in percentuale rispetto la normossia della fluorescenza della sonda TMRE. (C) Immagini rappresentative della produzione di ROS di origine Mitocondriale (sinistra) e quantizzazione della fluorescenza (destra) nei MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni basali e dopo 12 ore di ipossia. (D) Valutazione dell'attività mitocondriale mediante saggio MTT in MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni basali e dopo ipossia. (\* $p < 0.05$  vs WT HYPOXIA)



**I livelli di SIAH2 modulano la sopravvivenza cellulare dopo ipossia.**

(A) Immunoblot rappresentativo (sopra) e quantizzazione densitometrica per valutare i livelli proteici di Caspasi 3 clivata nei MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni di normossia e dopo 12 ore di ipossia. (B) Immunoblot rappresentativo (sopra) e quantizzazione densitometrica per valutare i livelli proteici di pAkt nei MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni di normossia e dopo 12 ore di ipossia. (C) Immagini rappresentative (sinistra) e quantizzazione (destra) della percentuale di apoptosi cellulare in MEF WT e SIAH2<sup>-/-</sup> in condizioni di normossia e dopo 12 ore di ipossia. (\* $p < 0.05$  vs WT HYPOXIA)

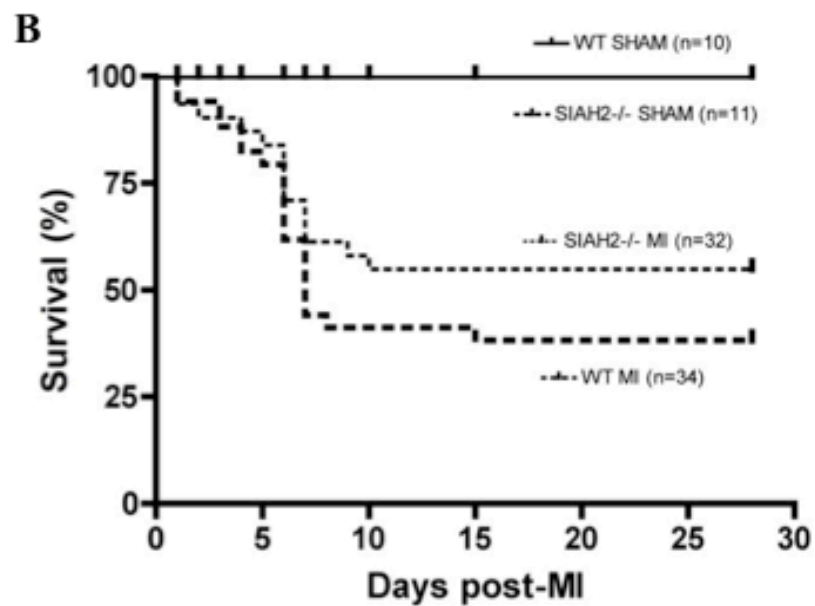
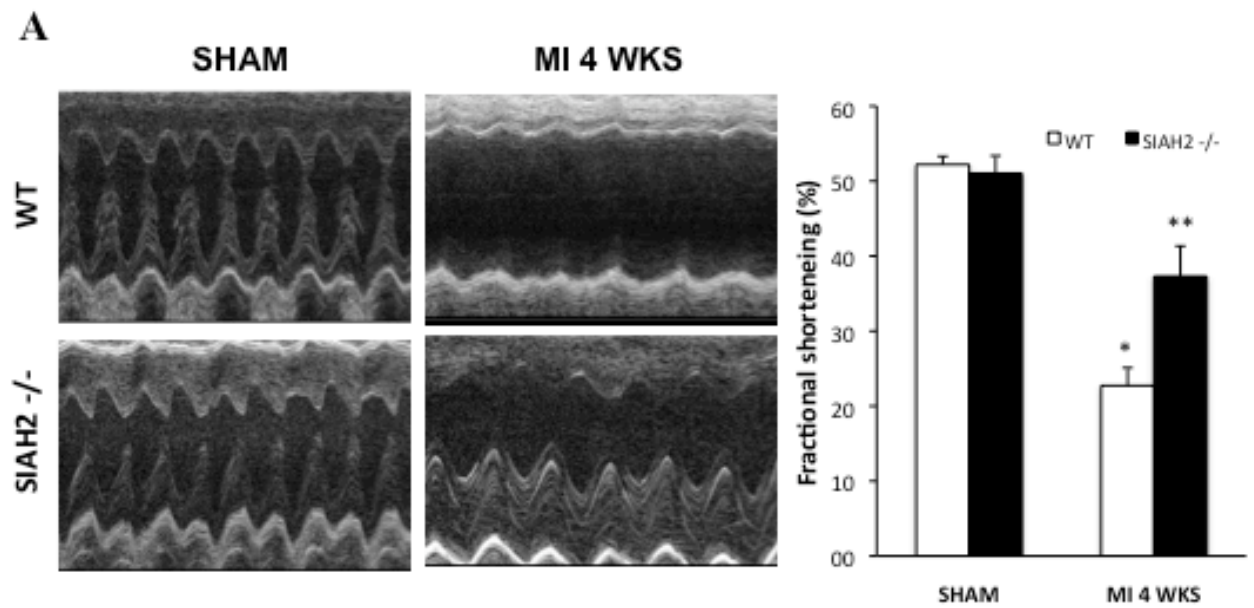
**Figura 3**



**La delezione di SIAH2 riduce l'infarct size e l'entità del rimodellamento cardiaco**

(A) Immagini rappresentative di cuori di topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dopo 24 di MI colorati con la tecnica Evans blu-TTC (sinistra) e quantizzazione della percentuale di AAR e IS (destra). (B) Colorazione con Sirius Red su cuori di animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dopo 4 settimane di MI per determinare l'estensione dell'area infartuale. (C) Valutazione dell'ipertrofia cardiaca mediante determinazione el rapporto tra peso del cuore e peso del corpo di animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dopo 4 settimane di MI. (\* $p < 0.05$  vs WT MI)

**Figura 4**

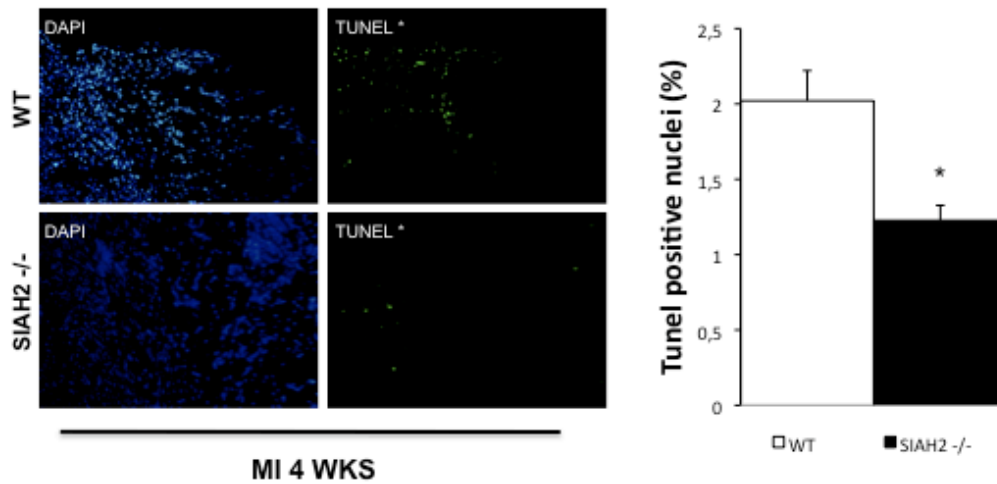


**L'assenza di SIAH2 migliora la contrattilità cardiaca e aumenta la sopravvivenza degli animali dopo MI**

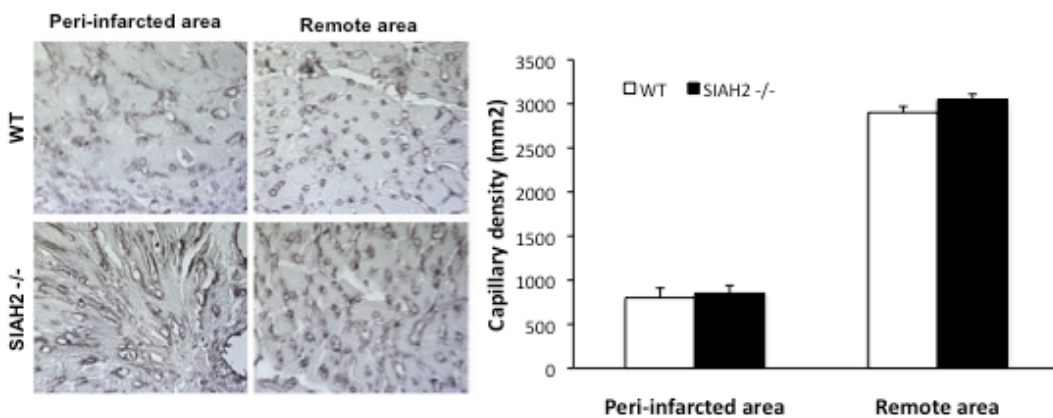
(A) Ecocardiografia trans-toracica (sopra) e frazione di accorciamento ventricolare (sotto) in topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> SHAM e 4 settimane dopo MI. (B) Percentuale di sopravvivenza di animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> durante 4 settimane di MI. (\* $p < 0.05$  vs SHAM; \*\* $p < 0.05$  vs WT MI)

Figura 5

A



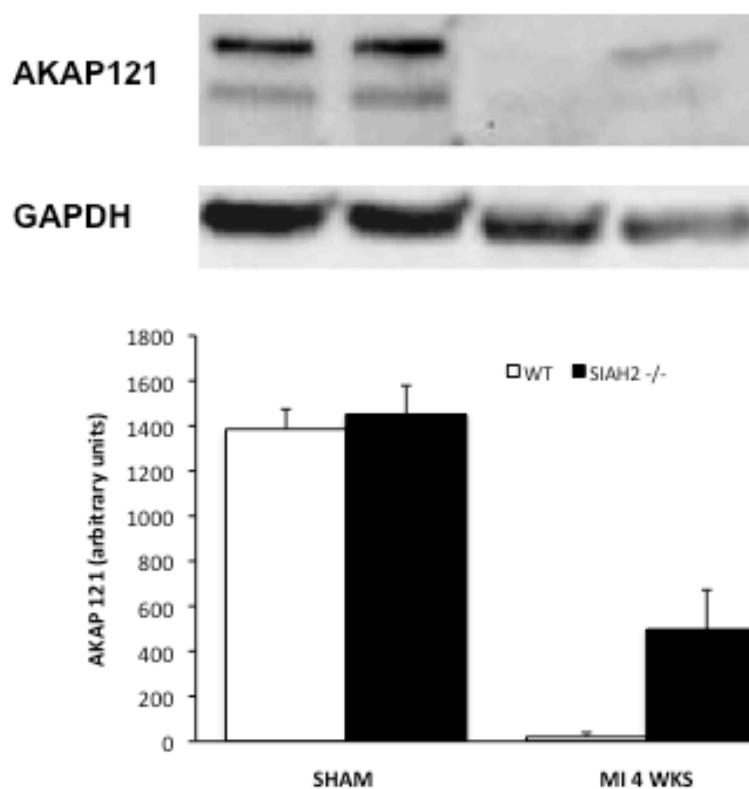
B



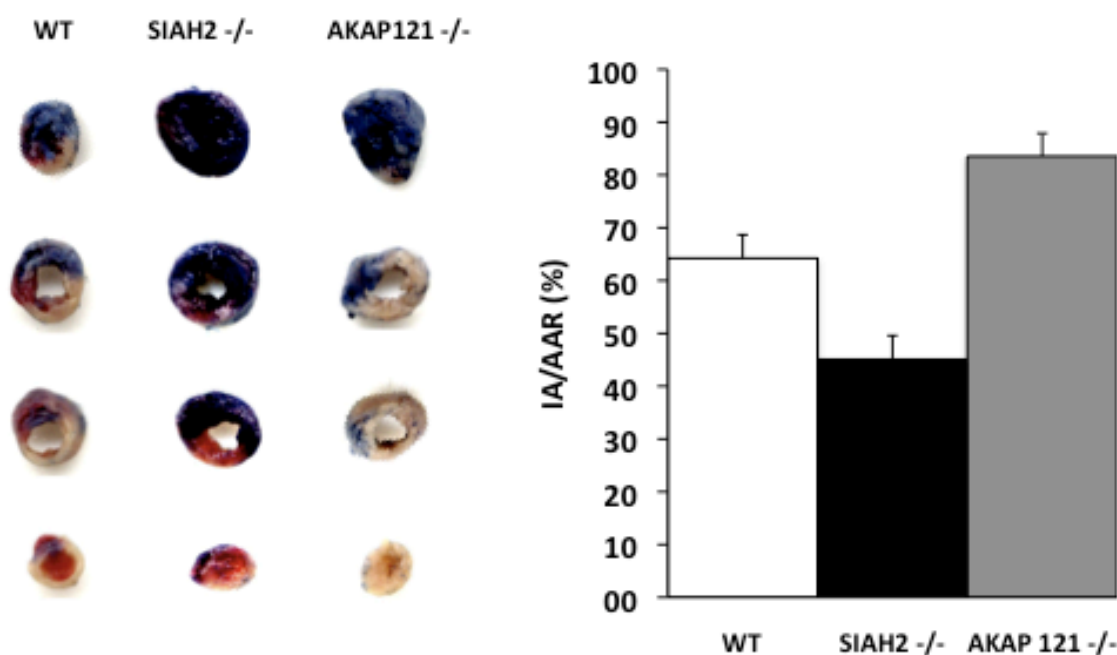
### SIAH2 regola l'apoptosi ma non la densità dei capillari nel cuore dopo MI

(A) Immagini rappresentative del saggio TUNEL (sinistra) e percentuale di apoptosi su sezioni di ventricolo in topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dopo 4 settimane di MI. (B) Densità dei capillari nell'area peri-infartuale e remota di sezioni di ventricolo di animali WT e SIAH2<sup>-/-</sup> 4 settimane dopo MI. (\* $p < 0.05$  vs WT MI)

A



B



**Livelli di AKAP 121 dopo MI e area infartuale in topi AKAP 121<sup>-/-</sup>.**

(A) Immunoblot rappresentativo (sopra) e quantizzazione densitometrica per valutare i livelli proteici di AKAP 121 nei cuori di topi WT e SIAH2<sup>-/-</sup> dopo 4 settimane di infarto. (B) Immagini rappresentative di cuori di topi WT, SIAH2<sup>-/-</sup> e AKAP 121<sup>-/-</sup> dopo 24 di MI colorati con la tecnica Evans blu-TTC (sinistra) e quantizzazione della percentuale di AAR e IS (destra).

## BIBLIOGRAFIA

1. *Poole-Wilson, P.A., Chronic heart failure. Timely Top Med Cardiovasc Dis, 2007. 11: p. E2.*
2. *Cowie, M.R., et al., Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. Eur Heart J, 1999. 20(6): p. 421-8.*
3. *Rosamond, W., et al., Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation, 2007. 115(5): p. e69-171.*
4. *Gaudron, P., et al., Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. Circulation, 1993. 87(3): p. 755-63.*
5. *Katz, A.M., Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. N Engl J Med, 1990. 322(2): p. 100-10.*
6. *Laskowski, K.R. and R.R. Russell, 3rd, Uncoupling proteins in heart failure. Curr Heart Fail Rep, 2008. 5(2): p. 75-9.*
7. *Buchwald, A., et al., Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. Eur Heart J, 1990. 11(6): p. 509-16.*
8. *Abunasra, H.J., et al., Efficacy of adenoviral gene transfer with manganese superoxide dismutase and endothelial nitric oxide synthase in reducing ischemia and reperfusion injury. Eur J Cardiothorac Surg, 2001. 20(1): p. 153-8.*
9. *Florea, V.G. and I.S. Anand, Predicting survival in heart failure. Curr Cardiol Rep, 2007. 9(3): p. 209-17.*

10. Lahiri, S., et al., *Oxygen sensing in the body. Prog Biophys Mol Biol*, 2006. 91(3): p. 249-86.
11. Alarcon, R., et al., *Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. Cancer Res*, 1999. 59(24): p. 6046-51.
12. Taylor, C.T., et al., *Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 12091-6.
13. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system. Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 425-79.
14. Schnell, J.D. and L. Hicke, *Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. J Biol Chem*, 2003. 278(38): p. 35857-60.
15. Genbacev, O., et al., *Regulation of human placental development by oxygen tension. Science*, 1997. 277(5332): p. 1669-72.
16. Tang, A.H., et al., *PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. Cell*, 1997. 90(3): p. 459-67.
17. Della, N.G., P.V. Senior, and D.D. Bowtell, *Isolation and characterisation of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina). Development*, 1993. 117(4): p. 1333-43.
18. Reed, J.C. and K.R. Ely, *Degrading liaisons: Siah structure revealed. Nat Struct Biol*, 2002. 9(1): p. 8-10.
19. Frew, I.J., et al., *Generation and analysis of Siah2 mutant mice. Mol Cell Biol*, 2003. 23(24): p. 9150-61.



20. Nakayama, K., et al., *Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. Cell, 2004. 117(7): p. 941-52.*
21. Carlucci, A., et al., *Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during cellular hypoxia and brain ischaemia. EMBO J, 2008. 27(7): p. 1073-84.*
22. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J Cell Biol, 1963. 17: p. 299-313.*
23. Chavez, J.C., et al., *The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. J Neurosci, 2006. 26(37): p. 9471-81.*
24. Liu, B., et al., *Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. J Neurosci, 2006. 26(20): p. 5309-19.*
25. Smith, R.S., Jr., et al., *Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. Life Sci, 2005. 76(21): p. 2457-71.*
26. Kurrelmeyer, K.M., et al., *Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5456-61.*
27. Frew, I.J., et al., *Normal p53 function in primary cells deficient for Siah genes. Mol Cell Biol, 2002. 22(23): p. 8155-64.*

28. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(17): p. 9630-5.*
29. Berra, E., et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J, 2003. 22(16): p. 4082-90.*
30. Hu, G., et al., *Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev, 1997. 11(20): p. 2701-14.*
31. Feliciello, A., M.E. Gottesman, and E.V. Avvedimento, *cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. Cell Signal, 2005. 17(3): p. 279-87.*
32. Affaitati, A., et al., *Essential role of A-kinase anchor protein 121 for cAMP signaling to mitochondria. J Biol Chem, 2003. 278(6): p. 4286-94.*
33. Harada, H., et al., *Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. Mol Cell, 1999. 3(4): p. 413-22.*
34. Perrino, C., et al., *AKAP121 downregulation impairs protective cAMP signals, promotes mitochondrial dysfunction, and increases oxidative stress. Cardiovasc Res, 2010. 88(1): p. 101-10.*
35. Maack, C., et al., *Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. Circulation, 2003. 108(13): p. 1567-74.*
36. Archer, S.L., et al., *Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O2-sensing pathway at*

- the intersection of pulmonary hypertension and cancer. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(2): p. H570-8.*
37. Zhang, J., et al., *Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. Genes Dev, 1998. 12(12): p. 1775-80.*
  38. Tanikawa, J., et al., *p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. J Biol Chem, 2000. 275(20): p. 15578-85.*
  39. Boehm, J., et al., *Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. EMBO J, 2001. 20(15): p. 4153-62.*
  40. Tiedt, R., et al., *The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. EMBO J, 2001. 20(15): p. 4143-52.*
  41. Fanelli, M., et al., *The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. J Biol Chem, 2004. 279(7): p. 5374-9.*
  42. Germani, A., et al., *SIAH-1 interacts with CtIP and promotes its degradation by the proteasome pathway. Oncogene, 2003. 22(55): p. 8845-51.*
  43. Johnsen, S.A., et al., *Modulation of transforming growth factor beta (TGFbeta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGFbeta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. J Biol Chem, 2002. 277(34): p. 30754-9.*
  44. Habelhah, H., et al., *Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. J Biol Chem, 2004. 279(51): p. 53782-8.*

45. Fukuba, H., et al., Abundance of asparaginyl-hydroxylase FIH is regulated by Siah-1 under normoxic conditions. *Neurosci Lett*, 2008. 433(3): p. 209-14.
46. Matsuzawa, S.I. and J.C. Reed, Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*, 2001. 7(5): p. 915-26.
47. Bursen, A., et al., Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene*, 2004. 23(37): p. 6237-49.
48. Oliver, P.L., et al., Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(41): p. 14901-6.
49. Wheeler, T.C., et al., Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol Chem*, 2002. 277(12): p. 10273-82.
50. Moriyoshi, K., et al., Seven in absentia homolog 1A mediates ubiquitination and degradation of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(23): p. 8614-9.
51. Relaix, F., et al., Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(5): p. 2105-10.
52. Germani, A., et al., SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene*, 2000. 19(52): p. 5997-6006.
53. Susini, L., et al., Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 15067-72.

54. Venables, J.P., et al., *SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome. Hum Mol Genet, 2004. 13(14): p. 1525-34.*
55. Li, S., et al., *Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. Cell, 1997. 90(3): p. 469-78.*
56. Liu, J., et al., *Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. Mol Cell, 2001. 7(5): p. 927-36.*
57. Germani, A., et al., *hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. Mol Cell Biol, 1999. 19(5): p. 3798-807.*
58. Matsuzawa, S., et al., *p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. EMBO J, 1998. 17(10): p. 2736-47.*
59. Park, T.J., et al., *Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 302(4): p. 671-8.*
60. Okabe, H., et al., *Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. Cancer Res, 2003. 63(12): p. 3043-8.*
61. Li, S., C. Xu, and R.W. Carthew, *Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sina ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack. Mol Cell Biol, 2002. 22(19): p. 6854-65.*
62. Nadeau, R.J., et al., *Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. J Cell Biochem, 2007. 100(1): p. 151-60.*

