

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

Ruolo cardioprotettivo della Protimosina Alfa

TUTOR

Ch.mo

Prof. Giovanni Esposito

CANDIDATO

Dott. Alessandro Cannavo

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	PAG. 4
2.SCOPO DELLO STUDIO.....	PAG. 9
3.MATERIALI E METODI.....	PAG. 11
3.1 ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO.....	PAG. 12
3.2 MODELLO MURINO D'INFARTO MIOCARDICO....	PAG. 12
3.3 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORACICA NEI TOPI ALLO STATO CONSCIO.....	PAG. 13
3.4 VALUTAZIONI ISTOLOGICHE	PAG. 13
3.5 VALUTAZIONE DELL'ESTENSIONE DELL'AREA INFARTUATA E DELLA FIBROSI.....	PAG. 13
3.6 VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE DELLA PROTIMOSINA ALPHA NEL TESSUTO CARDIACO MEDIANTE COLORAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA.....	PAG. 14
3.7 COLTURE PRIMARIE DI CARDIOMIOCITI NEONATALI DI RATTO.....	PAG. 15
3.8 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE.....	PAG. 16
3.9 RT-PCR.....	PAG. 17
3.10 Real-Time PCR.....	PAG. 18
3.11 CLONAGGIO DELLA PROTIMOSINA RICOMBINANTE.....	PAG. 18

3.12 MINIPREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO...	PAG. 20
3.13 MAXIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO.....	PAG. 21
3.14 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLA PT α RICOMBINANTE.....	PAG. 22
3.15 ISCHEMIA E ISCHEMIA/RIPERFUSIONE <i>IN</i> <i>VITRO</i>	PAG. 25
3.16 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTT (<i>BROMURO DI</i> <i>3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-</i> <i>DIFENILTETRAZOLIO</i>	PAG. 26
3.17 VALUTAZIONE DELLA NECROSI E DELL'APOPTOSI CELLULARE MEDIANTE MARCATURA CON IODURO DI PROPIDIO (PI) E MARCATURA CON ANNESSINA V.....	PAG. 27
3.18 VALUTAZIONE MEDIANTE IMMUNOBLOTTING DEI LIVELLI DI PT α ALPHA, pAKT, CASPASI-3 CLIVATA E pERK 1/2.....	PAG. 28
3.19 ANALISI STATISTICHE.....	PAG. 29
4.RISULTATI.....	PAG. 30
4.1 VALUTAZIONE DELL'ESTENSIONE DELL'AREA INFARTUALE E DELLA PERFORMANCE CARDIACA MEDIANTE ECOCARDIOGRAFIA NEI VARI GRUPPI SPERIMENTALI.....	PAG. 31

4.2 ALTERAZIONE <i>IN VIVO</i> DEI LIVELLI DI SECREZIONE E DI ESPRESSIONE DELLA PROTIMOSINA ALPHA DURANTE INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO (IMA).....	PAG. 31
4.3 ALTERAZIONE <i>IN VITRO</i> DEI LIVELLI DI SECREZIONE E DI ESPRESSIONE DELLA PT α DURANTE ISCHEMIA ED ISCHEMIA RIPERFUSIONE	PAG. 32
4.4 RUOLO CARDIOPROTETTIVO IN VITRO DELLA PT α	PAG. 32
4.5 MECCANISMO INTRACELLULARE CARDIOPROTETTIVO DELLA PT α	PAG. 33
5.DISCUSSIONE.....	PAG. 35
6.BIBLIOGRAFIA.....	PAG. 38
7.FIGURE.....	PAG. 45
8.LEGENDA ALLE FIGURE.....	PAG. 53

1.INTRODUZIONE

L'occlusione trombotica di una arteria coronaria provoca l'infarto acuto del miocardio, che è la principale causa di morbilità e mortalità nelle società occidentali. Nella regione in cui è presente l'arteria coronaria occlusa, i cardiomiociti vanno incontro ad una massiva morte cellulare, sia per necrosi che per apoptosi, contribuendo così al declino funzionale del miocardio (1, 2, 3, 4, 5). Molti pazienti con infarto di dimensioni moderate riescono a recuperare dall' infarto cardiaco, mentre quelli con infarti di grandi dimensioni piuttosto progrediscono verso lo scompenso a causa del rimodellamento cardiaco post-ischemico (6, 7, 8, 9). Pertanto lo scompenso cardiaco è il risultato finale dell' infarto cardiaco e rappresenta una condizione in cui il cuore non è in grado di garantire il sufficiente flusso di sangue per fornire sostanze nutritive e ossigeno ai tessuti periferici. Al fine di prevenire tali fenomeni possono essere considerati utili due diversi approcci terapeutici. Questi includono la prevenzione della morte delle cellule cardiache, idealmente, sia agendo su apoptosi che necrosi (attraverso la terapia genica o farmacologica) sia attraverso la sostituzione dei miociti, ripristinando la funzione cardiaca (attraverso la terapia cellulare). A differenza della necrosi, che è pensata essere un processo essenzialmente irreversibile, la natura altamente regolamentata della apoptosi suggerisce che possa fornire obiettivi per l'intervento terapeutico (1, 2, 3, 4, 5). A tale scopo, la scoperta di nuove vie di segnalazione e di molecole che proteggono le cellule del miocardio da un danno ischemico irreversibile è diventata una delle pietre miliari della ricerca cardiovascolare. Negli ultimi dieci anni il ruolo citoprotettivo della Protimosina alfa (PT α) è stato valutato in risposta allo stress apoptotico o

necrotico in diversi tipi di cellule e tessuti, tuttavia il suo ruolo nel cuore e nelle cellule cardiache rimane ancora sconosciuto (**10, 11**).

La protimosina alpha (PT α) è una piccola proteina nucleare (~12,5 KDa) altamente acida ubiquitariamente espressa nei tessuti dei mammiferi, ma la cui risorsa principale è rappresentata dal timo. Il nome della proteina è identificativo del ruolo di precursore della timosina alpha 1 (T α 1) la cui sequenza è situata all'N-terminale (**12, 13**). Successivamente alcuni dati mostravano che la T α 1 potesse essere solo un artefatto derivante dalle procedure di proteolisi in vitro durante l'isolamento della proteina intera. Tuttavia, tale questione rimane irrisolta in quanto molti dati riguardanti la PT α mostrano che entrambe le forme coesistono nei diversi tessuti analizzati in vivo (**14, 15, 16**). La struttura della PT α ha diverse caratteristiche atipiche: (a) manca di una regione idrofobica; (b) non contiene amminoacidi aromatici o solforati; (c) è altamente idrofilica e il 50% degli amminoacidi sono residui acidi (Glu e Asp) clusterati nella regione centrale della molecola, che somiglia così ad un domino legante gli istoni; (d) è fosforilata in vivo su residui di glutammato; (e) mostra una conformazione non foldata (**17, 18**). La sequenza proteica è fortemente conservata tra i mammiferi, infatti la PT α umana è molto simile a quella di ratto e di topo contenente circa 109 amminoacidi rispetto ai 111 del ratto e ai 110 del topo. Non ha un segnale di secrezione (**13**) ma ha un segnale di localizzazione nucleare bipartito localizzato tra i residui 87–88 e 101–104 con un sito (amminoacidi da 98 a 100) putativo di riconoscimento da parte della caspasi-3 (**19**). Molte evidenze supportano la nozione che la PT α sia un essenziale fattore nucleare correlato alla proliferazione cellulare. Infatti, la PT α è una proteina altamente espressa nelle cellule in attiva

proliferazione, in particolare nelle cellule cancerogene, ed i bassi livelli di mRNA osservati in cellule quiescenti sono incrementati particolarmente in presenza di fattori mitogeni e siero che stimolano la crescita cellulare. L'espressione genica della PT α è fortemente regolata da c-Myc in quanto tale fattore lega la sequenza E-box canonica all'interno del primo introne del gene della PT α (20). In particolare durante lo sviluppo embrionale il pattern di espressione della PT α è correlato a quello di c-Myc (21). Per quanto riguarda le funzioni della PT α , queste sembrano essere correlate anche alle interazioni con diversi partner rilevati in vitro. Infatti tale proteina sarebbe capace di interagire con istoni, RNA, proteine virali (Rev), il fattore p300 e numerosi trasportatori nucleari (22). Inoltre tale proteina sarebbe anche in grado di interagire con uno o più recettori di membrana. Alcuni lavori dimostrano proprio come la PT α sia un ligando endogeno del recettore di tipo Toll 4 (TLR4) (23) oppure possa legare un ipotetico recettore accoppiato a proteine G (GPCR) (11). Di conseguenza un ampio range di funzioni sono state attribuite a tale proteina come: (a) rimodellamento cromatinico, in seguito all'alta affinità di legame con l'istone H1 (decondensazione); (b) attivatore di fattori trascrizionali; (c) dissociatore intranucleare del complesso Nrf2-Keap1 che protegge le cellule dallo stress ossidativo; (d) fattore antiapoptotico; (e) fattore extracellulare autocrino/paracrino che agisce come inibitore molecolare della necrosi (24, 25, 26, 27, 28). Tutte queste funzioni fanno dunque della PT α una proteina essenziale per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. E anche se nessun pathway secretorio è stato ben definito, è stata ritrovata nel siero, rappresentando il 10% del contenuto totale di PT α nel sangue (29), inoltre è stata ritrovata nel surnatante dei timociti di ratto,

di capra e nel surnatante dei neuroni corticali di ratto **(30)**. Il ruolo extracellulare della PT α è stato ampiamente studiato in particolare in risposta a stimoli apoptotici o necrotici. Infatti in cellule tumorali sotto stress apoptotico sembra essere frammentata dalla caspasi-3 (perdendo l'NLS) e sembra traslocare sulla membrana plasmatica conferendo protezione alle cellule mediante un meccanismo, ancora non ben studiato, capace di bloccare la formazione dell'apoptosoma **(10)**. Mentre, in seguito ad uno stress necrotico come l'ischemia in cellule corticali neuronali la PT α viene rilasciata nel mezzo di coltura, senza perdere l'NLS mediante la proteina cargo S100A13 **(31)**. Fuori dalla cellula, la PT α , inibirebbe la necrosi revertendo la ridotta esternalizzazione dei trasportatori di glucosio GLUT1 e GLUT4, attraverso l'attivazione della protein chinasi C β 2 (PKC β 2), e allo stesso tempo tale chinasi incrementerebbe la trascrizione dei fattori proapoptotici Bax e Bim attivando l'apoptosi. Inoltre, in vivo in presenza di fattori neurotrofici la PT α sarebbe in grado di revertire totalmente il danno ischemico del cervello e della retina **(11)**.

2.SCOPO DELLO STUDIO

Attualmente i livelli di espressione cardiaca della PT α sono stati valutati solo durante lo sviluppo embrionale e in condizioni fisiologiche, risultando essere molto bassi. Tuttavia numerose indicazioni potrebbero indurre a pensare che la PT α possa avere un ruolo importante nella risposta al danno ischemico del miocardio. Nel cuore, infatti, è stato ampiamente dimostrato che il sistema dei trasportatori di glucosio (GLUT1/GLUT4) durante ischemia è downregolato e che in particolare GLUT4 (32) se riesternalizzato riduce il danno ischemico. Inoltre, i livelli di PKC β 2 e c-Myc (33, 34) aumentano durante ischemia e ischemia/riperfusione. Pertanto lo scopo del mio lavoro è stato quello di valutare se vi fossero alterazioni dei livelli in vivo della PT α dopo infarto acuto del miocardio, indotto in modelli murini, e se tale proteina potesse avere effetti protettivi in vitro su cardiomiociti neonatali di ratto e allo stesso tempo valutare il meccanismo di azione intracellulare della PT α .

3.MATERIALI E METODI

3.1 ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO

Il nostro modello animale è rappresentato da topi con background genetico C57BL/6 (n= 14). Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti gruppi sperimentali:

1. Topi di controllo sottoposti ad intervento di tipo SHAM (n= 7);
2. Topi sottoposti ad infarto del miocardio (IMA, n= 7).

3.2 MODELLO MURINO D'INFARTO MIOCARDICO

I topi anestetizzati mediante somministrazione intramuscolare di una miscela di zoletil (tielamina + zolazepam 1: 1; 50 mg/kg) e xylazina (40 mg/kg) sono stati intubati e ventilati con un ventilatore specifico per roditori (HARVARD, MA, USA). Dopo stabilizzazione delle condizioni emodinamiche, gli animali sono stati sottoposti a toracotomia laterale sinistra in corrispondenza del 5° spazio intercostale sulla linea emiclaveare e a legatura dell'arteria discendente anteriore mediante fili di sutura 7.0. Successivamente è stato applicato un tubo PE50 nel seno costofrenico sinistro al fine di riportare la pressione intratoracica ai normali valori fisiologici. Nelle ore seguenti sono stati somministrati agli animali un farmaco ad azione analgesica (ibuprofene 0.4 mg/kg sottocute per 3 giorni) e un farmaco antibiotico (enofloxacin 4 mg/kg per os per 7 giorni). Dopo 7 giorni, previa anestesia, i cuori sono stati espianati, le camere cardiache dissezionate, i ventricoli sinistri congelati in azoto liquido o fissati in formalina per i successivi studi molecolari e istologici e il sangue prelevato per estrarne il siero mediante centrifugazione a 2000 rpm per 15 min a T^{amb}.

3.3 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORACICA NEI TOPI ALLO STATO CONSCIO

Tutti gli animali utilizzati in questo studio sono stati sottoposti ad ecocardiogramma transtoracico bidimensionale e in modalità M-mode, in condizioni basali (pre) e 7 giorni dopo l'infarto del miocardio (post). Tale analisi è stata eseguita nei topi consci mediante un ecocardiografo VEVO 770 (Visualsonic, Canada) con sonda meccanica ad alta frequenza specifica per roditori. I parametri ecocardiografici misurati sono stati i seguenti: dimensione

telediastolica del ventricolo sinistro (LVEDD, mm); dimensione telesistolica del ventricolo sinistro (LVESD, mm); percentuale della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (fractional shortening, $FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \%$); spessore della parete posteriore (Pwth) e del setto (SEPth); frequenza cardiaca (FC) e durata della eiezione (ejection time, ET= msec).

3.4 VALUTAZIONI ISTOLOGICHE

Sette giorni dopo l'infarto del miocardio i topi sono stati sacrificati e i cuori sono stati escissi, pesati e fissati in paraffina. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a taglio con microtomo ottenendo sezioni dello spessore di 4 μ m. Per la valutazione della percentuale di area infartuata, sono state acquisite immagini con potere risolutivo di 25X e 40X.

3.5 VALUTAZIONE DELL'ESTENSIONE DELL'AREA INFARTUATA E DELLA FIBROSI

Per la valutazione della percentuale di area infartuata (infarct size), sezioni di ventricolo sinistro sono state sottoposte alla colorazione tricromica di Masson (variante di Goldner) oppure a colorazione con acido picrico e rosso sirio (picro-sirio rosso). Per la colorazione tricromica di Masson, dopo deparaffinizzazione ed idratazione in serie alcolica decrescente, le sezioni sono state colorate mediante incubazione per 10 minuti con ematossilina ferrica di Groat e successivamente con una soluzione contenente ponceau 2R, fucsina acida e acqua distillata. Dopo una serie di lavaggi in acido acetico 1%, le sezioni sono state trattate con acido fosfomolibdico e orange G e successivamente con verde luce. Mentre per la colorazione con picro-sirio rosso dopo deparaffinizzazione ed idratazione in serie alcolica decrescente, le sezioni sono state colorate mediante incubazione per 1 h con picro-sirio rosso. Infine, dopo la colorazione le fette sono state disidratate mediante passaggio in etanolo assoluto e xilene e sono montate per la visualizzazione al microscopio con un mezzo di montaggio (Eukitt). La percentuale di area infartuata è stata calcolata come rapporto tra l'estensione in mm^2 dell'area infartuale rispetto l'area totale.

3.6 VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE DELLA PROTIMOSINA ALPHA NEL TESSUTO CARDIACO MEDIANTE COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

La tecnica immunoistochimica sfrutta la capacità degli anticorpi di legarsi all'antigene specifico su sezioni istologiche precedentemente processate. L'anticorpo, previamente coniugato con l'enzima perossidasi, è fatto incubare con la sezione, dove si legherà all'antigene cercato. Quindi segue un trattamento con un substrato di questo enzima (diamminobenzidina,

DAB) che sarà trasformato dalla perossidasi in un prodotto colorato nel punto esatto dove si era legato l'anticorpo, rivelando così la localizzazione dell'antigene. Per valutare la localizzazione della protimosina alpha su sezioni di tessuto cardiaco SHAM e IMA, dopo deparaffinizzazione ed idratazione in serie alcolica decrescente, le sezioni sono state preincubate in un buffer di blocking (0.5 % normal serum) in modo da bloccare eventuali siti aspecifici a cui potrebbe legarsi il nostro anticorpo. Successivamente le sezioni sono state incubate 12 h a 4°C con l'anticorpo anti-Protimosina alpha (rabbit policlonale, Santacruz) diluito 1:200 in buffer di blocking. In seguito le sezioni sono state lavate 5 minuti in PBS 1X e trattate con una soluzione di DAB (vector) per pochi secondi. Le sezioni sono state poi disidratate in serie alcolica crescente e montate con mezzo Eukitt. Le immagini sono state acquisite con un potere risolutivo di 100X e 600X mediante videocamera (JVC) collegata ad un microscopio (Leica).

3.7 COLTURE PRIMARIE DI CARDIOMIOCITI NEONATALI DI RATTO

Le cellule sono state isolate dai cuori di ratti neonati (Wistar rats, Charles River Laboratories, Wilmington, MA USA). Immediatamente dopo il prelievo i cuori sono stati messi in soluzione ADS (100 mM NaCl, 200 mM HEPES, 7.5 mM NaH₂PO₄, 3 mM Glucosio, 5 mM KCl, 4 mM MgSO₄ anidro, filtrato con filtro 0.22µ) fredda, in capsula petri. Con strumenti sterili da microchirurgia ciascun cuore (da 6 ratti si ottengono circa un milione di cellule) è stato ridotto in frammenti più piccoli. Tali frammenti sono stati trasferiti in falcon da 50 ml con 1 ml di soluzione ADS (116 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucosio, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄ ph 7.35) poi aspirata via. La digestione enzimatica è stata avviata

aggiungendo 7 ml di soluzione D (300mg/ml collagenasi A, 600 mg/ml pancreatina sciolti in ADS) nei cardiomiociti: dopo incubazione a 37°C per 6 min, necessaria per allontanare i fibroblasti, la digestione è stata fermata aggiungendo 1 ml di Newborn Calf Serum (Gibco) ed è stato prelevato il surnatante. Il campione contenente i cuori è stato nuovamente incubato per una digestione successiva con 9 ml di soluzione D per 20 min. Il campione contenente il surnatante è stato centrifugato a 1500 rpm per 6 min ed il pellet è stato risospeso in 2ml di Newborn Calf Serum quindi tenuto in stufa a 37°C fino al termine della digestione dei cardiomiociti. Si è proceduti con diversi cicli di operazioni di raccolta di cardiomiociti da cuori interi finchè questi non sono stati completamente digeriti. Tutti i pellet risospesi contenenti i cardiomiociti e tenuti a 37°C sono stati poi riuniti, centrifugati a 1500 rpm per 6 min e successivamente risospesi in 10 ml di mezzo di piastramento (74% DMEM, 16% Medium 199, Horse Serum 10 %, Penicillina-Streptomicina 1 %). Le cellule sono state piastrate su dish petri da 9 cm, con una densità di $0,9 \cdot 10^5$ cellule/cm² e fatte crescere in un apposito terreno di coltura (75 % DMEM, 17 % Medium 199, 1% Horse Serum, 0.5 % Fetal Bovine Serum, 1 % Penicillina-Streptomicina).

3.8 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Gli RNA sono stati estratti da pezzi di ventricolo sinistro (~100 mg) o da cellule ($\sim 1 \times 10^6$) impiegando il metodo della guanidina isotiocianato, in particolare mediante l'uso del reagente TRIzol (Invitrogen). Viene aggiunto ai tubi 1 ml di TRIzol e per i tessuti si procede con l'omogeneizzazione mediante un tissue ruptor e successiva sonicazione. Mentre per le cellule si procede solo con lisi diretta per pipettamento con TRIzol. I campioni

vengono incubati per 5-10 minuti a temperatura ambiente, per consentire la dissociazione dei complessi nucleoproteici. Successivamente si aggiungono 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRIzol impiegato e si agita vigorosamente per 15 secondi. Infine si centrifugano i campioni a 12000 g per 10' in centrifuga da banco refrigerata, per separare la fase organica da quella acquosa contenente l'RNA. La fase acquosa (superiore) viene recuperata facendo attenzione a non prelevare l'interfaccia o la fase inferiore e si aggiungono ad essa 500 µl di isopropanolo per ogni ml di TRIzol utilizzato. Dopo un'incubazione di 10' a temperatura ambiente, il campione viene centrifugato a 12000 g per 10' in centrifuga da banco refrigerata. Successivamente si rimuove il surnatante e si lava l'RNA precipitato e depositato sul fondo del tubo con 1ml di etanolo al 70% in H₂O DEPC per ogni ml di TRIzol utilizzato. Si agita vigorosamente e si centrifuga a 7500 g per 5' in centrifuga da banco refrigerata. Asciugato il precipitato per pochi minuti all'aria, sotto cappa o a vuoto, infine si risospende l'RNA con 50 µl di H₂O DEPC.

3.9 RT-PCR

Dopo aver estratto l'RNA si procede con la retrotrascrizione degli RNA (RT) in cDNA e la reazione a catena della polimerasi (PCR). Per la retrotrascrizione sono stati usati oligonucleotidi statistici lunghi 8 nucleotidi (pdn8), necessari come inneschi per l'enzima trascrittasi inversa. In particolare sono stati utilizzati tubi sterili, cui si sono aggiunte le seguenti componenti:

RNA 1 µg

pdn8 (25 pmol/µl) 2 µl

dNTP (10 mM) 1 μ l

H₂O DEPC fino ad arrivare ad un volume di 14 μ l

La miscela è stata incubata a 65°C per 5' e poi posta in ghiaccio per 1';

Dopo centrifugazione, alla reazione sono stati aggiunti i seguenti componenti:

Tampone di sintesi (5x) 4 μ l

DTT (100 mM) 1 μ l

Trascrittasi inversa (SS III Invitrogen) (200 U/ μ l) 1 μ l

La miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per 10' e poi posta in un bagnetto termostato a 50°C per 1h. Infine la reazione viene bloccata mediante inattivazione dell'enzima a 70°C per 15'. Il volume finale dei campioni di cDNA è stato infine portato a 50 μ l mediante l'aggiunta di 30 μ l di H₂O sterile.

3.10 Real-Time PCR

Dopo l'estrazione, l'RNA è stato retrotrascritto in cDNA e successivamente sono stati effettuati saggi di Real-time PCR utilizzando una miscela di reazione (IQ SYBR Green, Biorad) in cui sono stati aggiunti oligonucleotidi specifici per valutare i livelli di: PT α , TNF- α , Myd88 e GAPDH come controllo.

3.11 CLONAGGIO DELLA PROTIMOSINA RICOMBINANTE

Nella preparazione della proteina ricombinante, il gene codificante per la PT α privo del segnale NLS (Δ 101–111) è stato amplificato dal cDNA derivante dal cuore di topo usando oligonucleotidi specifici (mouse PT α -For 5'-CATTTCATATGTCAGACGCGGCAGTG-3', mouse PT α -Rev 5'-

CATTCTCGAGGTCCACATCGTCATCCTCATCATCCTCAG-3'). Dopo aver valutato la purezza e la specificità dei prodotti di PCR si è proceduto con la digestione del vettore e dei prodotti di PCR mediante utilizzo degli enzimi di restrizione e successiva ligazione tra inserto e vettore mediante utilizzo dell'enzima T4 DNA Ligasi. Dopo aver verificato la corretta ligazione dell'inserto nel vettore, il costrutto è stato utilizzato per trasformare cellule competenti BL21DE3 (pLys) (Promega) che oltre a permettere l'amplificazione del costrutto permettono anche l'espressione della proteina ricombinante. La reazione di trasformazione si basa su uno shock termico che permette l'apertura di pori nella membrana plasmatica dei batteri e quindi l'entrata delle molecole di DNA. In particolare, un'aliquota di cellule conservata a -80 °C è fatta scongelare lentamente in ghiaccio; dopodiché è stato aggiunto alle cellule l'intera reazione di ligazione (precedentemente concentrata a circa 10 µl); le cellule sono incubate per 30' in ghiaccio, poi, per 1.5' a 42°C ed infine di nuovo in ghiaccio per 1.5'. Al termine dello shock sono stati aggiunti alle cellule 200 µl di LB (NaCl 192 mM; estratto di lievito 0.5 %; Bacto-triptone 1 %; NaOH 5 mM). Le cellule sono state poste in agitazione a 37°C per 1 h (per consentire l'espressione della β-lattamasi necessaria alla resistenza all'antibiotico ampicillina). Infine, circa 40 µl di coltura batterica sono stati piastrati su terreno solido LB + agar in presenza dell'antibiotico ampicillina ad una concentrazione finale di 100 µg/ml per selezionare le cellule trasformate dal plasmide.

L'IPTG è un analogo del lattosio per cui funge da induttore dell'espressione del gene *LacZ*, invece X-GAL è il substrato per la β-galattosidasi, che a seguito della reazione enzimatica determina la formazione di un precipitato di colore blu, in tal modo è possibile selezionare le colonie positive

(bianche), da quelle negative (blu). Dopo una notte di crescita a 37 °C le colonie positive sono prelevate ed incubate in 5 ml di terreno di coltura liquido costituito da LB e ampicillina al fine di ottenere maggiore quantitativo del costrutto plasmidico d'interesse.

3.12 MINIPREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Per poter isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche il protocollo che è stato utilizzato è basato sul metodo della lisi alcalina. Dai 5 ml di ciascuna coltura batterica sono state prelevate aliquote di 500 µl, cui è stato aggiunto un eguale volume di una soluzione sterile di glicerolo al 40 %; dopo accurata agitazione, le aliquote sono state conservate a -20°C, al fine di ottenere una riserva di batteri trasformati. Il restante volume è stato centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti in centrifuga Beckman GS-6R con rotore GH 3.7, è stato eliminato il soprannatante ed il "pellet" batterico è stato risospeso in 100 µl di soluzione GTE fredda (Glucosio 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM pH 8). Sono stati aggiunti 200 µl di soluzione 2 (NaOH 0.2 M; SDS 1 %) preparata al momento, e, dopo aver mescolato delicatamente per inversione, i campioni sono stati posti in ghiaccio. Trascorsi 5 minuti, sono stati aggiunti 150 µl di soluzione 3 (Potassio Acetato 3 M pH 5,5) e sono stati lasciati i campioni in ghiaccio per altri 5 minuti. Dopo centrifugazione di 5 minuti a 14000 rpm in microcentrifuga Eppendorf, il supernatante è stato estratto con un eguale volume di fenolo (preequilibrato con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0):cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), agitando con cura e centrifugando per 5 minuti come sopra descritto. Per precipitare il DNA plasmidico sono stati aggiunti 2.5 volumi di etanolo assoluto al

supernatante ed il tutto è stato lasciato alla temperatura di -20°C per 30 minuti; il DNA plasmidico è stato recuperato con una centrifugazione di 20 minuti. Il precipitato è stato lavato con etanolo 70 % e risospeso in 40 µl di TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). Si è effettuata una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando uno spettrofotometro VARIAN DMS 90 e la concentrazione del plasmide è stata determinata utilizzando la relazione: 1 O.D. = 260 nm = 50 g/ml di DNA plasmidico. Per valutare il grado di purezza del DNA plasmidico estratto ed escludere la presenza di RNA, aliquote di 1µg sono state analizzate su gel di agarosio 1% in TAE 1x (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8) contenente 0.5 µg/µl di bromuro di etidio.

3.13 MAXIPREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Per ottenere preparazioni di maggiori quantitativi di DNA plasmidico sufficientemente purificato, necessario per le successive fasi sperimentali, è stato effettuato un inoculo di 100 µl dalla riserva di batteri trasformati in 200 ml di Super Brodo (NaCl 86 mM; estratto di lievito 2%; Bacto-triptone 3.5%; NaOH 5mM); la coltura batterica è stata messa a 37°C con agitazione costante (270 rpm) per tutta la notte. Il giorno successivo, i batteri sono stati raccolti centrifugando a 3000 rpm per 10 minuti in centrifuga Beckman con rotore GH 3.7. Il precipitato è stato risospeso in 10 ml di tampone P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 10 mM; Ribonucleasi A 100 µg/ml) e lasciato 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver aggiunto 10 ml di tampone P2 (NaOH 0,2 mM; SDS 1 %) ed aver mescolato per inversione ripetutamente, è stato incubato a temperatura ambiente altri 5 minuti. Dopo aver aggiunto 10 ml di tampone P3 (Potassio Acetato 2.55 M

pH 4,8), aver mescolato delicatamente e incubato in ghiaccio per 20 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 10000 rpm per 30 minuti a 4°C, in centrifuga Sorvall RC-2B con rotore SS34. Il supernatante è stato fatto passare su di una colonna Qiagen-tip-500, preequilibrata con 10 ml di tampone QBT (NaCl 0,75 M; MOPS 50 mM pH 7; Etanolo 15 %; Triton X-100 0.15 %). Dopo aver lavato la resina tre volte con 10 ml di tampone QC (NaCl 1 M; MOPS 50 mM pH 7; Etanolo 15 %) il DNA è stato eluito con 15 ml di tampone QF (NaCl 1.25 M; MOPS 50 mM pH 8.2; Etanolo 15 %), precipitato a temperatura ambiente con 0,7 volumi di isopropanolo, e centrifugato 30 minuti a 4°C come sopra descritto. Eliminato il supernatante, il precipitato di DNA plasmidico è stato lavato con etanolo 70%, e risospeso in 200-500 µl di TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). Da questo protocollo si sono ottenuti generalmente 0.2-1 mg di DNA plasmidico.

3.14 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLA PT α RICOMBINANTE

La valutazione della corretta espressione è stata effettuata mediante colorazione con blu di coomassie dopo SDS-PAGE su lisati di batteri precedentemente trasformati con il costrutto di espressione del gene di interesse (PT α ricombinante) e indotti mediante IPTG 1 mM per 2 h (fig.) in un volume di LB di 500 mL. Dopo aver prelevato una aliquota (100 µL) si centrifuga tutto a 3000 rpm per 15 minuti a 4°C per pellettare i batteri. Il pellet ottenuto dai 500 mL viene privato del surnatante e si conserva a -80°C. Il pellet ottenuto dalla aliquota di 100 µL si diluisce in un buffer di caricamento (Laemmli) e dopo bollitura a 99°C per 5 minuti si carica su un gel di poliacrilammide 15% insieme ad un controllo negativo di batteri non

indotti al fine di valutare l'avvenuta induzione. Successivamente si procede con la purificazione della proteina mediante due passaggi di cromatografia. La prima cromatografia si basa sull'affinità della colonna con la coda di istidine al C-terminale della protimosina (His trap Hp-Amersham). Tale colonna è compatibile solo con alcuni detergenti come il Triton-X 100 e non con l'SDS pertanto non può essere utilizzato il buffer di lisi RIPA. Inoltre siccome le condizioni saline di partenza prevedono solo sodio, fosfato e cloruro di sodio si usa PBS con inibitori di proteasi per lisare. Pertanto si procede lisando l'intero pellet di batteri precedentemente conservato e si carica la colonna cromatografica.

La prima cromatografia si esegue come descritto:

1) Preparare Binding buffer:

PBS 1X

20mM Imidazolo

0.35M NaCl

2) Preparare Elution Buffer:

PBS 1X

500mM Imidazolo

0.35M NaCl

3) Aggiungere al lisato:

20mM Imidazolo

0.35M NaCl

4) Equilibrare la colonna con Binding buffer;

5) Applicare il campione e raccogliere il Flow Through;

6) Lavare la colonna con Binding buffer;

7) Eluire con Elution Buffer e raccogliere le frazioni;

8) Riequilibrare la colonna con Binding Buffer;

10) Preparare un gel in modo da controllare in quale delle frazioni è presente la nostra proteina.

Una volta individuata la frazione che contiene la proteina ricombinante si verifica anche il grado di purificazione. Se come nel nostro caso non è ottima si procede con una cromatografia DEAE cioè a scambio ionico ma per proteine con $pI < 7$, la protimosina ha infatti un $pI = 3.4$.

Si utilizzano colonnine Poly-prep chromatography della Bio-rad nella quale si versano delle beads con DEAE e si procede come descritto:

1) Preparare Binding Buffer:

Tris 20 mM, pH 7.5

2) Diluire la frazione di circa 20 volte in modo da portare la concentrazione di NaCl a 20 mM .

3) preparare le soluzioni di Eluizione:

- Tris 20 mM

NaCl 200 mM

- Tris 20 mM

NaCl 250 mM

- Tris 20 mM

NaCl 350 mM

- Tris 20 mM

NaCl 400 mM

- Tris 20 mM

NaCl 1 M

4) Equilibrare con Binding Buffer;

5) Applicare il campione e raccogliere il Flow Through;

- 6) Lavare la colonna con soluzione NaCl 200 mM;
- 7) Lavare la colonna con soluzione NaCl 250 mM;
- 8) Eluire con soluzione 350 mM e 400 mM raccogliendo entrambe le frazioni;
- 9) Lavare la colonna con soluzione 1M NaCl;
- 10) Riequilibrare la colonna con Binding Buffer;
- 11) Preparare un gel al 15 % in modo da controllare in quale delle frazioni è presente la nostra proteina.

Dopo aver individuato la frazione e aver valutato la perfetta purificazione, si valuta la concentrazione mediante colorazione di blu di coomassie su gel di poliacrilammide al 15 % della nostra proteina, caricando però varie aliquote della frazione (1, 5, 10 μL) e caricando una curva standard di BSA (0-0.5-1-1.5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

3.15 ISCHEMIA E ISCHEMIA/RIPERFUSIONE *IN VITRO*

L'ischemia e l'ischemia/riperfusion (I/R) che rispettivamente rappresentano l'occlusione di un'arteria coronaria (ischemia) e l'occlusione seguita però da ripristino del flusso sanguigno (I/R), sono ampiamente utilizzate nei modelli animale al fine di studiare l'infarto del miocardio. In questi studi in vivo è stato dimostrato che i cardiomiociti vanno incontro ad apoptosi in risposta a sola ischemia e ad I/R (1, 3, 9). Il modo più semplice di analizzare l'apoptosi nelle cellule cardiache è comunque l'utilizzo di cardiomiociti neonatali primari. L'ischemia nei modelli cellulari può essere simulata mediante una combinazione di ipossia e starvation da siero, seguita da un ripristino delle condizioni di ossigeno (riossigenazione) e da ripristino anche delle opportune concentrazioni di siero per la crescita

cellulare (35, 36). Pertanto dopo 2 giorni dall'isolamento dei cardiomiociti neonatali di ratto, si induce l'ischemia sostituendo il mezzo di mantenimento dei cardiomiociti con un mezzo DMEM privo di siero e glucosio e incubando le cellule a 37°C in camera umidificata e in condizioni di basso ossigeno (1% O₂, 5% CO₂ e 94% N₂). Allo stesso tempo un gruppo di cellule controllo (NORMOSSIA) è mantenuto alle normali condizioni di siero e ossigeno. Dopo 6 h di ischemia un gruppo di cellule è direttamente lisato in modo da isolare RNA e proteine oppure è utilizzato per saggi di vitalità o di immunocitochimica. Mentre un gruppo di cellule ischemiche è successivamente soggetto a sostituzione del mezzo (conservato per l'analisi di proteine secrete) con il mezzo di mantenimento e trasferito per 16 h in un incubatore in condizioni normossiche (riperfusion). Infine i campioni I/R e i campioni NORMOSSIA sono suddivisi a seconda dei saggi (RNA, proteine, analisi immunocitochimiche e saggi di vitalità). Un gruppo di cellule NORMOSSIA, ISCHEMIA e I/R è trattato anche con rPTα (160 Nm) diluita direttamente nel mezzo opportuno.

3.16 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTT (*BROMURO DI 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO*)

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri; può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o altri tipi di sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle

cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. Le cellule (1×10^5) sono state piastrate in mutiwell da 12 pozzetti e soggette ai trattamenti. In seguito, la soluzione di MTT (5 mg/ml MTT in PBS) è stata aggiunta asetticamente in un volume uguale a quello del mezzo cellulare di partenza, e le cellule incubate per 1 h. Successivamente è stato aggiunto un solvente (DMSO) in un volume uguale a quello del mezzo cellulare di partenza e la piastra soggetta ad agitazione per 5 min per permettere la dissoluzione dei cristalli di formazano. Tale reazione è stata poi valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm.

3.17 VALUTAZIONE DELLA NECROSI E DELL'APOPTOSI CELLULARE MEDIANTE MARCATURA CON IODURO DI PROPIDIO (PI) E CON ANNESSINA V

L'immunofluorescenza utilizza anticorpi, coniugati a traccianti fluorescenti, in grado di legarsi a strutture cellulari in modo molto specifico, consentendo la valutazione qualitativa e quantitativa delle strutture bersaglio. Tale tecnica genera immagini per emissione di luce e pertanto permette l'osservazione di particolari inferiori al limite di risoluzione refrattile, consentendo la localizzazione di antigeni in compartimenti subcellulari, in particolare nelle cellule in coltura. Per valutare gli effetti sulla morte cellulare dopo trattamento con rPT α abbiamo utilizzato il kit Annexin V-FLUOS Apoptosis Detection KIT (ROCHE) che consente l'individuazione di un

fosfolipide di membrana, la fosfatidilserina (PS), esposto sulla superficie cellulare durante le fasi precoci dell'apoptosi. I cardiomiociti sono stati piastrati in multiwell da 24 pozzetti su vetrini tondi da 12 mm e incubati, in condizioni standard di temperatura e CO₂, per 24 h in un mezzo di mantenimento a bassa concentrazione di nutrienti (FBS 0.25 % e Horse Serum 0.25 %). Il giorno seguente sono stati sottoposti ad ischemia, I/R come descritto sopra e trattati e non con PT α ricombinante 160 nM. In seguito alla stimolazione, le cellule sono state incubate in un buffer specifico (1X Binding Buffer) in presenza dell'annessina V marcata con fluoresceina (verde) e PI (rosso) per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente. L'annessina V è una proteina in grado di legare con alta affinità la PS mentre PI lega il DNA delle cellule necrotiche. Successivamente, le cellule sono state lavate in TBS (Tris 0.1 M, 150 mM NaCl, pH 7.4) e fissate per 1 minuto a T^{amb} in metanolo e acetone (1:1). Per visualizzare la presenza di annessina V sulla membrana cellulare è stata utilizzata una combinazione di filtri in grado d'indurre l'eccitazione (480) e l'emissione (570 nm Annessina V; >600 nm PI) del fluorocromo FITC legato all'annessina V. La visualizzazione è stata effettuata utilizzando un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE 2000- U.

3.18 VALUTAZIONE MEDIANTE IMMUNOBLOTTING DEI LIVELLI DI PT α ALPHA, pAKT, CASPASI-3 CLIVATA E pERK 1/2

I ventricoli sinistri dei cuori espianati sette giorni dopo l'infarto del miocardio e i cardiomiociti neonatali di ratto sono stati lisati in un buffer di lisi, RIPA BUFFER (Tris- HCl (ph 7.5), NaCl, 1 %, Nonidet P-40, 0.5 %) con inibitori di proteasi a 4°C. Sono state successivamente estratte le proteine,

sottoposte a separazione mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e trasferite su membrana di PVDF. Le membrane così ottenute sono state incubate con gli opportuni anticorpi primari con diluizioni 1:1000: PT α (rabbit policlonale, Santa Cruz), pAKT (mouse monoclonale, Santa Cruz); pERK 1/2 (rabbit monoclonale, Cell Signaling); Caspasi 3-Clivata (mouse monoclonale, Cell Signaling). Successivamente la membrana è stata incubata per 30 secondi con soluzione luminescente/perossidasi (1:1 ECL Plus; GE Healthcare) e, mediante sistema computerizzato (Chemidoc, BIORAD) è stata valutata l'espressione delle proteine analizzando la reazione di chemiluminescenza.

3.19 ANALISI STATISTICHE

I dati continui sono stati espressi come media + errore standard e confrontati test t di student. Per tutti i parametri, è stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$ e $p < 0.01$.

4. RISULTATI

4.1 VALUTAZIONE DELL'ESTENSIONE DELL'AREA INFARTUALE E DELLA PERFORMANCE CARDIACA MEDIANTE ECOCARDIOGRAFIA NEI VARI GRUPPI SPERIMENTALI

Come previsto, le valutazioni ecocardiografiche hanno evidenziato una riduzione della performance cardiaca sette giorni dopo l'induzione di infarto del miocardio. Il deterioramento della performance cardiaca è stato evidenziato dalla significativa riduzione della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro nel gruppo IMA rispetto al gruppo SHAM (Fig. 1 A). Inoltre la valutazione dell'estensione dell'area infartuale mediante valutazione morfometrica in preparazioni allestite con colorazione tricromica di Masson e rosso sirio ha evidenziato e confermato un notevole danno a seguito dell'ischemia.

4.2 ALTERAZIONE *IN VIVO* DEI LIVELLI DI SECREZIONE E DI ESPRESSIONE DELLA PROTIMOSINA ALPHA DURANTE INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO (IMA)

Siccome la PT α , come descritto, è normalmente presente nel siero umano in condizioni fisiologiche ho cercato di valutare eventuali variazioni nei livelli sierici di PT α nei topi IMA (n=7) comparandoli con i sieri dei topi SHAM (n=7) mediante immunoblot (Fig. 1 B). Nel siero IMA si riscontra un significativo aumento dei livelli della PT α rispetto ai topi SHAM. A tal punto ho valutato anche se questo incremento fosse confermato nel tessuto cardiaco dei topi IMA, mediante immunoblot e mediante immunostochimica. Come nel siero infatti, nel tessuto cardiaco dei topi IMA vi è un aumento dei livelli di PT α di circa 2 volte rispetto ai livelli dei topi SHAM (Fig. 1 C). Dall'analisi immunostochimica invece, è

interessante notare come la PT α negli SHAM sia presente solo nel nucleo dei cardiomiociti (Fig. 2 A, pannelli 5-7) mentre nei topi IMA è prevalentemente localizzata nel citoplasma e sulla membrana dei cardiomiociti e negli spazi interstiziali all'interno delle regioni peri-infartuale ed infartuale (Fig. 2 A, pannelli 6-8). Tali regioni come è noto sono soggette a fenomeni di morte cellulare per apoptosi e necrosi pertanto è possibile ipotizzare un ruolo della PT α in risposta al danno ischemico.

4.3 ALTERAZIONE *IN VITRO* DEI LIVELLI DI SECREZIONE E DI ESPRESSIONE DELLA PT α DURANTE ISCHEMIA ED ISCHEMIA RIPERFUSIONE

Avendo valutato che il gene per la PT α è espresso a livello cardiaco e che tali livelli di espressione aumentano significativamente durante ischemia del miocardio ho effettuato saggi di Real-time PCR e di immunoblot per analizzare i livelli di PT α su lisati di cardiomiociti isolati da ratti neonati sottoposti ad ischemia e ad I/R. Come mostrato in figura 3 A, i livelli di PT α aumentando di circa due volte dopo ischemia e di circa 9 volte dopo I/R rispetto al gruppo di cellule in normossia. Inoltre mediante una cromatografia a scambio ionico (DEAE) effettuata sul surnatante dei cardiomiociti ischemici è stato possibile confermare che la PT α è secreta dai cardiomiociti durante ischemia (Fig. 3 B).

4.4 RUOLO CARDIOPROTETTIVO *IN VITRO* DELLA PT α

La PT α , da numerosi studi precedenti, risulta essere una proteina essenziale per la sopravvivenza e la proliferazione con un ampio spettro di azioni differenti. In particolare numerose di queste sono predette avvenire

nel nucleo. A tal fine, siccome la PT α perde la sua localizzazione nucleare, come osservato nei cardiomiociti dei topi IMA, ho focalizzato il mio studio sul ruolo extracellulare di tale proteina. Così ho valutato gli effetti in vitro della PT α senza NLS (rPT α) dopo trattamento dei cardiomiociti neonatali di ratto in seguito ad ischemia e I/R. Pertanto, ho clonato il gene della rPT α . Il clone è stato poi inserito all'interno di un vettore di espressione procariotica. Dopo aver purificato e quantificato la proteina, ho proceduto a valutare con il saggio MTT la sopravvivenza cellulare di cardiomiociti, trattati e non con PT α ricombinante (160 nM), sottoposti ad ischemia e I/R. Il saggio mostra che il trattamento con rPT α , induce un significativo incremento della sopravvivenza cellulare. Tale dato è stato inoltre confermato dal saggio dell'annexina V-PI, che permette anche di valutare le percentuali di apoptosi e necrosi dopo ischemia ed I/R. Dalla figura 4 A è possibile osservare che il ruolo della PT α è importantissimo durante l'I/R, infatti nelle cellule trattate con PT α si osserva una significativa riduzione della percentuale di morte per necrosi e per apoptosi ed un ripristino della percentuale di cellule vitali, valutate come cellule non marcate con annexina V e PI (Fig. 4 B).

4.5 MECCANISMO INTRACELLULARE CARDIOPROTETTIVO DELLA PT α

Siccome il meccanismo cardioprotettivo dimostrato finora mediato dalla PT α non è noto, ho valutato l'attivazione della caspasi-3 (caspasi-3 clivata) che è noto essere una molecola attivata dalla PT α , e le protein chinasi AKT (pAKT) e ERK 1/2 (pERK) che risultano essere invece due importanti molecole con proprietà cardioprotettive attivate specialmente durante I/R.

Gli immunoblot effettuati sui lisati dei cardiomiociti, trattati e non con PT α durante ischemia ed I/R, mostrano come l'attivazione della caspasi-3 e di AKT (Fig. 5 A) sia significativamente incrementata durante ischemia nei gruppi trattati con PT α , rispetto ai gruppi ischemici non trattati, ed I/R ma con nessuna differenza tra gruppi trattati e non. Mentre l'analisi dell'attivazione di ERK 1/2 mostra che questa è aumentata solo dopo I/R con una consistente differenza tra gruppi trattati con PT α e non (Fig. 5 A). L'attivazione di tali signaling potrebbe avvenire per diverse vie che prevedono numerosi recettori sulla membrana plasmatica delle cellule cardiache. A tal punto, come già precedentemente descritto, la PT α sembra essere il ligando endogeno del TLR4. Il TLR4 è un recettore ampiamente espresso a livello cardiaco che risulta essere cardioprotettivo (37) mediante un meccanismo attivato da Myd88, proteina adattatrice che lega il TLR4 a livello intracellulare e che a sua volta attiva la via del TNF- α , di PI3K/AKT e di ERK 1/2 (38). Pertanto al fine di valutare se tale recettore fosse responsabile della cardioprotezione mediata dalla PT α , ho analizzato i livelli di mRNA dei fattori TNF- α e di Myd88 mediante Real-time PCR, dopo ischemia ed I/R nei gruppi trattati e non con PT α . Tale saggio ha rilevato sorprendentemente che la PT α era capace di incrementare i livelli di espressione di tali fattori (Fig. 6 A-B). Inoltre al fine di confermare se l'attivazione di ERK 1/2 fosse proprio mediata dal TLR4, ho stimolato con PT α , cellule che esprimono alti livelli di TLR4 come le cellule MEF (39), e le cellule HEK293 che invece non esprimono il TLR4 (40). Tale stimolazione mostra che l'attivazione di ERK 1/2 si verifica solo nei MEF e quindi conferma la mia ipotesi di un probabile ruolo del TLR4 nel signaling protettivo della PT α (Fig. 6 C).

5.DISCUSSIONE

L'analisi dei livelli di PT α nel gruppo IMA rispetto al gruppo SHAM indica un significativo aumento, sia nel siero che nel cuore, di tale proteina in risposta allo stress ischemico. Tale fenomeno, si riflette anche sulla localizzazione intracellulare della PT α . Infatti, l'analisi immunocitochimica su sezioni di tessuto cardiaco mostra che nei cardiomiociti si verifica un passaggio della PT α dal nucleo, osservata nei topi SHAM, al citoplasma e alla membrana dei cardiomiociti presenti nelle regioni peri ed infartuale (caratterizzate entrambe da fenomeni di necrosi ed apoptosi) dei topi IMA. Inoltre, in linea agli aumentati livelli sierici, è possibile osservare un segnale della proteina anche negli spazi interstiziali del tessuto ischemico. Quanto osservato in vivo, è stato confermato in vitro nei cardiomiociti neonatali di ratto sottoposti ad ischemia e ad I/R. Infatti, i livelli di espressione di PT α , subiscono un consistente e robusto incremento in risposta ad entrambi gli stress. A tal punto, i dati a nostra disposizione suggeriscono che la PT α nel cuore svolge un ruolo extracellulare in risposta al danno ischemico del miocardio. Pertanto, abbiamo valutato in vitro, mediante utilizzo di rPT α , gli effetti sulla vitalità dei cardiomiociti. Sorprendentemente, il trattamento dei cardiomiociti in vitro con tale proteina, mostra che durante ischemia e I/R si verifica un significativo aumento della sopravvivenza cellulare con una conseguente riduzione nei gruppi I/R dei fenomeni di morte per apoptosi e necrosi. Inoltre, si osserva che tali effetti sono conseguenti agli aumentati livelli di attivazione delle chinasi citoprotettive AKT e ERK 1/2. Come suggerito dai nostri risultati, l'attivazione di questi meccanismi protettivi mediati dalla PT α sono potenzialmente dovuti, all'interazione sulla membrana plasmatica con TLR4, come recentemente mostrato anche nelle

cellule T (CD8+) **(26)**. Infatti, vi è un forte aumento, dopo trattamento con PT α , dei fattori TNF- α e Myd88, noti marcatori di attivazione del TLR4.

In conclusione, questo studio ha il valore di aver mostrato un nuovo meccanismo cardioprotettivo (Fig. 7), in cui il sistema PT α /TLR4 potrebbe giocare un importante ruolo nella cardioprotezione dal danno ischemico. Pertanto, possiamo considerare la PT α non solo un nuovo biomarker ma anche un possibile adiuvante terapeutico nella lotta alla cardiopatia ischemica.

6.BIBLIOGRAFIA

1. **Crow , M. T. , Mani , K. , Nam , Y. J. , and Kitsis , R. N. (2004) . *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis . Circ Res 95 , 957 – 70;***
2. **Gill , C. , Mestril , R. , and Samali , A. (2002). *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease – a novel therapeutic target? Faseb J 16 , 135 – 46;***
3. **Logue , S. E. , Gustafsson , A. B. , Samali , A. , and Gottlieb, R. A. (2005). *Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death . J Mol Cell Cardiol 38 , 21 – 33;***
4. **Regula , K. M. , and Kirshenbaum , L. A. (2005). *Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end . J Mol Cell Cardiol 38 , 3 – 13;***
5. **Whelan , R. S. , Mani , K. , and Kitsis , R. N. (2007) . *Nipping at cardiac remodeling . J Clin Invest 117 , 2751 – 3;***
6. **Kitsis RN, Narula J. *Introduction cell death in heart failure . Heart Fail Rev 13 , 107 – 9;***
7. **Mani , K. , and Kitsis , R. N. (2003) . *Myocyte apoptosis: programming ventricular remodelling . J Am Coll Cardiol 41 , 761 – 4;***
8. **Sutton , M. G. , and Sharpe , N. (2000). *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy . Circulation 101 , 2981 – 8;***
9. **Yaoita , H. , Ogawa , K. , Maehara , K. , and Maruyama , Y. (1998). *Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor . Circulation 97 , 276 – 81;***
10. **Alexandra G. Evstačeva, George A. Belov, Markus Kalkum, Nina V. Chichkova, Alexey A. Bogdanov, Vadim I. Agol, Andrey B.**

- Vartapetiana Prothymosin α fragmentation in apoptosis FEBS Letters 467 (2000) 150-154;*
11. *Ueda H., Fujita R., Yoshida A., Matsunaga H, and Ueda M. Identification of prothymosin- α 1, the necrosis–apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures JCB, 2007 853–862;*
 12. *Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. Prothymosin alpha: isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1008 –11;*
 13. *Goodall GJ, Dominguez F, Horecker BL. Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:8926–8;*
 14. *Franco FJ, Diaz C, Barcia M, Freire M. Thymosin a-1 is a native peptide in several tissues. Biochim Biophys Acta 1992;1120:43– 8;*
 15. *Freire M, Rey-Mendez M, Gomez-Marquez J, Arias P. Evidence for the synthesis of thymosin alpha 1 by calf thymocytes and the production this peptide by natural processing. Arch Biochem Biophys 1985;239:480 –5;*
 16. *Frillingos S, Seferiadis K, Papanastasiou M, Baxevanis CN, Frangou-Lazaridis M, Economou M. Appearance of thymosin α -1 in supernatants of monocytes incubated with prothymosin alpha. Arch Biochem Biophys 1992;296:256–63;*
 17. *Segade, F. & J. Gomez-Marquez. 1999. Molecules in focus: prothymosin alpha. Int. J. Biochem. Cell Biol. 3: 1241–1246;*
 18. *Hannappel, E. & T. Huff. 2003. The thymosins, prothymosin alpha, parathymosin, and alpha-thymosins: structure and function. Vitam. Horm. 66: 257–295;*

19. Rubtsov YP, Zolotukhin AS, Vorobjev IA, Chichkova NV, Pavlov NA, Karger EM, Evstafieva AG, Felber BK, Vartapetian AB. *Mutational analysis of human prothymosin alpha reveals a bipartite nuclear localization signal. FEBS Lett* 1997;413:135– 41;
20. S. Gaubatz, A. Meichle and M. Eilers, *An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. Mol Cell Biol*, 14 (1994), pp. 3853–3862;
21. Moll J, Schmid P, Sansig G, van der Putten H. *The pattern of prothymosin alpha gene expression coincides with that of myc proto-oncogenes during mouse embryogenesis. Histochem J.* 1996 Jan;28(1):45-52;
22. Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Sander LE, Gusella GL, He C, Blander JM, Klotman P, Klotman ME *Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 1;107(22):10178-83;
23. Gomez-Marquez, J & P. Rodriguez. 1998. *Prothymosin alpha is a chromatin remodelling protein in mammalian cells. Biochem. J.* 333: 1–3;
24. Enkemann, S., R. Ward & S.L. Berger. 2000. *Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of Prothymosin-alpha. J. Histochem. Cytochem.* 48: 1341–1355;
25. Karetsoy, Z. Karetsoy Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T 2002. *Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. EMBO Rep.* 3: 361–366;
26. Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES. 2002. *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha*

- interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. J. Virol. 76: 4699–4708;*
27. Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB. 2005. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol. Cell Biol. 25: 1089–1099;*
28. Lal A, Kawai T, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M. 2005. Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *EMBO J. 24: 1852–1862;*
29. C. Panneerselvam, A.A. Haritos, J. Caldarella and B.L. Horecker, Prothymosin alpha in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA, 84 (1987), pp. 4465–4469;*
30. F J Franco, C Diaz, M Barcia, P Arias, J Gomez-Marquez, F Soriano, E Mendez, and M Freire Synthesis and apparent secretion of prothymosin alpha by different subpopulations of calf and rat thymocytes. *Immunology. 1989 June; 67(2): 263–268;*
31. Matsunaga H, Ueda H. Stress-induced non-vesicular release of prothymosin- α initiated by an interaction with S100A13, and its blockade by caspase-3 cleavage. *Cell Death Differ. 2010 Nov;17(11):1760-72;*
32. Liang GY, Cai QY, Niu YM, Zheng H, Gao ZY, Liu DX, Xu G. Cardiac glucose uptake and suppressed expression/translocation of myocardium glucose transport-4 in dogs undergoing ischemia-reperfusion. *Exp Biol Med (Maywood). 2008 Sep;233(9):1142-8;*

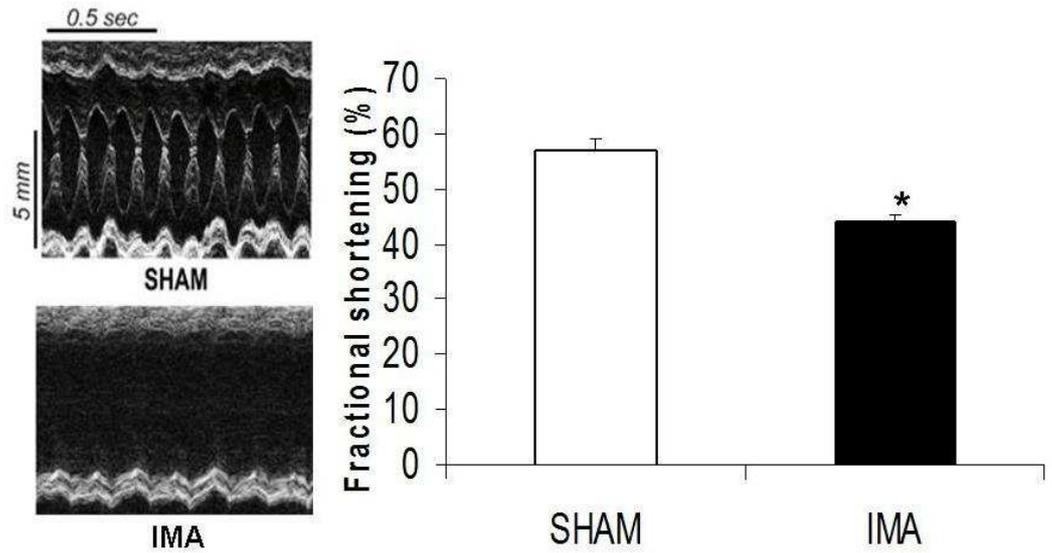
33. Kong L, Andrassy M, Chang JS, Huang C, Asai T, Szabolcs MJ, Homma S, Liu R, Zou YS, Leitges M, Yan SD, Ramasamy R, Schmidt AM, Yan SF. *PKC beta modulates ischemia-reperfusion injury in the heart* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr;294(4):H1862-70;
34. Ahuja P, Zhao P, Angelis E, Ruan H, Korge P, Olson A, Wang Y, Jin ES, Jeffrey FM, Portman M, Maclellan WR. *Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice.* *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1494-5059;
35. Bueno , O. F. , De Windt , L. J. , Tymitz , K. M. , Witt , S. A. , Kimball , T. R. , Klevitsky , R. , Hewett , T. E. , Jones , S. P. , Lefer , D. J. , Peng , C. F. , Kitsis , R. N. , and Molkentin , J. D. (2000). *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice . Embo J* 19 , 6341 – 50;
36. Yue , T. L. , Wang , C. , Gu , J. L. , Ma , X. L. , Kumar , S. , Lee , J. C. , Feuerstein , G. Z. , Thomas, H. , Maleeff , B. , and Ohlstein , E. H. (2000). *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart . Circ Res* 86 , 692 – 9;
37. Zhu X, Zhao H, Graveline AR, Buys ES, Schmidt U, Bloch KD, Rosenzweig A, Chao W. *MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Oct;291(4):H1900-9;

38. **Lombardo E, Alvarez-Barrientos A, Maroto B, Boscá L, Knaus UG. *TLR4-mediated survival of macrophages is MyD88 dependent and requires TNF-alpha autocrine signalling. J Immunol. 2007 Mar 15;178(6):3731-9;***
39. **Kurt-Jones EA, Sandor F, Ortiz Y, Bowen GN, Counter SL, Wang TC, Finberg RW. *Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. J Endotoxin Res. 2004;10(6):419-24;***
40. **Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. *Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):32552-60.***

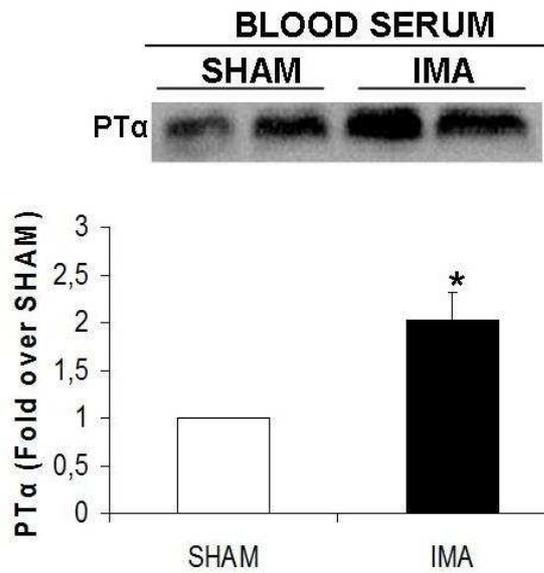
7. FIGURE

Figura 1

A



B



C

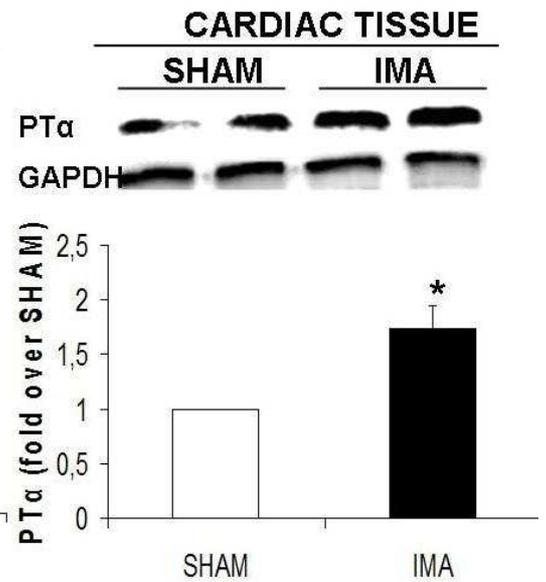


Figura 2

A

SHAM

IMA

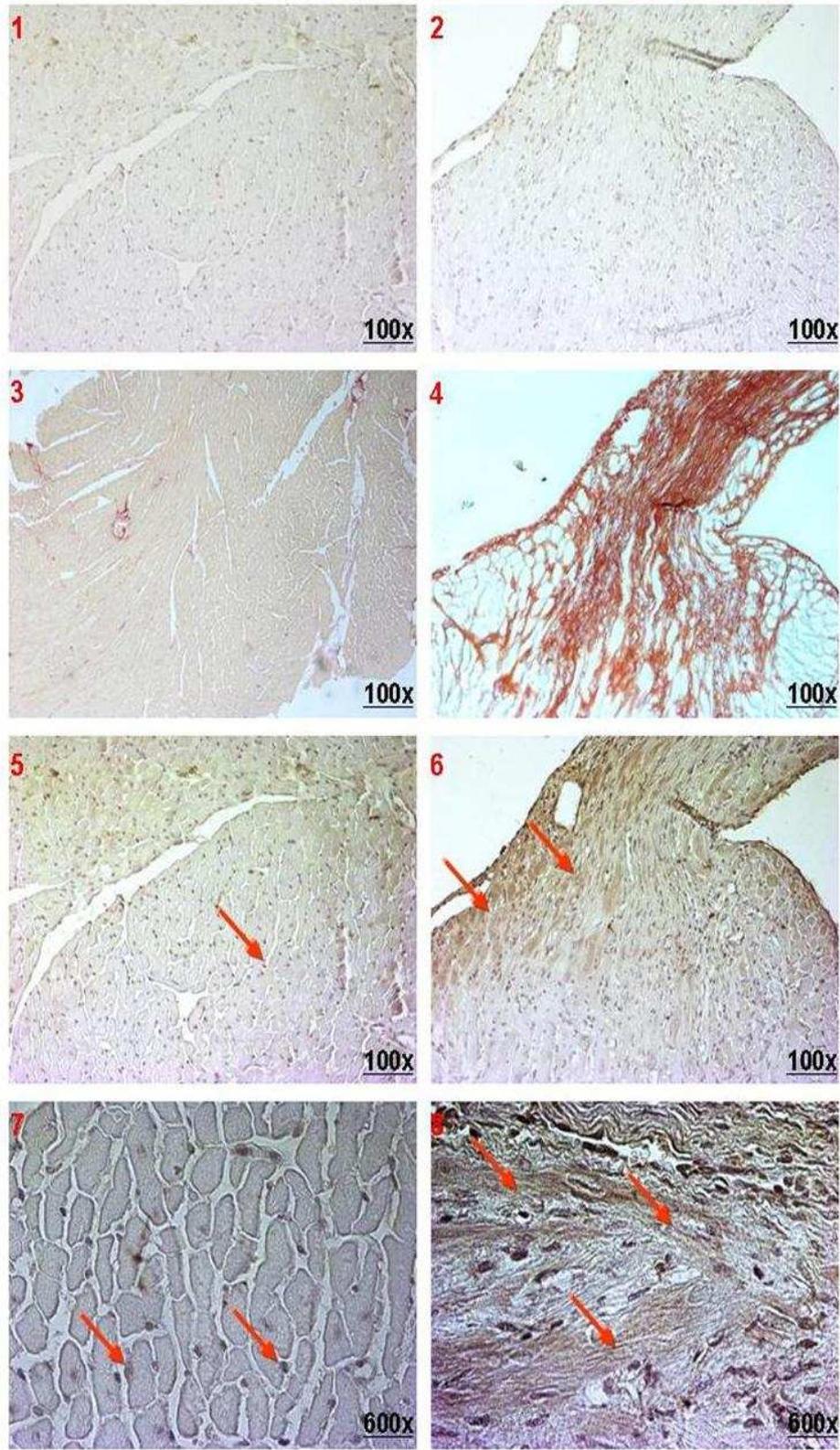
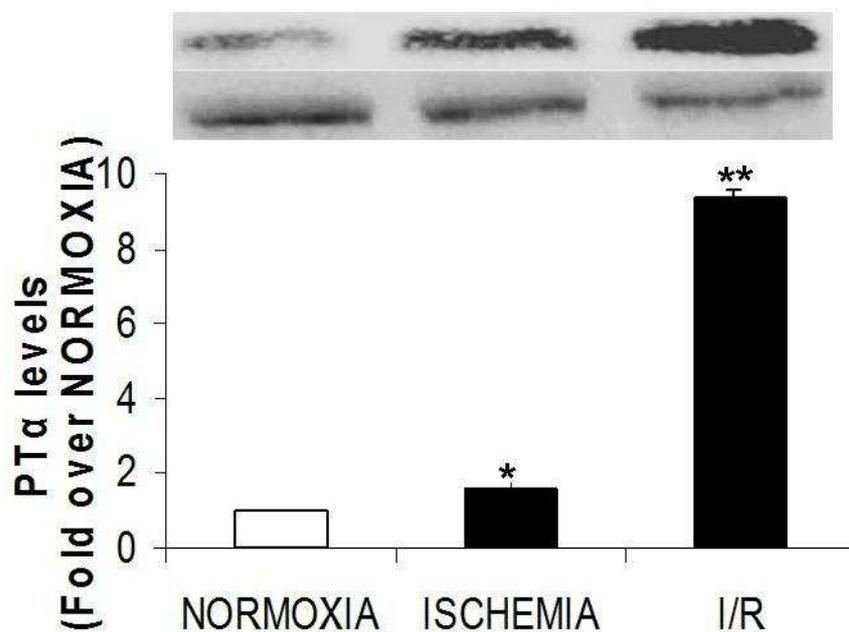


Figura 3

A



B

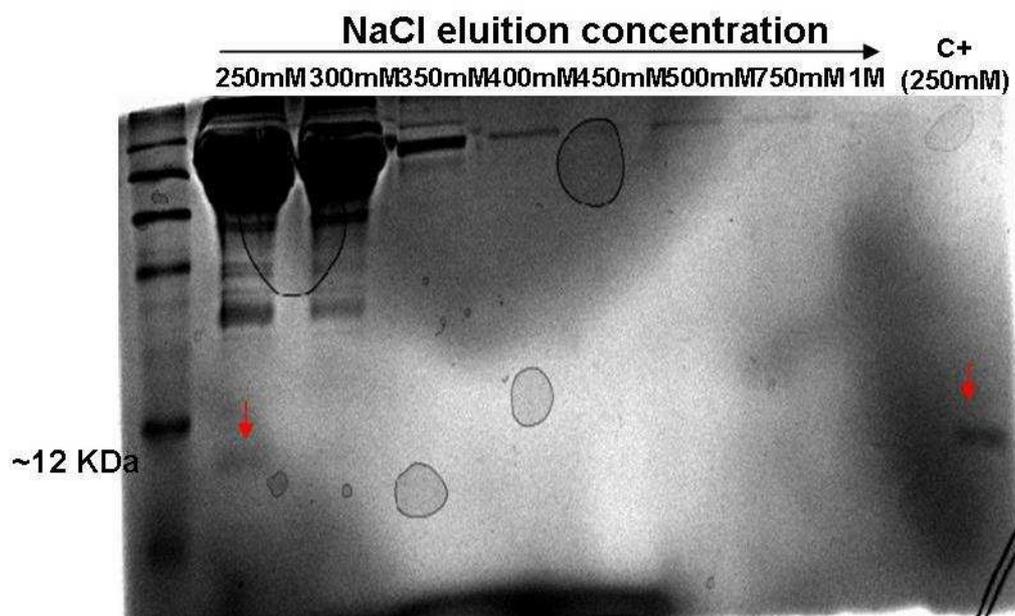
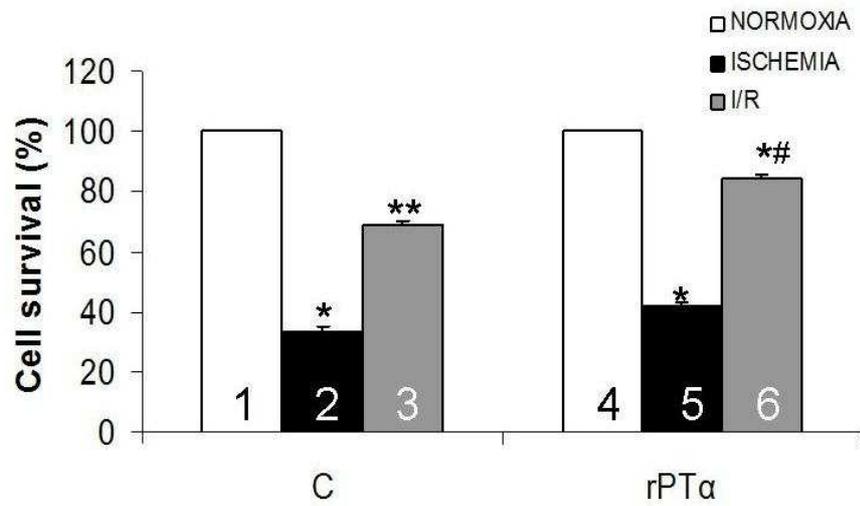


Figura 4

A



B

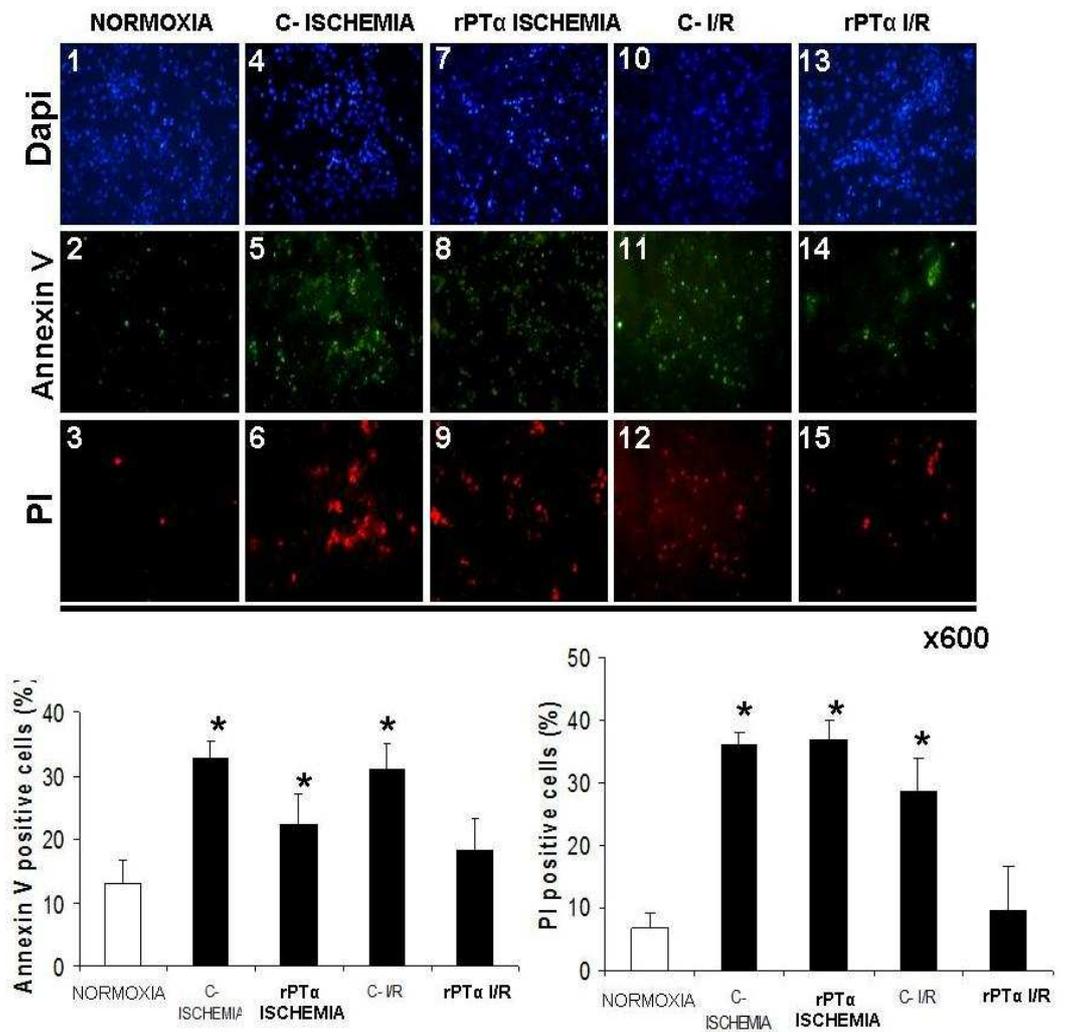


Figura 5

A

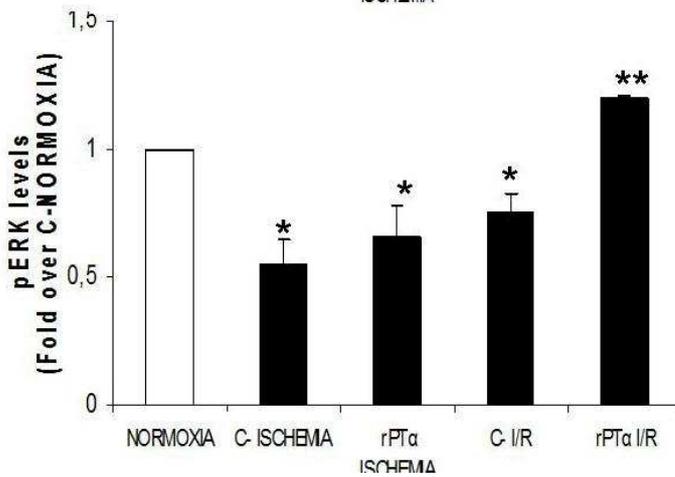
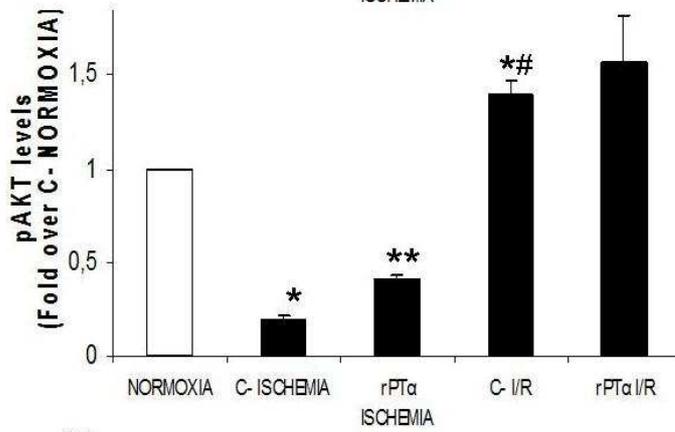
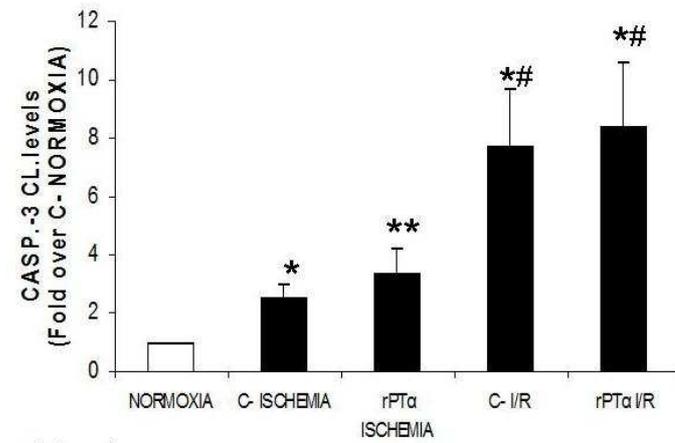
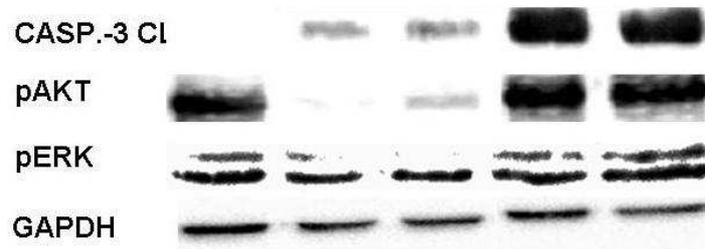


Figura 6

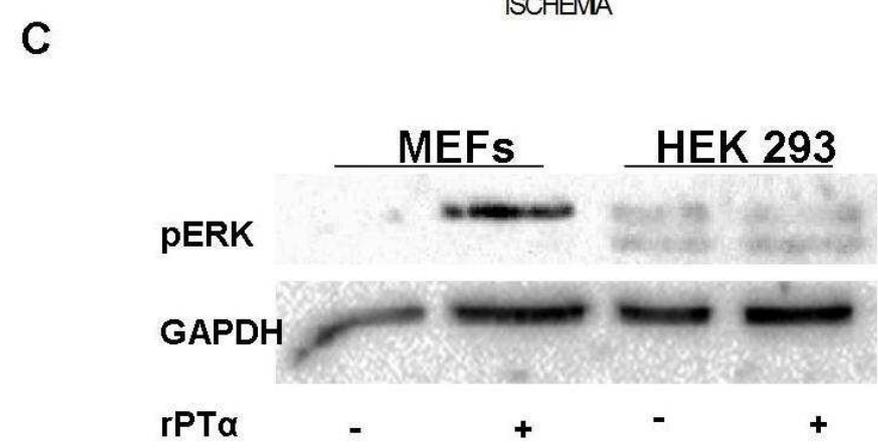
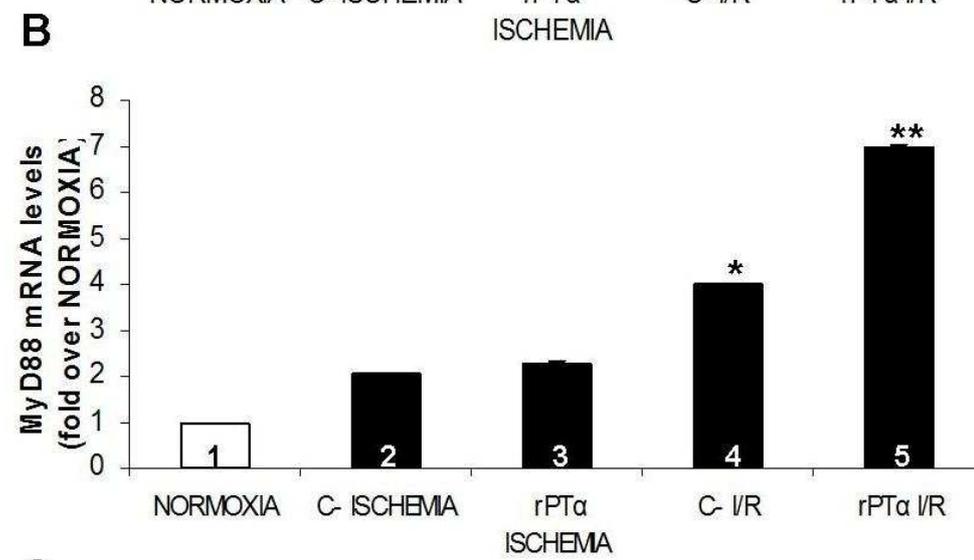
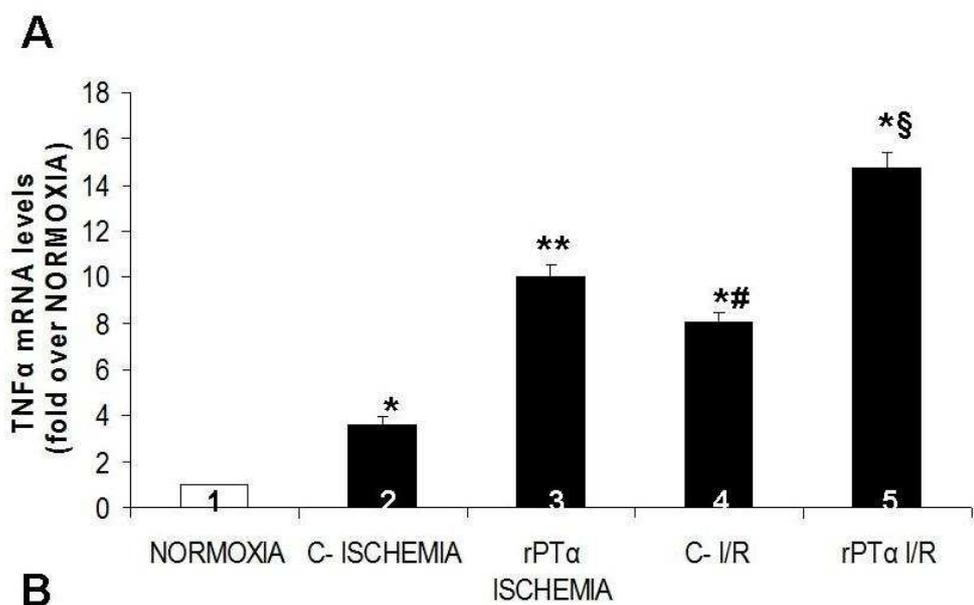
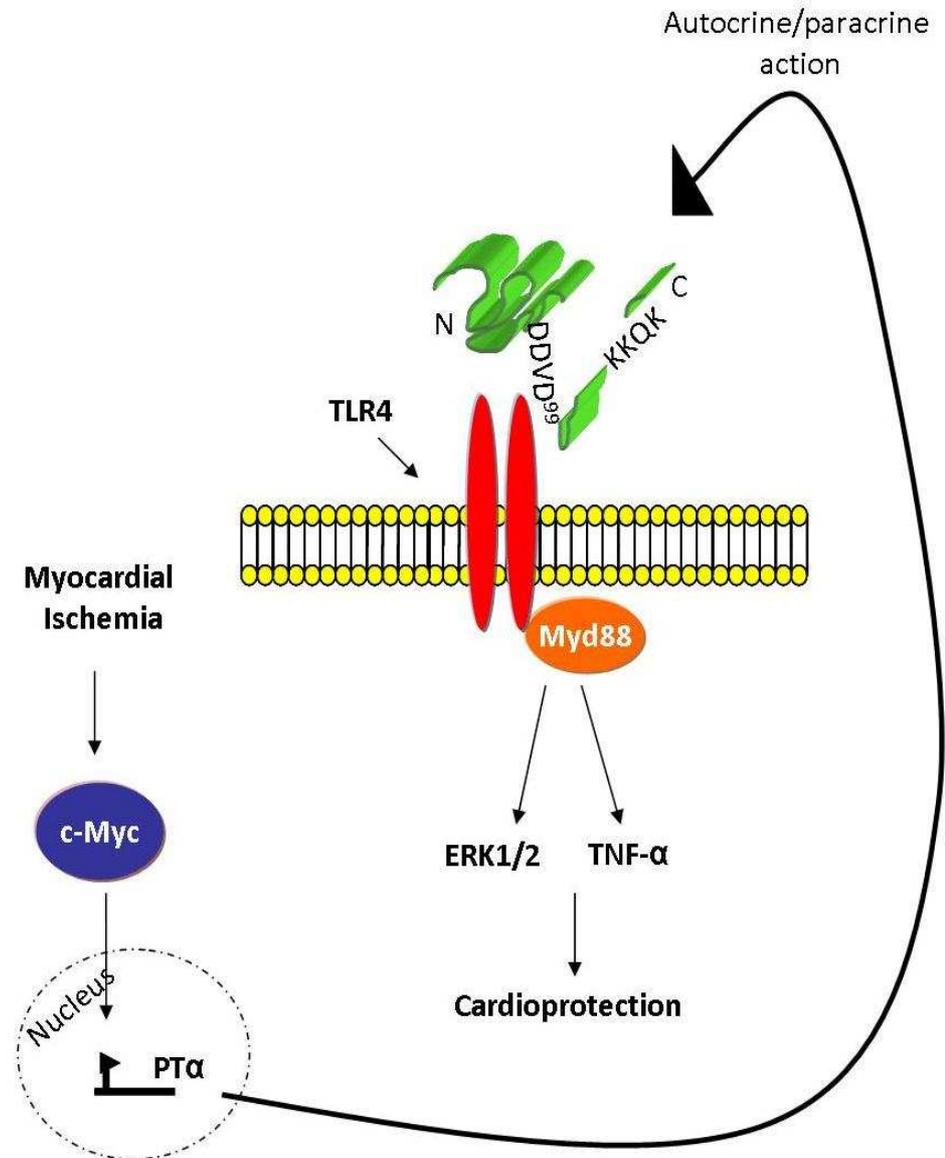


Figura 7

A



8. LEGENDA ALLE FIGURE

Figura 1

I livelli di PT α aumentano in risposta all'infarto acuto del miocardio

- A. Sinistra.** Tracciato ecocardiografico seriale M-Mode rappresentativo di topi SHAM e IMA. **Right.** Grafico mostrante la % di frazione di accorciamento di topi SHAM e IMA (% FS IMA vs SHAM: 47 ± 0.8 vs 58 ± 0.8 ; * $p < 0.05$ vs. SHAM; n=7 cuore/gruppo);
- B.** Immunoblot rappresentativi e analisi densitometrica di esperimenti multipli e indipendenti per valutare i livelli di PT α nel siero di topi SHAM e IMA (PT α levels fold over SHAM, IMA: 2.01 ± 0.51 ; * $p < 0.05$ vs. SHAM).
- C.** Immunoblot rappresentativi e analisi densitometrica di esperimenti multipli e indipendenti per valutare i livelli di PT α in lisati di ventricolo sinistro da cuori di topi SHAM e IMA. (PT α levels fold over SHAM, IMA: 1.73 ± 0.21 ; * $p < 0.05$ vs. SHAM; n=7 hearts/group)

Figura 2

L'ischemia del miocardio causa la perdita della localizzazione nucleare della PT α

- A.** Pannelli istologici rappresentativi di sezioni cardiache di cuori di topi SHAM e IMA. Panelli 1-2: senza anticorpo (magnificazione x100). Panelli 3-4: Colorazione con Picro-sirio rosso (magnificazione x100). Panelli 5-6: Immunoistochimica per PT α (magnificazione x100). Panelli 7-8: Immunoistochimica per PT α (magnificazione x400).

Figura 3

Incremento dei livelli e della secrezione *in vitro* della PT α in risposta all'ischemia e all'I/R

- A.** Grafici mostranti esperimenti multipli e indipendenti di immunoblot per valutare i livelli di di PT α nei cardiomiociti neonatali di ratto in seguito a NORMOSSIA, ISCHEMIA e I/R (PT α levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 1.59 ± 0.19 ; I/R: 9.38 ± 0.08 ; $p < 0.05$ * $p < 0.05$ vs NORMOXIA; ** $p < 0.05$ vs NORMOXIA and ISCHEMIA);
- B.** Colorazione con blu di coomassie di un gel SDS-PAGE del surnatante di cardiomiociti ischemici soggetto a cromatografia DEAE al fine di valutare la presenza della PT α . Le proteine legate alla colonna cromatografica sono state eluite con differenti concentrazioni di NaCl (da 250 mM a 1 M). La presenza della PT α è stata valutata rispetto al punto di eluizione e al peso molecolare del rispettivo controllo positivo.

Figura 4

Ruolo cardioprotettivo della PT α

- A.** Grafici rappresentativi mostranti saggi MTT multipli ed indipendenti effettuati su cardiomiociti neonatali di ratto, controllo and trattato con rPT α (160 nM) in seguito a NORMOSSIA, ISCHEMIA e I/R (* $p < 0.05$ vs 1 and 4; ** $p < 0.05$ vs 1,2,4 and 5; *# $p < 0.05$ vs all).
- B.** Colorazioni rappresentative con DAPI (pannelli superiori), Annexin V (pannelli centrali) e PI (pannelli inferiori) (magnificazione x600) e grafici mostranti la % di cellule positivi al marcatore Annexin V o PI, di cardiomiociti neonatali di ratto, controllo e trattato con rPT α (160 nM) in seguito a NORMOXIA, ISCHEMIA e I/R (% Annexin V: * $p < 0.05$ vs NORMOXIA; % PI: * $p < 0.05$ vs NORMOXIA).

Figura 5

A. Immunoblot rappresentativi (pannelli superiori) e analisi densitometrica (pannelli inferiori) di esperimenti multipli ed indipendenti in cardiomiociti neonatali di ratto, controllo e trattato con rPT α (160 nM), in seguito a NORMOXIA, ISCHEMIA e I/R, per valutare: caspase 3 clivata/attivazione (CASP.-3 CL. levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 2.5 ± 0.44 ; ISCHEMIA + rPT α : 3.4 ± 0.8 ; I/R: 7.7 ± 1.9 ; I/R + rPT α 8.3 ± 2.2 ; * $p < 0.05$ vs NORMOXIA, ** $p < 0.05$ vs NORMOXIA and ISCHEMIA, * $\#p < 0.05$ vs all), pAKT (pAKT levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 0.19 ± 0.01 ; ISCHEMIA + rPT α : 0.4 ± 0.02 ; I/R: 1.39 ± 0.07 ; I/R + rPT α 1.56 ± 0.25 ; * $p < 0.05$ vs NORMOXIA, ** $p < 0.05$ vs ISCHEMIA, * $\#p < 0.05$ vs all) e pERK (pERK levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 0.54 ± 0.09 ; ISCHEMIA + rPT α : 0.65 ± 0.12 ; I/R: 0.75 ± 0.06 ; I/R + rPT α 1.2 ± 0.01 ; * $p < 0.05$ vs NORMOXIA, ** $p < 0.05$ vs all).

Figura 6

Prova indiretta della formazione del sistema PT α /TLR4 che responsabile dell'effetto cardioprotettivo

- A.** Grafici mostranti esperimenti multipli e indipendenti di Real-time PCR per valutare i livelli di mRNA del TNF- α in cardiomiociti neonatali di ratto, controllo e trattato con rPT α (160 nM), in seguito a NORMOXIA, ISCHEMIA and I/R (TNF- α mRNA levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 3.63 ± 0.3 ; ISCHEMIA + rPT α : 10.03 ± 0.47 ; I/R: 8.05 ± 0.43 ; I/R + rPT α 14.77 ± 0.59 ; * $p < 0.01$ vs 1, ** $p < 0.01$ vs 1 and 2, * $\#p < 0.05$ vs 1,2 and 3, * $\$p < 0.01$ vs all);
- B.** Grafici mostranti esperimenti multipli e indipendenti di Real-time PCR per valutare i livelli di mRNA di Myd88 in cardiomiociti neonatali di ratto,

controllo e trattato con rPT α (160 nM), in seguito a NORMOXIA, ISCHEMIA and I/R (Myd88 mRNA levels fold over NORMOXIA, ISCHEMIA: 2.03 ± 0.03 ; ISCHEMIA + rPT α : 2.26 ± 0.08 ; I/R: 3.99 ± 0.03 ; I/R + rPT α 6.98 ± 0.03 ; * $p < 0.05$ vs 1,2 and 3, ** $p < 0.01$ vs all);

- C. Immunoblot rappresentativi di esperimenti multipli ed indipendenti per valutare I livelli di attivazione di ERK 1/2 in seguito a trattamento con rPT α (160 nM) in cellule MEF e HEK293.

Figura 7

Meccanismo cardioprotettivo ipotizzato

In seguito al danno ischemico, i livelli di espressione della proteina c-Myc sono incrementati con un conseguente effetto sull'espressione della PT α .

La PT α viene secreta dai cardiomiociti dove con un meccanismo autocrino/paracrino attiva il recettore TLR4 con l'attivazione della via di segnalazione protettiva mediata da Myd88.