

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biochimica

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinari di afferenza: BIO/10

TITOLO TESI

**Trasduzione del segnale e poliamine
nell'apoptosi di cellule cardiache**

Presentata da: Silvia Cetrullo

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Giorgio Lenaz

Chiar.mo Prof. Flavio Flamigni

Esame finale anno 2009

Sommario

ABBREVIAZIONI	4
INTRODUZIONE	7
1.0 LE POLIAMINE	8
1.1 IL METABOLISMO DELLE POLIAMINE	9
1.1.1 <i>La biosintesi</i>	9
1.1.2 <i>Il catabolismo</i>	10
1.1.3 <i>Il trasporto</i>	11
1.2 RUOLI CELLULARI DELLE POLIAMINE	12
1.2.1 <i>Poliamine e proliferazione cellulare</i>	13
1.2.2 <i>Poliamine e morte cellulare</i>	14
2.0 L' APOPTOSI	16
2.1 ALTERAZIONI MORFOLOGICHE E BIOCHIMICHE	16
2.2 LE VIE ED I MODULATORI	18
3.0 L' APOPTOSI NEL CUORE	24
3.1 L' ISCHEMIA CARDIACA	24
3.2 L' INSUFFICIENZA CARDIACA	26
3.2.1 <i>L' attivazione neuro-ormonale</i>	27
3.3 VIE DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE ED APOPTOSI NEL CUORE	29
4.0 LE POLIAMINE ED IL CUORE	31
PARTE SPERIMENTALE	34
1.0 PREMESSE E SCOPO DELLA TESI	35
2.0 MATERIALI E METODI	37
2.1 <i>Colture cellulari</i>	37
2.2 <i>Ischemia simulata</i>	38
2.3 <i>Determinazione delle proteine</i>	38
2.4 <i>Determinazione dell' attività caspatica</i>	38
2.5 <i>Frammentazione del DNA</i>	40
2.6 <i>Dosaggio dell' attività ornitina-decarbossilasica</i>	41
2.7 <i>Dosaggio delle poliamine</i>	41
2.8 <i>Dosaggio immunocitochimico del citocromo c</i>	41
2.9 <i>Western blotting</i>	42
2.10 <i>Analisi statistica</i>	42
3.0 RISULTATI	43
3.1 RUOLO DELLE POLIAMINE NELL' APOPTOSI INDOTTA DA ISCHEMIA SIMULATA NELLE CELLULE H9c2.....	43
3.1.1 <i>Il DFMO protegge dall' apoptosi indotta da ischemia simulata le cellule H9c2</i>	44
3.1.2 <i>L' ischemia simulata altera il contenuto intracellulare di poliamine</i>	47
3.1.3 <i>Le poliamine influenzano la via intrinseca di attivazione dell' apoptosi nelle cellule H9c2 sottoposte ad ischemia simulata</i>	48
3.2 MECCANISMI DI DANNO CELLULARE INDOTTO DA STIMOLI NEURO-ORMONALI IN CARDIOMIOCITI NEONATALI DI RATTO. RUOLO DELLE POLIAMINE	51

3.2.1	<i>La norepinefrina e l'aldosterone alterano il metabolismo delle poliamine.....</i>	51
3.2.2	<i>La norepinefrina e l'aldosterone inducono un aumento dell'attività caspasi. Effetto del DFMO...</i>	51
3.2.3	<i>Effetto della norepinefrina, dell'aldosterone e del DFMO sull'espressione della survivina.....</i>	53
3.2.4	<i>Il DFMO altera la trasduzione del segnale indotta dalla norepinefrina.....</i>	54
3.2.5	<i>Il trattamento con un induttore dell'AMPK e un inibitore dell'Akt causa morte cellulare in cellule H9c2</i>	55
3.2.6	<i>Il DFMO modula l'espressione delle fosfatasi coinvolte nella disattivazione dell'Akt e dell'AMPK .</i>	56
4.0	DISCUSSIONE	57
	BIBLIOGRAFIA	63

Abbreviazioni

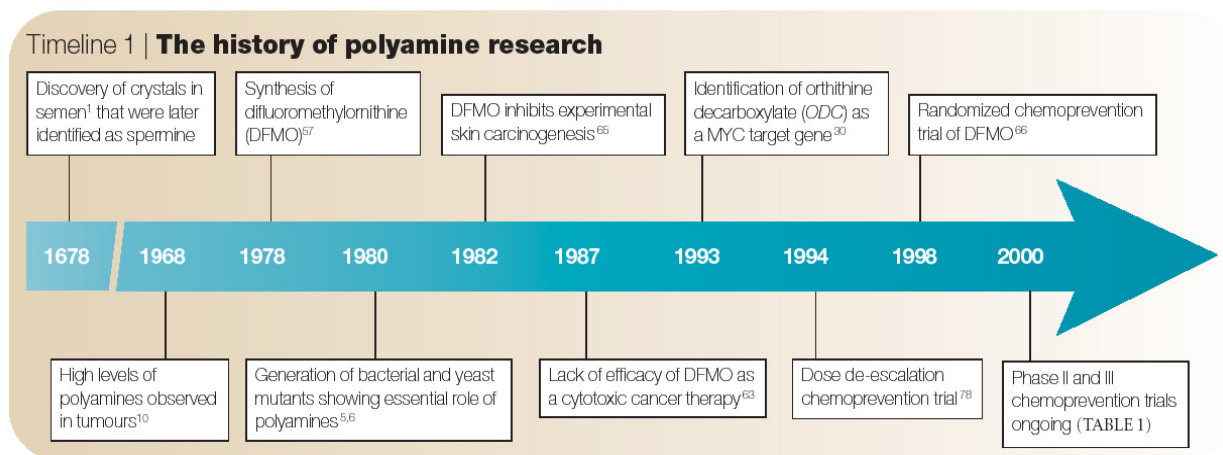
ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>
AMPK:	Chinasi attivata dall'AMP
ANP:	Peptide natriuretico atriale
ANT:	<i>Adenine nucleotide traslocator</i>
Apaf-1:	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
AZ:	Antizima
AZI:	Inibitore dell'antizima
CARD:	<i>Aminoterminal caspase recruitment domain</i>
DD:	Dominio di morte
DED:	Dominio effettore di morte
DFMO:	α -difluorometilornitina
DR:	Recettore di morte
IAP:	Proteina inibitrice dell'apoptosi
LPS:	Lipopolisaccaride
LY:	LY294002
MAPK:	Proteina chinasi attivata da mitogeno
β -MHC:	Catena pesante della miosina β
NF-kB:	Fattore nucleare kB
NO:	Ossido nitrico
NOS:	Ossidonitrico-sintasi
NOD:	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ODC:	Ornitina decarbossilasi
PAO:	Poliamminossidasi
PTPC:	<i>Permeability transition pore complex</i>

ROS:	Specie reattive dell'ossigeno
sGC:	Guanilato ciclastasi solubile
SMO:	Spermina ossidasi
SSAT:	Spermina/spermidina-N-acetiltransferasi
TNF:	Fattore di necrosi tumorale
VDAC:	<i>Voltage-dependent anion channel</i>

Introduzione

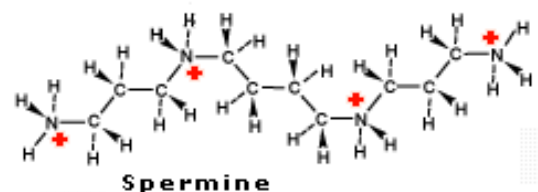
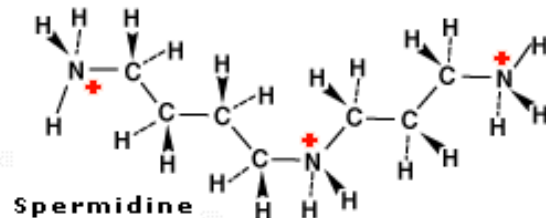
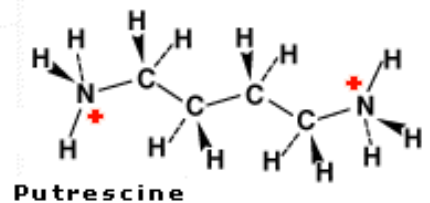
1.0 Le poliamine

Nonostante siano state isolate per la prima volta più di 300 anni fa, la poliamine hanno cominciato a suscitare l'interesse della ricerca solo intorno al 1970. Da allora moltissimi lavori hanno evidenziato il loro coinvolgimento in tutti gli aspetti del metabolismo cellulare, sottolineando quindi l'importanza del loro ruolo¹.



Il termine poliamine si riferisce generalmente alla spermina (una tetra-ammina), alla spermidina (una tri-ammina) ed alla putrescina (una di-ammina). Si tratta di componenti cellulari ubiquitarie con funzioni multiple, presenti in quasi tutte le specie viventi, sia eucariotiche che procariotiche, segno di un'alta conservazione durante l'evoluzione.

La concentrazione intracellulare totale delle poliamine è nell'ordine del millimolare, tuttavia la concentrazione di queste sostanze libere deve essere considerata molto più bassa poiché per la maggior parte esse si trovano legate a varie strutture cellulari². A pH fisiologico questi composti sono infatti carichi positivamente ed alcune loro azioni a livello cellulare sono il risultato diretto dell'interazione delle loro cariche con altre di segno opposto. La complessità della sintesi e del loro metabolismo, e

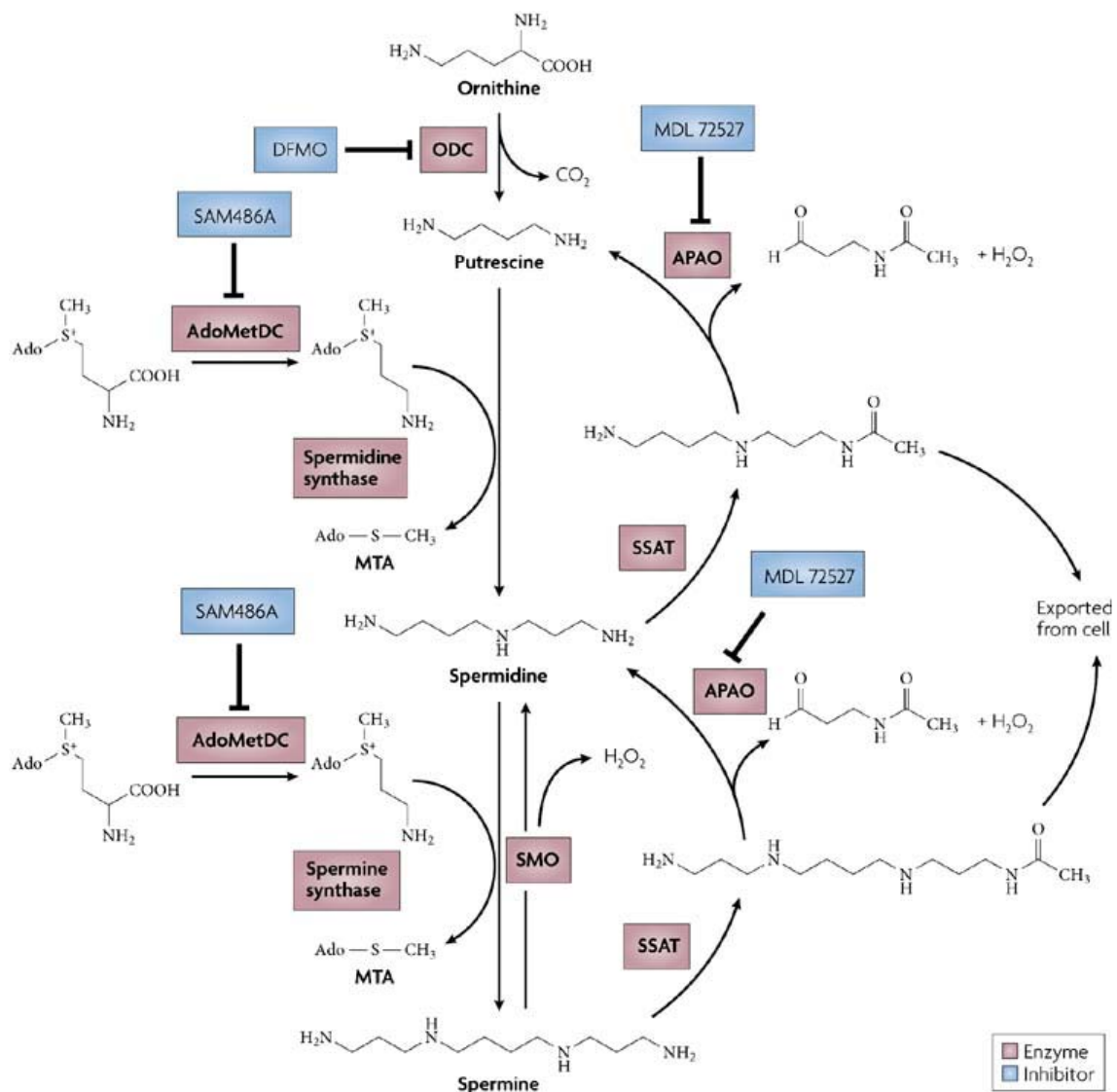


l'intricato controllo della loro omeostasi evidenziano il ruolo critico che queste sostanze rivestono nella cellula³.

1.1 Il metabolismo delle poliamine

1.1.1 La biosintesi

Nelle cellule eucariotiche le poliamine sono sintetizzate a partire dagli aminoacidi L-arginina e L-metionina attraverso una serie di sei reazioni enzimatiche interdipendenti. Infatti dall'arginina, per azione dell'arginasi, deriva l'ornitina, precursore della putrescina, mentre la metionina ha il ruolo di donatore di gruppi propil-amminici per la successiva biosintesi di spermidina e spermina.



Dalla decarbossilazione della ornitina, reazione catalizzata dall'enzima ornitina decarbossilasi (ODC), si forma la putrescina. Questa viene successivamente convertita in spermidina e poi in spermina in due successive reazioni catalizzate da aminopropiltransferasi, chiamate rispettivamente spermidina- e spermina-sintasi. Questi sono enzimi stabili espressi costitutivamente⁴. Sono attivi come omodimeri: la spermidina-sintasi ha una massa molecolare di 36 kDa, mentre la spermina-sintasi consiste di due subunità di 44 kDa. L'attività di questi enzimi è regolata dalla disponibilità del loro substrato ed entrambi richiedono come donatore del gruppo propilamminico la S-adenosilmetionina decarbossilata, che è generata dalla reazione di decarbossilazione della S-adenosilmetionina catalizzata dall'enzima S-adenosilmetionina-decarbossilasi (SAM-DC).

Le decarbossilasi (ODC e SAM-DC) sono presenti nelle cellule in quantità ridottissima, hanno un tempo di emivita molto breve e sono altamente inducibili. Grazie a questa proprietà possono regolare la sintesi delle poliamine e permettere alle cellule di rispondere a vari stimoli con un rapido incremento della sintesi delle poliamine stesse.

La prima reazione, limitante per la biosintesi delle poliamine consiste quindi nella produzione di putrescina da parte dell'enzima ODC. Esso richiede piridossal-fosfato come cofattore ed inoltre per la sua attività sono necessari agenti riducenti contenenti gruppi tiolici. L'espressione di questo enzima è sottilmente regolata da diverse tappe, sia a livello trascrizionale, che a livello di modificazioni post-trasduzionali⁵⁻². L'ODC è attiva come omodimero con un tempo di emivita di appena 10-30 minuti, e va incontro a degradazione da parte del proteosoma 26S. Tuttavia, a differenza di molte altre proteine che subiscono la degradazione proteosomiale, l'ODC non viene prima ubiquitinata, ma una proteina regolatoria specifica, detta ODC-Antizima (AZ), interagisce con la forma monometrica dell'enzima, presentandola al proteosoma per la distruzione. L'ODC può essere rilasciata dal complesso ODC-AZ grazie ad un'altra proteina, chiamata "inibitore dell'antizima" (AZI), attiva in presenza di fattori di crescita e che si lega ad AZ con un'affinità molto maggiore dell'ODC⁶. A livello invece trascrizionale, sappiamo che l'ODC è *target* dell'oncogene MYC, il che dimostra uno stretto legame tra le poliamine e le vie che promuovono la crescita cellulare.

1.1.2 Il catabolismo

Sebbene le reazioni di biosintesi delle poliamine siano irreversibili, esiste una via di interconversione che porta alla formazione di spermidina dalla spermina e di putrescina dalla spermidina. Il processo di interconversione si può interpretare come un meccanismo messo in atto dalla cellula per prevenire accumuli troppo elevati di spermina e spermidina.

Il fattore limitante in questo processo di interconversione, è l'attività della spermina/spermidina N¹-acetiltransferasi (SSAT), che normalmente è molto bassa, ma che

può essere indotta, ad esempio, dalla somministrazione di poliamine esogene. Questo enzima usa acetil-CoA per formare N¹-acetil-spermidina e N¹-acetil-spermina, che sono quindi substrati della N¹-acetil poliaminossidasi (PAO) per formare rispettivamente spermidina e putrescina⁷. La SSAT è un enzima citosolico, originariamente identificato come omodimero, ma ora ritenuto un tetramero dalla massa di 80 KDa. La SSAT ha molte caratteristiche in comune con l'ODC: ha breve emivita (20-40 min), è altamente regolato a diversi livelli ed è velocemente inducibile. Il significato delle poliamine acetilate è attualmente oggetto di studio ed in particolare non è chiaro se siano forme di escrezione o sostanze metabolicamente attive. Un'ipotesi è che l'acetilazione possa servire a neutralizzare parte delle proprietà dovute alla carica positiva delle poliamine, considerando che questa reazione priva la molecola di una sua carica. Inoltre la forma acetilata delle poliamine potrebbe passare più facilmente attraverso le membrane, pertanto questo meccanismo potrebbe rappresentare un mezzo per favorire la loro escrezione dalla cellula. Le poliamine acetilate sono raramente presenti nelle cellule normali, mentre si trovano in alte concentrazione nelle cellule tumorali, correlando pertanto le alterazioni del metabolismo delle poliamine con il processo di cancerogenesi⁸⁻⁹.

La seconda fase di questa via catabolica è svolta dalla PAO. Questo enzima è costitutivamente attivo, presente a livello dei perossisomi e, dalla reazione che catalizza, oltre a spermidina e spermina sono prodotti anche 3-acetaminopropanale ed acqua ossigenata.

Più recentemente è stata scoperta l'esistenza di una spermina ossidasi (SMO) inducibile localizzata a livello citosolico, che catalizza l'ossidazione della spermina direttamente a spermidina producendo acqua ossigenata. Questo enzima sta suscitando molto interesse in quanto sembra svolgere un ruolo particolarmente importante nei processi infiammatori ed in generale nelle patologie legate allo stress ossidativo¹⁰.

1.1.3 Il trasporto

Sebbene la sintesi de novo sia la via prevalente di produzione delle poliamine, anche il trasporto tra l'interno e l'esterno della cellula contribuisce all'omeostasi di queste ultime.

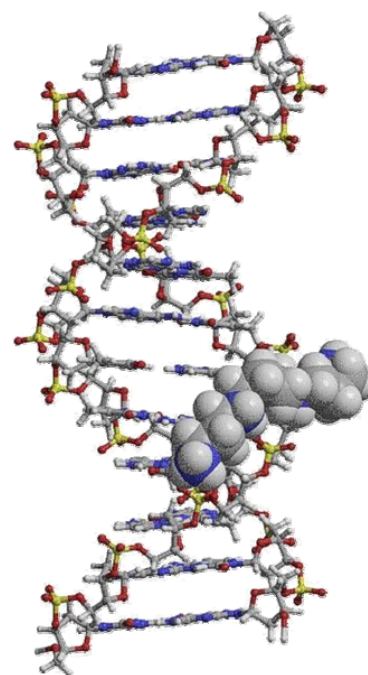
Inoltre le poliamine preformate possono derivare sia dalla dieta sia dalla flora batterica, ma non è ancora nota la loro biodisponibilità¹¹.

Il processo di uptake delle poliamine è realizzato da alcuni *carrier* in maniera energia-dipendente e saturabile. La maggior parte delle cellule sembra avere due tipi di *carrier*, uno con affinità per la putrescina e uno per la spermidina e la spermina¹². Invece il trasporto verso l'esterno è un processo selettivo, regolato dallo stato di crescita delle cellule: è

innescato dalla diminuzione della velocità della crescita e interrotto dallo stimolo contrario¹³.

1.2 Ruoli cellulari delle poliamine

Come già accennato, le poliamine risultano prendere parte alle funzioni cellulari a diversi livelli. Queste sostanze infatti influenzano l'attività fisiologica di vari enzimi, organelli e sistemi biologici in vitro, legandosi attraverso interazioni elettrostatiche, ad acidi nucleici, proteine e fosfolipidi, contenenti gruppi carichi negativamente, o anche tramite legami idrogeno ed interazioni idrofobiche. In particolare, la distribuzione di carica della spermina rende tale policatione in grado di interagire con due gruppi fosforici in ciascun filamento di DNA, stabilizzando così la doppia elica contro la denaturazione termica o il danno da radiazioni, e partecipando alla formazione di strutture sovramolecolari più compatte del DNA, quali si hanno durante la mitosi. Grazie alla



loro capacità di legare direttamente il DNA e di modulare l'interazione DNA-proteine, le poliamine sono ormai classicamente conosciute come importanti mediatori della crescita e della divisione cellulare.

Le poliamine inoltre, stabilizzano anche strutture a doppia elica che si possono trovare nel RNA ribosomiale o in certi RNA transfer, mediante legami a siti specifici. Esperimenti condotti su cellule intatte e nuclei isolati hanno anche indicato che le poliamine svolgono un ruolo importante nella trascrizione di geni correlati alla crescita, come i proto-oncogeni c-myc e c-fos.

Inoltre, il fattore di inizio della traduzione eIF-5A contiene un aminoacido, l'ipusina, che si forma dalla lisina per aggiunta di un gruppo butilamminico donato dalla spermidina. Recentemente è stata riscontrata una correlazione tra la velocità di formazione dell'ipusina, dipendente dalla disponibilità di spermidina, e la crescita cellulare¹⁴.

Un'importante opportunità per raggiungere una maggiore comprensione dell'importanza delle poliamine a livello fisiologico e patologico, è rappresentata dalla realizzazione di modelli murini nei quali il contenuto di poliamine è stato perturbato a livello di alcuni tessuti attraverso l'espressione transgenica di proteine in grado di influenzare il metabolismo di queste sostanze. A questo riguardo molti modelli sperimentali sono attualmente disponibili e molti altri potrebbero in futuro essere sviluppati¹⁵.

1.2.1 Poliamine e proliferazione cellulare

Le poliamine sono regolatori bivalenti della funzione cellulare, promuovono la crescita o la morte cellulare a seconda dei segnali ambientali¹⁶.

E' stato recentemente dimostrato come le poliamine siano coinvolte anche nella regolazione del ciclo cellulare. Il ciclo cellulare, della durata di circa 16-20 h, è costituito da una serie di eventi che portano la cellula a dividersi. Quest'ultima passa attraverso una serie ordinata di fasi diverse denominate G1, S (replicazione del DNA), G2 e M (mitosi). Lo stato di quiescenza è detto G₀. Le fasi di transizione del ciclo cellulare sono regolate da proteine chinasi costituite da una subunità regolatrice e da una catalitica. Le subunità regolatrici sono dette cicline, si legano ad un sito specifico delle subunità catalitiche, dette cicline chinasi, attivandole. In questo modo le cicline, denominate A, B, D, e le rispettive chinasi aumentano e diminuiscono in modo regolato e coordinato durante la fase G1, S, G2, M del ciclo cellulare. L'attività delle cicline può essere modulata negativamente da proteine inibitrici quali p21, p27, p57. Numerosi stimoli come l'inibizione da contatto, la senescenza, il danneggiamento del DNA, inducono la sintesi di queste proteine inibitrici bloccando il ciclo cellulare¹⁷.

Studi recenti condotti "in vivo" su colture cellulari hanno dimostrato che durante il ciclo cellulare si verificano anche dei cambiamenti nell'attività di ODC e nella concentrazione delle poliamine. Infatti sembra che, in corrispondenza della fase di transizione G1/S, aumenti l'ODC e conseguentemente il contenuto di putrescina, la quale induce la cellula ad uscire dalla fase G1 antecedente la sintesi del DNA, risultando in tal modo essenziale per l'ingresso della cellula nella fase S. Oltre all'ODC anche l'attività della SSAT aumenta durante le fasi del ciclo cellulare. In particolare in corrispondenza della transizione S/G2. Una deplezione del contenuto di poliamine, in particolare in corrispondenza della fase G1, causa un accumulo delle proteine inibitrici p21, p27 e p53 con conseguente arresto della crescita.

A sostegno della correlazione tra poliamine e crescita cellulare, alcuni lavori indicano che alti livelli di poliamine, conseguenti ad un aumento della loro sintesi, sono presenti nelle cellule che costituiscono molti tumori solidi, dove l'ODC risulta essere sovraespressa, come pure in diverse manifestazioni precancerose e conseguentemente all'esposizione ad agenti cancerogeni chimici¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰⁻¹. Questi dati suggeriscono l'idea che l'ODC sia un proto-oncogene e, per tale motivo, è oggetto di studio per la chemioprevenzione²¹⁻²²⁻²³.

La notevole importanza delle poliamine nei processi di proliferazione cellulare e l'evidenza del coinvolgimento delle stesse nei processi di cancerogenesi, ha stimolato la ricerca nei confronti di inibitori specifici della loro biosintesi. L' α -difluorometilornitina (DFMO), inibitore irreversibile dell'ODC, è stato il primo composto effettivamente e razionalmente ideato con

il fine di diminuire il contenuto di poliamine nelle cellule²⁴. Il DFMO si lega al sito attivo dell'ODC, viene decarbossilato, ma resta legato covalentemente, e porta a rapida inattivazione dell'enzima. Il trattamento di cellule in coltura con DFMO determina la diminuzione del contenuto intracellulare della putrescina e della spermidina, evento che porta ad un rapido arresto della crescita. Il DFMO ha un effetto citostatico piuttosto che citotossico. Il trattamento con DFMO può avere effetti notevoli anche sul differenziamento di vari tipi cellulari: la somministrazione di DFMO o di altri inibitori ad animali da esperimento, porta ad una completa inibizione dello sviluppo embrionale allo stato di gastrulazione. E' stata inoltre dimostrata l'efficacia del DFMO come inibitore della crescita di vari tumori provocati sperimentalmente in animali. Tuttavia i tentativi di usare nell'uomo il DFMO come singolo agente antitumorale o in combinazione con altri antitumorali non hanno generalmente fornito risultati durevoli¹.

1.2.2 Poliamine e morte cellulare

Oltre ad essere coinvolte nei meccanismi che regolano la crescita cellulare, gli studi più recenti indicano un ruolo delle poliamine anche nel processo di morte cellulare per apoptosi²⁵⁻²⁶. Infatti, sempre maggiori evidenze indicano l'esistenza di una stretta correlazione tra questi policationi, gli eventi del ciclo cellulare e l'apoptosi. Questa correlazione è abbastanza complessa, e ancora non completamente chiarita.

L'inibizione della biosintesi delle poliamine può avere come risultato una protezione o una sensibilizzazione nei confronti di stimoli di morte, in relazione al tipo di cellula. Ad esempio, la deplezione di poliamine previene l'apoptosi indotta da un estratto di tè verde nelle cellule di carcinoma vescicale. D'altro canto, l'inibizione della biosintesi di poliamine risulta sensibilizzare numerose linee cellulari tumorali all'apoptosi indotta dal *tumor necrosis factor* (TNF- α)²⁷. Si è inoltre osservato che la deplezione di poliamine può accrescere o ridurre la suscettibilità all'apoptosi anche nello stesso tipo di cellule, in relazione allo stimolo di morte. E' stato dimostrato che nei fibroblasti trasformati di topo, carenti del gene relativo alla sintesi di spermina, la completa deplezione delle poliamine prodotta dal trattamento con DFMO, causa un aumento della morte cellulare provocata dalla radiazione ultravioletta, ma la inibisce quando gli stimoli induttori dell'apoptosi sono cicloesimide o etoposide²⁸.

Se è stato evidenziato che eccessivi livelli intracellulari di poliamine nelle cellule che ne hanno una sovra-produzione o che ne subiscono una somministrazione esogena, può indurre apoptosi, è stato anche dimostrato che la deplezione di poliamine ottenuta con l'uso di un inibitore specifico, come il DFMO ha un effetto citostatico sulle cellule, e molto difficilmente citotossico. Questo dato rappresenta sicuramente un problema nell'ottica dell'utilizzo di tali inibitori nella terapia antitumorale, ma al contrario può rappresentare un punto di forza in

relazione ad altri contesti patologici legati ad un eccesso di apoptosi, ad esempio malattie cardiovascolari²⁹ (la perdita di tessuto funzionale cardiaco è dovuta almeno in parte all'apoptosi dei cardiomiociti), terapie cellulari rigenerative scarsamente efficaci³⁰ (la maggior parte delle cellule staminali trapiantate va incontro ad apoptosi, limitando i potenziali benefici della terapia), l'osteoartrite³¹ (l'apoptosi dei condrociti contribuisce al danno della cartilagine articolare) ed altre condizioni patologiche.

In generale l'esperienza del nostro laboratorio di ricerca nel campo delle poliamine ha evidenziato che le tappe della biosintesi di queste molecole possono essere utilizzate come target per intervenire sull'apoptosi di cellule non tumorali. In una *review* pubblicata recentemente sono state riassunte e messe a confronto le evidenze scientifiche emerse in questo campo negli ultimi anni³².

I meccanismi attraverso i quali le poliamine possono esercitare questo ruolo di fattori agevolanti o contrastanti la morte cellulare programmata sono attualmente oggetto di ricerca.

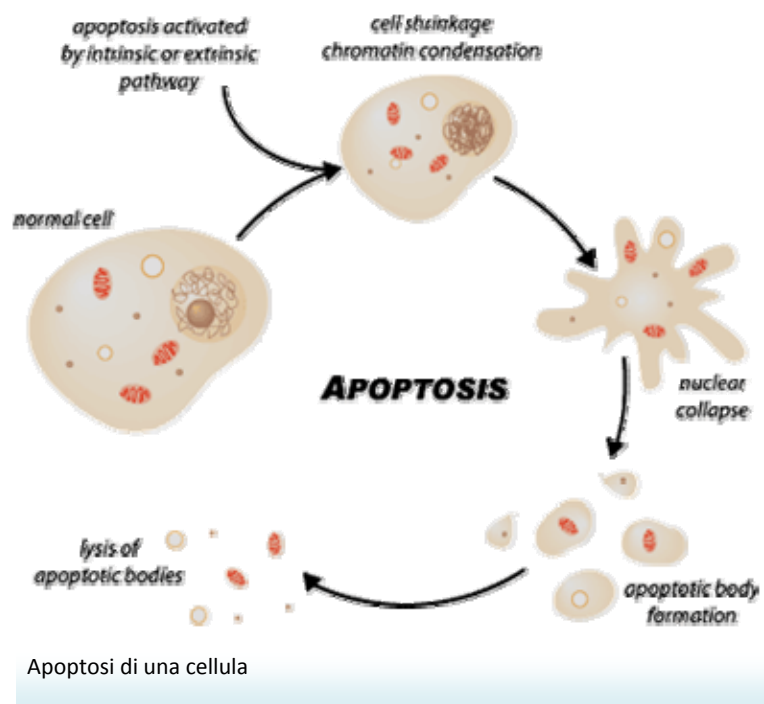
2.0 L'apoptosi

Da un punto di vista generale, l'apoptosi è un programma biologico di suicidio cellulare che può essere messo in atto in condizioni fisiologiche, ad esempio per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico negli organismi pluricellulari, ma può anche sopraggiungere attraverso un'attivazione controllata da stimoli esogeni.

Il programma apoptotico si avvale di molecole specifiche, i cui geni sono altamente conservati. I prototipi di tali geni furono osservati per la prima volta nel nematode *Caenorhabditis Elegans*. Delle 1090 cellule somatiche di questo piccolo verme, 131 muoiono per apoptosi nel corso dello sviluppo embrionale. Questo processo di sviluppo è impedito dalla mutazione di alcuni geni, cui fu dato il nome di Ced (da *C. Elegans death*). Dei primi geni identificati, si vide che alcuni (Ced-3 e Ced-4) inducevano apoptosi, mentre altri (Ced-9 ed Egl-1, riconosciuto in un secondo tempo) erano anti-apoptotici. Inoltre, dato che gli individui con la doppia mutazione Ced-9/Ced-3 non avevano apoptosi, si comprese che Ced-9 doveva agire a monte di Ced-3. Gli omologhi di questi geni nell'uomo sono per il Ced-3 la famiglia delle Caspasi, una classe di proteine responsabili dell'esecuzione dell'apoptosi³³, per il Ced-4 il fattore attivante l'apoptosi (Apaf-1), una proteina coinvolta nell'attivazione delle caspasi, per il Ced-9 la famiglia del Bcl-2, modulatori del processo apoptotico³⁴.

2.1 Alterazioni morfologiche e biochimiche

A differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, esponendo componenti normalmente nascosti o poco espressi della membrana plasmatica. Questi vengono riconosciuti dalle cellule vicine, che operano la fagocitosi della cellula morente. L'organizzazione interna della cellula è mantenuta nelle fasi precoci del processo apoptotico mentre, a livello nucleare, si osserva la disgregazione del/i nucleolo/i, il taglio della lamina, la condensazione della cromatina e il taglio del DNA in frammenti di 180-200 paia di basi o multipli interi di questi



numeri. Granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo. Frammenti di materiale nucleare raggiungono in seguito la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (*blebbing*). Queste *blebs* si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare, dando origine ai cosiddetti corpi apoptotici che vengono fagocitati dalle cellule vicine. A differenza della morte per necrosi, nell'apoptosi non si ha versamento di contenuto citosolico nell'ambiente, dunque non ha origine alcun processo flogistico secondario³⁵⁻³⁶.

Il processo di apoptosi può essere distinto in tre fasi:

- ✓ Induzione
- ✓ Esecuzione
- ✓ Riconoscimento e fagocitosi

La fase di induzione è regolabile e reversibile, in quanto vede un "colloquio incrociato" (*cross-talk*) tra stimoli contrastanti (segnali di sopravvivenza e segnali di morte). I diversi stimoli ed eventi apoptogeni seguono due, o forse più, distinte vie di segnalazione: una attivata da "segnali di morte" che giungono a specifici recettori di superficie (via recettoriale), l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio (via mitocondriale)³⁷. Entrambe le vie convergono nell'attivazione di un gruppo omogeneo di proteasi specifiche: le caspasi.

Questo evento segna l'inizio della fase di esecuzione. L'attivazione delle caspasi è determinata da un taglio proteolitico e determina a sua volta un'ulteriore cascata di eventi proteolitici e nucleolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi. La fase di esecuzione richiede energia e, nel caso l'ATP disponibile non sia sufficiente per completare il processo di apoptosi, questa potrebbe abortire e sfociare in necrosi.

Si ha quindi la successiva fase di riconoscimento e fagocitosi. I macrofagi, i monociti ed eventualmente cellule non specializzate, fagocitano i residui corpi apoptotici, riconoscendone specifici recettori di membrana o perché richiamati da molecole chemiotattiche rilasciate dalla cellula apoptotica stessa.

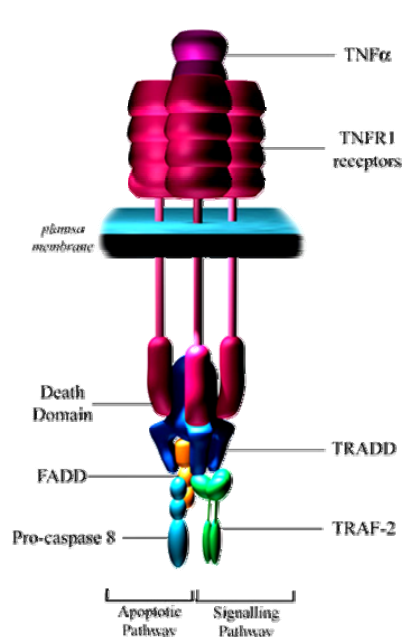
La fase di esecuzione sembra essere comune a tutte o quasi le vie d'innescamento ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata. Una volta innescata, la reazione non è più arrestabile. Le caspasi (*cysteinyl aspartate-specific proteinases*) sono enzimi che idrolizzano il legame peptidico, con specificità per i motivi tetrapeptidici contenenti aspartato. Le singole

caspasi hanno substrati specifici diversi, determinati dalla sequenza di quattro residui amminoacidici, posti all'estremità aminotermine del sito di taglio P1. Alcune di queste proteasi giocano un ruolo essenziale nella morte cellulare programmata (caspasi-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 12), altre intervengono nel processo infiammatorio (caspasi-1, 4, 5 e 13).

Le caspasi sono sintetizzate in forma di proenzimi inattivi, e vengono attivate per taglio proteolitico. Come procaspasi, sono costituite da un prodominio (3-24 kDa), una subunità maggiore (17-21 kDa), e da una subunità minore (10-13 kDa). Il prodominio si trova nella regione aminotermine, è altamente variabile nella sequenza e nel peso, ed è coinvolto nella regolazione dell'attivazione. Questa porzione non è necessaria una volta avvenuta l'attivazione della caspasi, ma conferisce una grande eterogeneità a questi enzimi. All'interno della famiglia, gli enzimi dotati di un prodominio grande, sono conosciuti come caspasi iniziatrici (ad esempio le caspasi-8 e 9), grazie alla loro capacità di autoattivarsi e di provocare una cascata proteolitica tramite processamento e attivazione delle caspasi effettrici, dotate di un prodominio piccolo (ad esempio le caspasi-3 e 7). I precursori inattivi delle caspasi iniziatrici esistono nella cellula come monomeri, mentre gli zimogeni di quelle effettrici sono sotto forma di dimeri. Studi strutturali hanno poi rivelato che la forma attiva corrisponde ad un eterotetramero, composto da due subunità grandi e da due piccole, e contenente due siti attivi, uno per ogni monomero. L'attivazione delle caspasi iniziatrici è infatti indotta dalla dimerizzazione, che risulta mediata da proteine regolatrici.

2.2 Le vie ed i modulatori

Attualmente sono conosciute due vie principali responsabili dell'attivazione delle caspasi, quindi della morte cellulare per apoptosi: la via recettoriale, o "estrinseca", e la via mitocondriale, o "intrinseca".

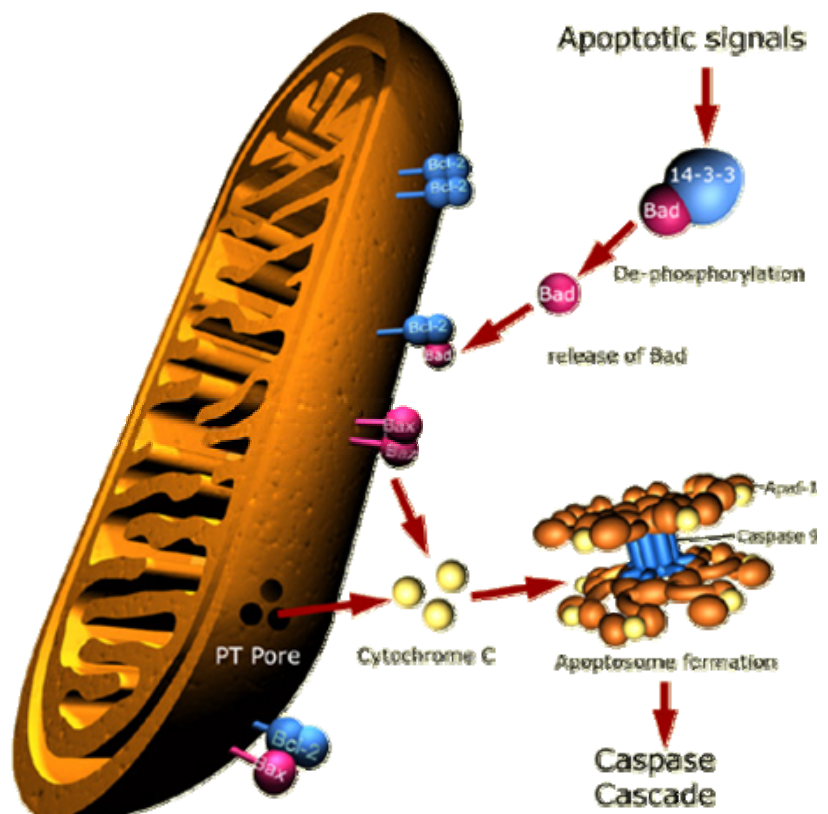


Nel primo caso l'evento scatenante è il legame con i Recettori di morte (DR) espressi sulla superficie della cellula³⁸⁻³⁹. Si tratta di singole proteine transmembrana a livello delle quali si distinguono regioni costituite da sequenze di 80 amminoacidi, chiamate domini di morte (DD). Questi rappresentano i siti di riconoscimento per ligandi specifici, cioè svariate molecole proteiche, tra cui TNF- α , FasL, TRAIL, Apo-3L. La trasmissione del segnale, attraverso tali recettori, recluta una serie di proteine. Dopo l'interazione con i rispettivi ligandi, i recettori richiamano sul versante citoplasmatico una serie di proteine adattatrici intracellulari, che si adattano al recettore per trasferire il

suo segnale all'interno della cellula in maniera relativamente specifica. La proteina adattatrice è in realtà un complesso proteico, localizzato in prossimità del versante interno della membrana citoplasmatica, dotato oltre che del DD, anche di una regione detta DED (dominio effettore di morte) tramite la quale interagisce con una regione definita CARD (*aminoterminal caspase recruitment domain*) presente in diverse caspasi. L'interazione con il complesso proteico adattatore provoca l'oligomerizzazione della caspasi-8, attraverso un meccanismo di autolisi, e quindi innesca il meccanismo a cascata di attivazione delle caspasi, indirizzando quindi la cellula verso l'apoptosi in modo irreversibile. I DR meglio caratterizzati sono CD95 (detto anche FAS o APO-1) e il TNF-R1, che riconoscono appunto rispettivamente le citochine Fas-ligand e TNF. Per quanto riguarda FAS, dopo il legame, il recettore trimerizza, e recluta la proteina adattatrice FADD (*Fas-associated DD*). Questa, posta sul lato citoplasmatico, ha a sua volta un dominio DED, che media l'associazione con la Pro-caspasi-8⁴⁰. Il meccanismo usato dal TNF-R1 in seguito al legame col TNF, è analogo ma più complesso in quanto sono coinvolte più proteine adattatrici e regolatrici. Infatti, questo recettore in particolare, attiva contemporaneamente anche diverse cascate di segnali intracellulari, che terminano con l'attivazione del fattore nucleare kB e con la fosforilazione del protooncogene c-Jun⁴¹.

Quello descritto è tuttavia un quadro estremamente semplificato della situazione reale: in realtà i ligandi possono interagire anche con altri recettori, non appartenenti alla via di trasduzione del segnale proapoptotica, producendo nella cellula risposte di altra natura, eventualmente

antiapoptotiche. Inoltre, l'attivazione dei recettori coinvolti nella trasduzione dei segnali di morte, ed il successivo reclutamento delle proteine adattatrici, possono dar luogo contemporaneamente ai percorsi trasduttivi proapoptotici descritti e all'attivazione di vie metaboliche intracellulari antiapoptotiche. Pertanto, risulta chiaro che l'induzione dell'apoptosi



deriva dall'integrazione di segnali che spingono verso il programma suicida e, contemporaneamente, trattengono la cellula dall'attuarlo.

La via intrinseca di attivazione caspatica, che coinvolge i mitocondri, può essere attivata da molti stimoli tra cui il calcio, la presenza di ROS (*reactive oxygen species*), il verificarsi di danni al livello del DNA, la diminuzione dei livelli dei fattori di crescita. Un passaggio chiave nell'attivazione di questa via è il rilascio del citocromo *c* dallo spazio intermembrana del mitocondrio al citosol. Il citocromo *c* è presente nei mitocondri in due principali forme, in equilibrio dinamico tra loro. Una forma è confinata all'interno della membrana mitocondriale, e gioca un ruolo critico nella catena di trasporto di elettroni, l'altra diffonde liberamente tra l'interno e l'esterno⁴².

Sono state descritte diverse fasi nel rilascio del citocromo *c* durante l'apoptosi. Nella fase iniziale si ha il distacco dall'interno della membrana mitocondriale, poi segue la formazione di un poro, quindi il rilascio del citocromo *c* nel citosol⁴³. Il meccanismo che porta all'aumento di permeabilità nella seconda fase è complesso e ancora poco conosciuto. Un meccanismo proposto coinvolge l'apertura di un poro detto PTPC (*permeability transition pore complex*)⁴⁴⁻⁴⁵, costituito da una proteina che trasloca un nucleotide adenilico definita ANT (*adenine nucleotide translocator*), posta all'interno della membrana mitocondriale, ed un canale voltaggio dipendente VDAC (*voltage-dependent anion channel*) all'esterno della membrana. La permeabilità aumenterebbe in seguito alla formazione da parte di ANT di un poro non specifico, in risposta a vari stimoli (calcio, fosfato, ROS..). Questo causerebbe un rigonfiamento della matrice mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo *c*. Un meccanismo alternativo invece propone un ruolo, nella formazione dei pori, dei membri della famiglia Bcl-2, come Bax o Bak⁴⁶⁻⁴⁷⁻⁴⁸.

Oltre alle due principali vie di attivazione della cascata caspatica, recentemente si sta cominciando a considerare un terzo possibile meccanismo di segnalazione. Ci sono infatti evidenze che collegano uno stress del reticolo endoplasmatico, conseguente ad esempio all'accumulo di proteine o all'alterazione dell'omeostasi del calcio, all'attivazione caspatica. Diversi studi hanno mostrato che le proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2, sia quelle con significato antiapoptotico, che proapoptotico, si inseriscono nelle membrane del reticolo, andando in qualche modo a regolare l'attivazione caspatica e l'apoptosi⁴⁹. Bax e Bak ad esempio, possono localizzarsi a livello di questo, e causare sia una deplezione di calcio dal compartimento, sia l'attivazione della caspasi 12⁵⁰⁻⁵¹. Questa si trova sul lato citosolico della membrana del reticolo e, in seguito ad attivazione, può processare la procaspasi-9. Inoltre, è possibile che la deplezione di calcio da questo compartimento possa causare oltre ad un

aumento di concentrazione dello ione nel citosol, un sovraccarico a livello dei mitocondri, che causerebbe poi attivazione della via mitocondriale⁴⁶.

Attualmente sono conosciuti oltre venti membri appartenenti alla famiglia di Bcl-2, di cui una quindicina presenti nell'uomo e cinque trovati nei virus. La proteina Bcl-2 rappresenta il prototipo di questa famiglia. Essa contiene nella sua struttura quattro tipiche sequenze amminoacidiche, definite "domini di omologia al Bcl-2" numerati da BH1 a BH4, più un dominio idrofobico che serve per l'ancoraggio alle membrane. La famiglia di Bcl-2 è stata divisa in tre sottogruppi che comprendono proteine simili per struttura e funzione:

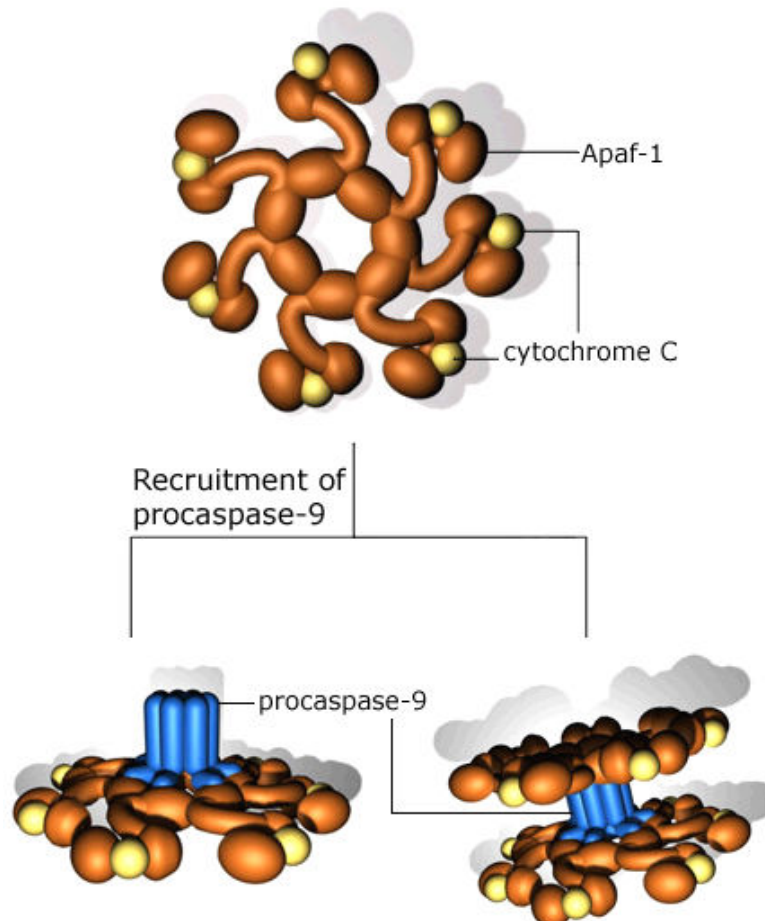
1. sottofamiglia del Bcl-2, che comprende proteine antiapoptotiche che favoriscono la sopravvivenza cellulare (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-1 ed altri);
2. sottofamiglia del Bax, di cui sono noti tre membri che attivano la morte cellulare (Bax, Bak e Bok);
3. sottofamiglia BH3, definita così perché le proteine che ne fanno parte possiedono solo il dominio BH3 di omologia al Bcl-2. Di questo gruppo sono noti otto membri con attività proapoptotica (tra cui Bid, Bim, Bik, HRK, Puma e Noxa).

Le proteine di questa famiglia possono legarsi tra loro, formando sia omo- che etero-dimeri. Membri proapoptotici possono dimerizzare con membri antiapoptotici, neutralizzandosi a vicenda. Questa scoperta ha suggerito un modello secondo cui la decisione, tra la vita e la morte cellulare, sarebbe determinata dal rapporto tra le concentrazioni dei membri proapoptotici e quelli antiapoptotici. Normalmente Bax è presente nel citosol come monomero inattivo che, in risposta a stimoli proapoptotici, oligomerizza e migra verso i mitocondri, a livello dei quali causa il rilascio del citocromo c. Riguardo al meccanismo con il quale agisce sulla membrana mitocondriale, sono state avanzate due ipotesi: studi strutturali hanno mostrato una certa analogia delle proteine Bcl-2 con tossine batteriche in grado di formare pori a livello delle membrane⁵²; altri studi invece attribuiscono a Bax oligomerizzato la capacità di distruggere l'integrità della membrana senza formazione di pori, ma interagendo con il PTPC, quindi inducendo un aumento di permeabilità transitorio, che permette il rilascio del citocromo c⁴².

Il rilascio del citocromo c dai mitocondri permette l'assemblaggio di un complesso, chiamato "apoptosoma", che comprende un fattore attivante le proteasi apoptotiche Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*), la caspasi-9 e un nucleotide (ATP)⁵³. Apaf-1 è una proteina citosolica di 130 kDa, membro della famiglia delle proteine contenenti un dominio detto NOD, per il legame con un nucleotide (*nucleotide-binding oligomerization domain*). L'Apaf-1 comprende, oltre al NOD in posizione centrale, altri due domini: un dominio CARD,

e all'estremità carbossiterminale 12-13 ripetizioni WD-40. I primi 97 aminoacidi che comprendono il dominio CARD, servono per il riconoscimento e l'interazione col dominio CARD della procaspasi-9. Il dominio NOD invece, è omologo alle sequenze dette ABC (*ATP-binding cassette*), che ritroviamo in una grande famiglia di ATPasi e GTPasi, e contiene due siti conservati per il legame con nucleotidi e col magnesio. Nel citosol, Apaf-1 monomero è presente in una conformazione inattiva, che impedisce l'oligomerizzazione e l'associazione con la procaspasi-9. Non è ancora stato chiarito il meccanismo che riesce a mantenere allo stato inattivo l'Apaf-1, ma si pensa che possano avere un ruolo in tal senso interazioni intramolecolari tra le regioni amminoterminali e le ripetizioni WD-40; questa ipotesi è sostenuta dal fatto che la delezione della porzione WD-40 promuove un'attivazione costitutiva di Apaf-1⁵⁴.

First stage of apoptosome formation



In presenza di citocromo c e di dATP, questa proteina oligomerizza per formare un complesso tra 700 e 1400 kDa⁵⁵⁻⁵⁶. Studi biochimici suggeriscono che la stechiometria con la quale dovrebbe avvenire questa reazione, preveda la combinazione di due molecole di citocromo c per ogni molecola di Apaf-1⁵⁷. Tuttavia, questa interazione sembra essere transitoria, in quanto non sono state ritrovate molecole di citocromo c negli apoptosomi

purificati⁵⁸. Sebbene il dATP sia richiesto per la formazione dell'apoptosoma e per l'interazione con la caspasi-9⁵⁹, il suo ruolo appare ancora controverso. Infatti, recenti studi indicano come responsabile della oligomerizzazione di Apaf-1, il legame di dATP/ATP, ma non l'idrolisi di questa molecola⁶⁰.

Dopo l'attivazione, avvenuta grazie alla mediazione di Apaf-1, la caspasi-9 matura resta legata all'apoptosoma, dove è cataliticamente attiva e da dove può agire sulle caspasi effettrici⁶¹.

La struttura tridimensionale che è emersa dagli studi di criomicroscopia elettronica, descrive l'apoptosoma come una ruota a sette raggi. La porzione centrale è costituita dai domini CARD. I raggi hanno una struttura a forma di Y, contenenti il dominio NOD e le ripetizioni WD-40. Queste costituiscono i due lobi distali e, nel monomero inattivo, possono interagire ed occludere il dominio centrale. Il legame del dATP/ATP ha per risultato cambiamenti conformazionali, che inducono l'oligomerizzazione e l'assemblaggio dell'eptamero Apaf-1 alla caspasi-9⁶².

Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare come avviene l'inibizione dell'attività dell'apoptosoma. Uno di questi coinvolge le IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), che agiscono legando le caspasi iniziatrici ed effettrici e inibendone l'attività enzimatica. Alcuni studi hanno mostrato che l'attività di una di queste IAPs viene antagonizzata da una proteina mitocondriale, che viene rilasciata nel citosol in seguito ad un insulto che agisce da stimolo apoptotico. Questa proteina spiazza IAP dal legame con la caspasi-9, che quindi viene liberata. La famiglia delle IAPs comprende alcune forme espresse anche a livello del miocardio umano⁶³. Tra queste proteine sembra assumere una certa importanza la survivina, la cui espressione a livello cardiaco sembra influenzare in maniera sostanziale il rimodellamento ventricolare⁶⁴.

3.0 L'apoptosi nel cuore

L'apoptosi è un meccanismo di morte cellulare altamente regolato e fondamentale per il corretto sviluppo di un organismo. Tuttavia una sua deregolazione può contribuire all'instaurarsi di processi patologici⁶⁵. In particolare un aumento della morte cellulare risulta maggiormente critico in quei tessuti che hanno scarsa capacità di rinnovarsi, a livello dei quali la perdita di tessuto funzionale porta ad un danno permanente. Molte patologie degenerative sono legate infatti ad una perdita di funzionalità causata da un aumento di apoptosi a livello di un particolare tessuto. Le patologie cardiovascolari costituiscono la più frequente causa di morte nei paesi industrializzati e negli ultimi dieci anni crescenti evidenze hanno sottolineato l'importanza dell'apoptosi nello sviluppo e nella progressione di queste patologie.

L'apoptosi dei cardiomiociti è stata evidenziata in numerosi studi condotti su modelli animali di ischemia-riperfusione⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸⁻⁶⁹, su pazienti che avevano subito un infarto del miocardio o affetti da cardiomiopatia dilatativa o insufficienza cardiaca ad uno stadio avanzato⁷⁰⁻⁷¹⁻⁷². Tutto ciò ha indotto a credere che l'apoptosi possa rivestire un ruolo cruciale nella transizione dall'ipertrofia compensatoria all'insufficienza cardiaca.

3.1 L'Ischemia cardiaca

L'ischemia può essere definita come quella condizione che si verifica quando un tessuto riceve un apporto ematico inferiore a quello richiesto dal suo metabolismo. La causa più frequente di ischemia è rappresentata da un'interferenza locale nella perfusione di un organo o di un tessuto, causata da un'occlusione parziale o totale della rete vascolare sua tributaria⁷³.

Un tessuto privato del suo apporto di sangue subisce direttamente tre situazioni:

- ⊗ Carenza di ossigeno, che non viene immagazzinato in quantità sufficiente
- ⊗ Carenza di substrati per i processi metabolici e sintetici
- ⊗ Mancata rimozione dei cataboliti (diminuzione del *wash-out*)⁷⁴.

Il danno generato dall'ischemia si può tradurre in una perdita di cellule parenchimali a piccoli focolai, come si osserva nel tessuto miocardico di pazienti con una lunga storia di angina pectoris, o in una necrosi estesa. In entrambe le condizioni il tessuto perduto viene rimpiazzato da tessuto fibroso.

L'estensione del danno è proporzionale al grado di ischemia, che viene determinato sulla base di diverse variabili. Bisogna per prima cosa considerare l'anatomia dei vasi che

garantiscono l'apporto ematico locale: infatti i tessuti provvisti di una doppia circolazione accusano meno danni in seguito ad ostruzione arteriosa, in quanto l'apporto ematico proveniente dal circolo collaterale è in grado di mantenere la vitalità delle cellule. Ciò accade ad esempio nel tessuto polmonare, mentre in organi come il cuore ed il cervello il circolo collaterale è piuttosto scarso, per cui essi rappresentano le zone più pericolosamente esposte al deficit circolatorio. Inoltre le necessità metaboliche dell'area ipoperfusa non sono costanti: i tessuti hanno diversa capacità di sopportare una diminuzione di apporto di sangue. Da questo punto di vista il cervello è l'organo più sensibile, infatti la privazione di ossigeno per un tempo superiore a 3-4 minuti causa alle cellule nervose un danno irreversibile. Anche il miocardio è molto sensibile ai danni prodotti dalla ridotta perfusione. In effetti il cuore, dovendosi contrarre per più di 100.000 volte nell'arco della giornata per spingere il sangue attraverso i vasi dell'intero organismo, richiede un elevato apporto energetico e va incontro ai rischi legati all'ischemia ogni volta che il circolo coronarico non è in grado di fornire tutto il sangue del quale può avere bisogno. Il miocardio è infatti un tessuto tipicamente ed essenzialmente aerobico, che richiede per il suo metabolismo un continuo apporto di ossigeno da parte del circolo arterioso coronarico. Inoltre ogni aumento della richiesta di prestazione contrattile, quindi ogni elevazione della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna, deve essere sostenuto da un aumento proporzionale nell'entità del flusso ematico coronarico.

Ogni evento che comporti la mancata corrispondenza tra la domanda energetica cardiaca e l'apporto coronarico determina in un primo tempo conseguenze di natura metabolica e successivamente, in caso di ischemia grave e prolungata, lesioni strutturali di tipo irreversibile.

Oltre alla ridefinizione del profilo energetico, le variazioni nella tensione di ossigeno guidano importanti adattamenti nella trasduzione dei segnali intracellulari e nell'espressione del patrimonio genetico cellulare. In particolare, nonostante si verifichi una generale "*down-regulation*" della sintesi delle proteine, mirata a ridurre i consumi energetici, l'ipossia attiva la trascrizione di geni specifici. Questa trasduzione controllata si verifica in quanto la riduzione della tensione di ossigeno determina una aumentata attivazione di specifici fattori di trascrizione, o semplicemente aumenta l'affinità del loro legame con le sequenze specifiche di DNA. Nelle cellule dei mammiferi, alcuni dei meccanismi compensatori che vengono attivati in risposta ai cambiamenti della tensione di ossigeno sono direttamente associati alla inibizione delle vie ossigeno-dipendenti, e al conseguente decremento del contenuto energetico, o secondari ai cambiamenti dello stato redox della cellula che si manifestano a seguito del suo alterato metabolismo. In taluni casi, però, tali modificazioni cellulari, che si manifestano in seguito ad ipossia, diventano effettive prima che i livelli di ATP

siano ridotti. Questo fa supporre l'esistenza di "sensori" di membrana sensibili alle variazioni della tensione di ossigeno e in grado di attivare dei secondi messaggeri e quindi una cascata di eventi che, mediando l'adattamento della cellula, può alternativamente condurre alla sopravvivenza o alla morte.

In tutti i tessuti del nostro organismo, l'assenza di apporto di ossigeno causa una transizione verso la morte cellulare, in particolare quando l'ischemia è di gravi proporzioni. In queste condizioni, agli iniziali adattamenti biochimici e funzionali all'interno delle cellule, mirati ad ottenere un adattamento dell'intero organo alle nuove condizioni attraverso l' "*up-regulation*" di specifiche proteine con valenza protettiva, si oppone l'instaurarsi di programmi di suicidio cellulare. La morte cellulare si può manifestare sia come apoptosi che come necrosi. La scelta da parte della cellula di aderire ad un programma di autodistruzione rappresenta evidentemente un momento critico. Un'ipotesi attuale fa ritenere che se la cellula ha la capacità di recuperare la funzionalità della membrana in maniera tale da ricostruire il suo metabolismo ossidativo, essa avrà la possibilità di sopravvivere; al contrario, se il potenziale di membrana è irreversibilmente ridotto, la cellula andrà incontro alla morte, e la tipologia di morte dipenderà allora dalla disponibilità di energia (ATP): se la cellula ha energia e tempo sufficienti, prima della perdita di permeabilità di membrana, andrà incontro ad apoptosi, al contrario, se la disponibilità di energia è bassa, andrà incontro a necrosi.

3.2 L'insufficienza cardiaca

Per insufficienza cardiaca si intende una sindrome complessa che trae origine da diversi disturbi del cuore, che ne compromettono la capacità di funzionare e di sostenere la circolazione sanguigna. Il cuore è capace di rispondere variando la propria capacità contrattile in funzione di variazioni nelle richieste metaboliche dell'organismo. Se l'aumento delle richieste è temporaneo, il cuore mette in atto una serie di meccanismi transienti come la stimolazione del ritmo cardiaco mediante rilascio di catecolamine. Se invece l'aumento delle richieste è ripetitivo o cronico, l'organo va incontro ad una serie di modifiche che si definiscono complessivamente con il termine "rimodellamento cardiaco". Anche l'esercizio fisico induce un processo di rimodellamento nel cuore, tuttavia si tratta di un fenomeno sostanzialmente diverso, fisiologico (e benefico), omogeneo, che porta ad un proporzionato aumento dei componenti cellulari del cuore (in particolare cardiomiociti e fibroblasti). Nel rimodellamento patologico, frutto soprattutto di ipertensione, ma anche di cardiomiopatie ischemiche, congenite e dilatative, valvulopatie e miocarditi, si ha uno sproporzionato contributo da parte dei fibroblasti, che sono stimolati a proliferare ed a produrre collagene fibrillare interstiziale, innescando un processo di fibrosi⁷⁵.

Nella maggior parte dei casi l'evoluzione dell'insufficienza cardiaca comprende una prima fase di ipertrofia: questa rappresenta inizialmente un importante meccanismo adattativo per rispondere agli stress emodinamici. Gli iniziali benefici funzionali della risposta ipertrofica includono un aumento nel numero di elementi contrattili⁷⁶. Tuttavia a differenza del rimodellamento fisiologico, quello causato dall'ipertensione costituisce il principale fattore di rischio per l'insufficienza cardiaca⁷⁷. La fibrosi generata dall'ipertensione modifica infatti l'organizzazione tridimensionale del muscolo cardiaco ed aumenta la rigidità del miocardio, andando a limitare il riempimento del cuore durante la diastole⁷⁸ quindi compromettendo la funzionalità dell'organo. Numerosi modelli sperimentali hanno dimostrato che l'ipertrofia miocardica e lo scompenso cardiaco sono caratterizzati da una consistente perdita di cardiomiociti⁷⁹. Uno dei meccanismi proposti per spiegare la perdita di cardiomiociti che si verifica con la transizione dall'ipertrofia compensatoria allo scompenso è l'apoptosi, un processo mediante il quale le cellule pervengono all'autodistruzione attivando una complessa catena di eventi⁸⁰. Quando infatti l'ipertrofia del tessuto miocardico non corrisponde ad una crescita dei capillari che costituiscono il microcircolo, si ottiene un aumento delle dimensioni dei cardiomiociti con una relativa riduzione della densità capillare. In queste condizioni si crea uno squilibrio tra massa miocitaria e capillari che può determinare un *mismatch* nel rapporto domanda/fornitura di ossigeno con conseguente incremento dell'apoptosi dei cardiomiociti che favorisce un processo di rimodellamento sfavorevole e porta all'insufficienza cardiaca⁸¹.

3.2.1 L'attivazione neuro-ormonale

Il mancato *output* cardiaco porta all'attivazione di meccanismi compensatori neuro-ormonali allo scopo di migliorare la *performance* cardiaca. Sebbene questi rappresentino un supporto per il cuore in circostanze fisiologiche, possono anche avere un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella conseguente progressione dell'insufficienza cardiaca.

- Ⓢ La stimolazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone porta ad un'aumentata produzione di renina, di angiotensina II e di aldosterone. L'angiotensina II è un potente vasocostrittore sia a livello renale (in particolare agisce sulle arteriole efferenti glomerulari) che della circolazione sistemica, dove stimola il rilascio della norepinefrina dalle terminazioni nervose simpatiche, inibisce il tono vagale e promuove il rilascio di aldosterone. Questo porta alla ritenzione di sodio ed acqua e alla aumentata escrezione di potassio⁸². Lo stiramento delle cellule dovuto al sovraccarico pressorio promuove inoltre la sintesi di angiotensina II da parte dei cardiomiociti stessi⁸³. Molti studi hanno evidenziato che l'aldosterone ha effetti avversi a livello di tessuto cardiaco che vanno al di là del suo meccanismo d'azione

principale sulla pressione. E' inoltre ormai noto che oltre ad agire sui recettori mineralcorticoidi, è in grado anche di indurre effetti rapidi, non genomici.

- Ⓢ Le catecolamine (epinefrina e norepinefrina) svolgono una diretta stimolazione cronotro- e inotropo-positiva sulle cellule del cuore, tentando così di aumentarne la contrattilità e quindi l'efficienza. Tuttavia una stimolazione sostenuta di questo sistema attiva il sistema renina-angiotensina-aldosterone ed altri neuro-ormoni portando ad un aumentato tono venoso ed arteriolare, ad un aumento della concentrazione di norepinefrina nel sangue, alla progressiva ritenzione di sale ed acqua, quindi all'edema⁷⁹.

Nel complesso l'attivazione di questi sistemi porta anche a:

- Ⓢ produzione di endotelina;
- Ⓢ produzione di fattori di crescita per i cardiomiociti;
- Ⓢ sintesi di ossido nitrico (NO), che provoca vasodilatazione periferica e quindi diminuzione del pre-carico⁸⁴;
- Ⓢ rilascio di istamina, che lega i recettori H1 nel cuore provocando tachicardia;
- Ⓢ produzione locale di citochine infiammatorie come TNF e IL-1⁸⁵.

Tutti questi mediatori dello stress biochimico tentano di risolvere l'insufficiente irrorazione degli organi, ma allo stesso tempo la stimolazione costante da parte di essi contribuisce alla progressione dell'insufficienza cardiaca. Inoltre, alcuni tra questi mediatori stimolano direttamente l'ipertrofia dei cardiomiociti, inducendo anche l'espressione di una serie di geni normalmente espressi solo nel cuore fetale (si dice per tanto che viene riattivato il *fetal gene program*). Tra questi geni ci sono quelli relativi all'espressione della catena pesante della miosina β (β -MHC), del peptide natriuretico atriale (ANP) e dell' α -actina scheletrica. E' stato anche osservato che a lungo andare alcuni fattori possono avere tossicità diretta sul cuore. In particolare molti lavori hanno evidenziato gli effetti apoptotici di alte concentrazioni di norepinefrina⁸⁶, aldosterone ed angiotensina II⁸⁷ sui cardiomiociti. Dunque il fenomeno del rimodellamento cardiaco è associato ad un aumento di apoptosi dei cardiomiociti con dei meccanismi non noti indotti dallo stress biochimico. Inoltre, lo stesso aumento delle richieste metaboliche fa sì che i cardiomiociti subiscano un maggiore stress ossidativo, il quale può portare a danno mitocondriale e innesco della via intrinseca dell'apoptosi.

3.3 Vie di trasduzione del segnale ed apoptosi nel cuore

Una complessa rete di segnalazione intracellulare media i processi di crescita, sopravvivenza e morte cellulare attraverso la fosforilazione-defosforilazione di proteine. A livello del tessuto cardiaco sono state individuate numerose vie che esercitano importanti effetti regolatori. Tra queste, quelle relative a due serina/treonina chinasi, l'Akt e la chinasi attivata dall'AMP (AMPK), sono a tutt'oggi oggetto di studio per chiarire un loro coinvolgimento nella sopravvivenza e/o morte cellulare.

La via di segnalazione della proteina chinasi Akt è coinvolta nella mediazione di segnali anti-apoptotici. Numerosi lavori hanno evidenziato che questa proteina gioca un ruolo critico nell'omeostasi dei cardiomiociti⁸⁸ e che inibisce sia la via d'induzione intrinseca che estrinseca dell'apoptosi⁸⁹. L'Akt rappresenta un bersaglio a valle di molti recettori regolati da importanti stimoli della proliferazione cellulare: fattori di crescita (EGF, PDGF-R, bFGF), insulina e fattore di crescita insulino simile I (IGF-1).

L'attivazione dell'Akt è un processo complesso e multifasico. La prima tappa comprende l'attivazione di un recettore di membrana che attiva a sua volta una protein-chinasi intracellulare, la fosfoinositide-3-chinasi (PI3K). Questa converte il PIP2 (fosfoinositolo difosfato) a PIP3 (fosfoinositolo trifosfato); l'Akt, migrando verso la membrana cellulare, interagisce con il PIP3 e va incontro a cambiamenti conformazionali; tali modifiche rendono possibile la fosforilazione, operata dalla chinasi PDK1, del residuo treonina 308 della proteina, attivandola parzialmente. Mediante un meccanismo di autofosforilazione non ancora ben chiaro, si aggiunge quindi un gruppo fosfato sulla serina 473 (dominio idrofobico della regione C-terminale). Una volta attiva l'Akt si allontana dalla membrana e attraversa il citoplasma dove è in grado di fosforilare diverse proteine substrato; inoltre può raggiungere il nucleo dove è in grado di indurre la trascrizione di geni *target*⁹⁰ coinvolti nei meccanismi di cardioprotezione⁹¹.

Il più utilizzato inibitore dell'attivazione dell'Akt è rappresentato dal LY294002 (LY). Questo composto, usato solitamente negli studi in vitro a concentrazione 20 µM, agisce inibendo il legame tra l'ATP e la PI3K, quindi bloccando la chinasi a monte dell'Akt.

Se fino ad alcuni anni fa la chinasi attivata dall'AMP (AMPK) veniva indicata solo come un importante sensore e regolatore del metabolismo energetico cellulare, recentemente è diventato chiaro che il suo ruolo è più vasto.

Comunemente si ritiene che attivi vie metaboliche in grado di fornire energia (glicolisi, ossidazione degli acidi grassi, *uptake* del glucosio) e che, contemporaneamente, inibisca

quelle che consumano ATP (sintesi di proteine, di glicogeno e di acidi grassi), regolando in questo modo l'omeostasi energetica nella cellula.

Molti lavori hanno affrontato il rapporto tra AMPK e regolazione della sopravvivenza cellulare in situazioni di stress⁹². Le normali funzioni delle cellule di mammifero infatti, dipendono da informazioni che possono provenire da fattori di crescita esterni o da livelli dei nutrienti intracellulari che portano alla regolazione di crescita, proliferazione, differenziamento e sopravvivenza. Diversi risultati sperimentali suggeriscono che l'attivazione della AMPK possa essere direttamente o indirettamente collegata ad effetti che riguardano questi processi.

Il primo articolo che ha mostrato una relazione tra AMPK e induzione di apoptosi risale a 11 anni fa⁹³, tuttavia il ruolo che la AMPK svolge nel controllo del destino cellulare non è ancora completamente chiaro: alcuni autori hanno correlato la sua attivazione con la sopravvivenza e altri con l'arresto della crescita o con la morte cellulare. Risulta quindi abbastanza evidente che la AMPK può essere coinvolta sia nella protezione che nell'induzione dell'apoptosi. Verosimilmente, il ruolo dell'AMPK nell'apoptosi e nella sopravvivenza cellulare può differire in relazione al contesto cellulare (tipo di cellula e stimolo proapoptotico).

Il composto AiCA riboside (AICAR) rappresenta il più "antico", meglio caratterizzato e più utilizzato attivatore della AMPK. Questo composto, un intermedio della sintesi purinica, infatti, viene trasformato nelle cellule in ZMP, un nucleotide analogo all'AMP, che causa l'attivazione diretta dell'AMPK.

4.0 Le poliamine ed il cuore

Da molti anni è stato stabilito un legame tra l'ipertrofia cardiaca e le poliamine⁹⁴. Queste molecole infatti notoriamente promuovono fenomeni tipici della crescita ipertrofica come la sintesi di proteine e l'attivazione dell'espressione genica, ed i loro livelli risultano aumentati durante la proliferazione e la crescita cellulare. Aumentate concentrazioni di poliamine sono state riscontrate nel tessuto cardiaco in seguito a trattamenti che provocano ipertrofia, come la stenosi aortica ascendente⁹⁵⁻⁹⁶, l'esercizio fisico⁹⁷, lo stress⁹⁸ e la somministrazione di isoproterenolo⁹⁹. Questo aumento di poliamine corrisponde anche ad un'iperacetilazione istonica, e ad un aumento nella sintesi di RNA e proteine¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Oggi sono disponibili diversi modelli murini transgenici e *knockout* con livelli alterati di poliamine che permettono di studiare ed estendere le conoscenze precedentemente ottenute riguardo il ruolo di questi polimeri. Ad esempio è stato dimostrato che la sovraespressione dell'enzima ODC a livello cardiaco corrisponde ad un moderato grado di ipertrofia cardiaca, aumentata in seguito a stimolazione con isoproterenolo¹⁰².

Recenti risultati indicano inoltre una correlazione complessa a livello cardiaco tra il metabolismo delle poliamine e quello dell'ossido nitrico (NO)¹⁰³, noto vasodilatatore coronarico con molti ruoli importanti a livello cardiaco. In particolare, tra gli effetti del NO è stata recentemente osservata una correlazione inversa tra i livelli intracellulare di tale mediatore e l'insorgenza di ipertrofia cardiaca¹⁰⁴. Una stretta correlazione lega NO con il metabolismo delle poliamine. Esso viene infatti sintetizzato ad opera dell'enzima ossido nitrico-sintasi (NOS) che ha come substrato l'arginina, aminoacido precursore anche delle poliamine, in quanto ad opera di una arginasi può essere trasformata in ornitina. L'attenzione di molti ricercatori è pertanto stata rivolta recentemente allo studio delle correlazioni tra poliamine e NO anche in relazione alla morte ed alla proliferazione della cellula cardiaca.

In un modello rappresentato dall'ischemia/riperfusioni in cuore di ratto, è stato osservato che l'ischemia causa un aumento degli enzimi ODC e SSAT ed un accumulo di putrescina a livello cellulare, la riperfusione invece provoca una riduzione del contenuto intracellulare di spermina, parallelo ad un aumento nel contenuto di NO, eventi correlati ad una diminuzione della vitalità cardiomiocitaria¹⁰⁵. Infatti sembra esserci una correlazione negativa tra NO ed i livelli di spermina, in quanto la somministrazione esogena di un donatore di NO, quale il sodio-nitro-prussiato, inibisce l'attività dell'ODC¹⁰⁶, mentre stimola la SSAT.

Altri studi condotti utilizzando cardiomiociti neonatali di pollo indicano invece che mediatori dell'infiammazione come TNF e lipopolisaccaride (LPS) in associazione hanno un effetto mitogenico mediato attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kB (NFkB), dall'induzione della NOS e della ODC¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Il conseguente aumento del contenuto intracellulare di NO e di poliamine sembra essere correlato all'aumento di livelli di GMP ciclico, requisito fondamentale per la stimolazione della sintesi di DNA¹⁰⁸.

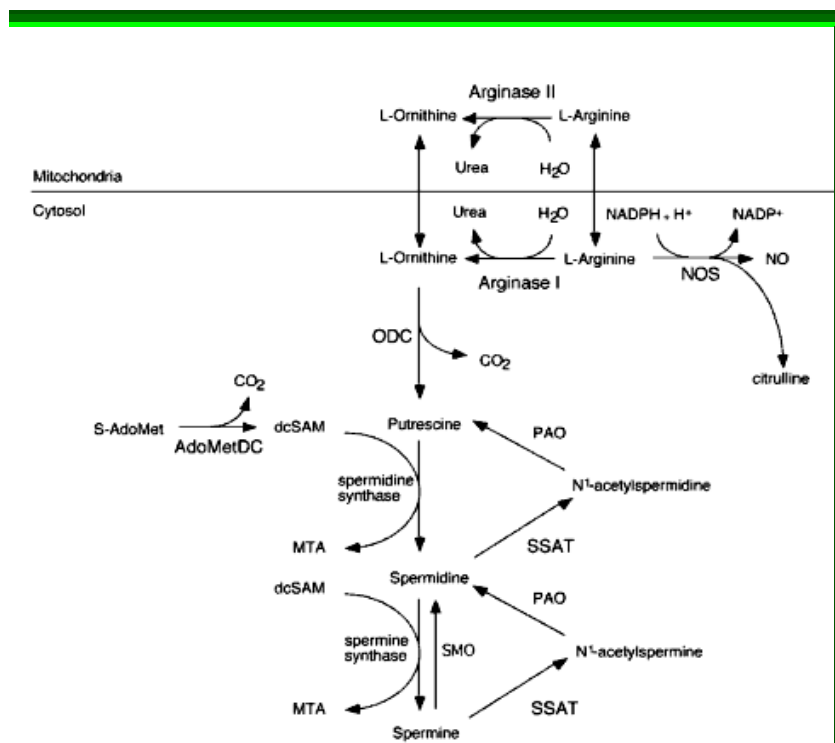


Fig. 1. The polyamine and arginine metabolic pathways.

Figura tratta da "Polyamine metabolism and the hypertrophic heart" di Lisa Shantz ed Emanuele Giordano (*Polyamine Cell Signaling. Physiology, Pharmacology, and Cancer Research*. Wang J Y, Casero R A Jr.)

Oltre alla correlazione tra poliamine e proliferazione, numerosi studi indicano anche un ruolo di tali poliamine nell'apoptosi delle cellule cardiache.

In uno studio molto recente è stato dimostrato che cardiomiociti neonatali sottoposti ad ischemia/riperfusion muoiono per apoptosi in misura maggiore se trattati anche con putrescina esogena, mentre al contrario il trattamento con spermidina o spermina sembra avere un effetto protettivo¹⁰⁹.

Un lavoro recente ha dimostrato l'aumento dell'attività dell'enzima SSAT nel cuore ischemico sottoposto a legatura coronarica. Questo aumento è stato messo in correlazione con la deplezione di ATP, attraverso la via di segnalazione dell'AMPK, che inaspettatamente sembra esercitare un effetto protettivo, non correlato con cambiamenti nel contenuto di poliamine¹¹⁰.

Questi dati sull'apoptosi delle cellule cardiache in relazione con le poliamine appaiono di difficile interpretazione ed a volte anche in disaccordo tra loro. Un quadro di questo genere può essere interpretato considerando sia la sostanziale complessità dei meccanismi coinvolti, sia i differenti modelli sperimentali e protocolli impiegati in questi studi. In ogni

caso dai dati raccolti emerge l'importanza delle poliamine e degli enzimi che partecipano al loro metabolismo nella regolazione della morte e della sopravvivenza dei cardiomiociti.

Oltre ad intervenire nei meccanismi di morte e proliferazione, le poliamine hanno dimostrato una loro potenziale azione anche nell'ambito dei processi di differenziamento cellulare. Questo risulta particolarmente interessante a livello cardiaco, dove il tessuto ha di per sé scarse capacità di rinnovarsi. Infatti l'avvento delle terapie cellulari basate sull'utilizzo di cellule staminali di varia origine per la riparazione di tessuti danneggiati rappresenta una speranza per molte patologie degenerative, comprese quelle cardiache su base ischemica, legate ad una perdita di tessuto funzionale. Tuttavia tra i principali ostacoli da affrontare per mettere a punto questa strategia terapeutica ci sono l'alto tasso di morte delle cellule staminali subito dopo il trapianto, e la difficoltà nell'indirizzare il differenziamento verso il tipo cellulare specifico. La deplezione di poliamine ottenuta con DFMO nelle cellule staminali mesenchimali di ratto prelevate da midollo osseo non solo protegge queste cellule da morte cellulare programmata indotta da TNF e dal composto MG₁₃₂ (composto utilizzato per bloccare le vie pro-sopravvivenza attivate dal TNF)¹¹¹, ma anche aumenta l'espressione di *marker* cardiaci in seguito a co-coltura con cardiomiociti sottoposti ad insulto ischemico¹¹². Dunque il pretrattamento delle cellule staminali mesenchimali con DFMO nella fase precedente l'eventuale loro utilizzo, potrebbe garantire una maggiore sopravvivenza una volta iniettate nella sede del trapianto, e sembra renderle maggiormente predisposte al differenziamento, rappresentando così un'interessante strategia per rendere più efficiente la rigenerazione del tessuto cardiaco danneggiato.

Parte sperimentale

1.0 Premesse e scopo della tesi

La patologia ischemica del miocardio rappresenta oggi la principale causa di morte nei paesi industrializzati. Il progressivo aumento dell'aspettativa di vita e il cambiamento delle maggiori cause di morte e disabilità da patologie legate a deficit nutrizionali ed infezioni a disturbi cronici degenerativi, hanno suscitato notevoli aspettative nei confronti della ricerca finalizzata allo studio di queste patologie emergenti¹¹³. Per questa ragione attualmente uno degli obiettivi di maggior interesse per la ricerca in ambito cardiovascolare consiste nello studio dei meccanismi molecolari che sottostanno al danno ischemico. La comprensione di tali meccanismi potrebbe infatti offrire l'opportunità di nuove strategie terapeutiche che consentano una riduzione del danno.

L'apoptosi dei cardiomiociti interviene in molte patologie cardiovascolari ed è stata riconosciuta come meccanismo cellulare che si attiva nel cuore in seguito ad ischemia¹¹⁴. In particolare i cardiomiociti in coltura vanno incontro ad apoptosi in risposta allo stimolo ischemico rappresentato dall'ipossia, dalla deprivazione di siero e di fattori di crescita, o in risposta al ripristino delle condizioni standard di coltura dopo l'ischemia. Studi in vivo hanno inoltre evidenziato che, mentre una situazione prolungata di ridotta perfusione del tessuto cardiaco risulti principalmente causa di necrosi dei cardiomiociti, un insulto più moderato induce al contrario apoptosi, sia in risposta all'ischemia, che durante la riperfusione¹¹⁵. Nonostante la convincente evidenza che si verifichi apoptosi nelle patologie cardiovascolari a base ischemica, i meccanismi molecolari e la trasduzione del segnale che sono coinvolte in questo processo non sono state ancora definite chiaramente.

Nell'ischemia cardiaca il danno è causato in parte direttamente dal fenomeno ischemico, quindi dalla riduzione del flusso circolatorio verso il tessuto, ed in parte da stimoli che contribuiscono alla progressione verso l'insufficienza cardiaca. Infatti l'organismo attiva una serie di risposte neuro-ormonali che agiscono a livello cardiovascolare e che possono a loro volta partecipare all'instaurarsi del danno. In particolare è stata riscontrata un'iperattivazione adrenergica e del sistema renina-angiotensina-aldosterone¹¹⁶⁻¹¹⁷. Alcuni studi hanno riportato che i principali mediatori di questi sistemi, pur essendo fisiologicamente presenti nell'organismo, ad alte concentrazioni sono in grado di indurre apoptosi delle cellule cardiache in modo diretto.

Una classe di molecole coinvolte in numerosi processi come la crescita, la proliferazione e la morte cellulare è rappresentata dalle poliamine. Tali sostanze ubiquitariamente presenti regolano in maniera complessa le funzioni cellulari e possono avere ruoli diversi promuovendo o ostacolando i vari processi. L'elucidazione del ruolo delle poliamine in eventi

biochimici attivati durante il processo apoptotico potrebbe contribuire a realizzare interventi e strategie di tipo farmacologico e/o molecolare, capaci di interferire con l'evoluzione del processo di morte.

Nella prima fase di questo studio la ricerca è stata orientata verso l'indagine dei meccanismi che, in seguito all'evento ischemico, conducono a morte cellulare programmata. In una seconda fase lo studio è stato rivolto alla comprensione delle vie di trasduzione del segnale e dei meccanismi molecolari attraverso i quali mediatori neuro-ormonali, in particolare la norepinefrina e l'aldosterone, possono danneggiare il tessuto cardiaco. In entrambi i casi è stata ricercata una correlazione con il metabolismo delle poliamine. Infatti alla luce del comportamento bivalente di questi regolatori delle funzioni cellulari, può risultare interessante indagare il loro ruolo in ambito cardiaco, per definire la possibilità di nuovi *target* terapeutici nell'ambito delle cardiomiopatie ischemiche.

2.0 Materiali e metodi

2.1 Colture cellulari

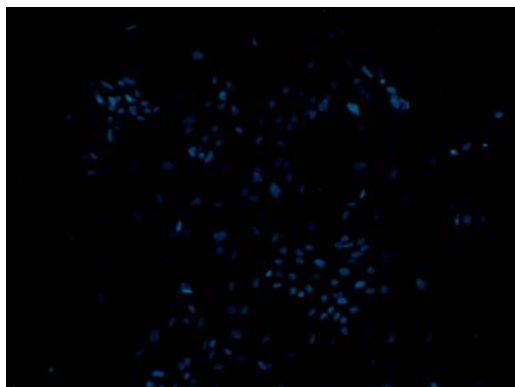
Sono stati utilizzati diversi modelli sperimentali: cellule H9c2, ovvero una linea di cellule muscolari di ventricolo destro di embrione di ratto, e colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto.

Le cellule H9c2 sono state mantenute in coltura in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Cambrex) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) 2mM di L-glutamina (Cambrex), 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina (Cambrex) in incubatore sterile (NAPCO 6100) a 37°C in atmosfera al 5 % di CO₂. Le cellule sono state subcoltivate in piastre di Petri del diametro di 10 cm (Falcon), a seguito di dissociazione mediante soluzione contenente 0,5 % di tripsina e 0,2 % EDTA (Sigma) ed espanso fino a raggiungere una confluenza media del 70 %.

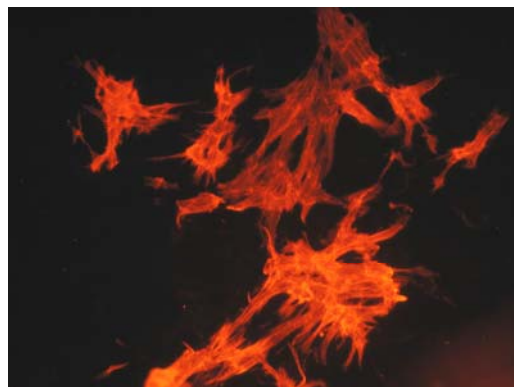
I cardiomiociti neonatali sono stati isolati da ventricoli di ratti Wistar nati da 1-3 giorni, mediante digestione enzimatica con Tripsina-EDTA 0,25 % e Collagenasi di tipo 1A 0,05 %. Per evitare contaminazione della coltura da parte di non-cardiomiociti (fibroblasti e cellule endoteliali) sono state combinate diverse strategie: in seguito all'estrazione delle cellule dal tessuto sono stati effettuati due *pre-plating* (il primo di 30 ed il secondo di 60 minuti), durante i quali la maggior parte dei non-cardiomiociti sono rimasti adesi alla superficie delle piastre; la popolazione cellulare arricchita per tanto in cardiomiociti veniva seminata in multiwell da 6, sulle quali era stata precedentemente stratificata gelatina allo 0,5 %, a concentrazione di circa 1.000.000 di cellule per mL (questa concentrazione molto alta era necessaria per evitare che nella coltura non confluyente prendessero il sopravvento tipi cellulari a più alta velocità di proliferazione); infine al terreno di coltura veniva aggiunta per le prime 48 h 10 µM citosina-β-D-arabinoside (AraC). Le cellule così ottenute erano mantenute in coltura al massimo per una settimana. Il terreno (DMEM contenente il 10 % di FBS, 2mM di L-glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina) veniva sostituito da terreno fresco ogni 48 h e circa 24 h prima dell'inizio dell'esperimento le cellule erano sincronizzate mediante deprivazione di siero.

Per verificare la relativa purezza della coltura di cardiomiociti sono stati effettuati *staining* delle cellule con un anticorpo anti-α-actinina. Le cellule sono state fissate sulla piastra con paraformaldeide 4%, permeabilizzate con TritonX-100 0,1%, saturate con PBS / BSA 4% (albumina), poi esposte ad un anticorpo monoclonale anti-α-actinina (Sigma) diluito 1:200 in PBS / BSA 2%. L'anticorpo secondario anti-mouse (Sigma) coniugato con Texas Red è stato

diluito 1:500 in PBA / BSA 2%. Utilizzando un microscopio a fluorescenza rovesciato (Olimpus IX-50) il colorante Texas Red assorbe a 596 nm ed emette a 620 nm.



Nuclei evidenziati con DAPI



Cardiomiociti evidenziati con anticorpo anti- α -actinina

Figura 1 Staining dell' α -actinina (ingrandimento 20x)

2.2 Ischemia simulata

L'ischemia simulata è stata ottenuta incubando cellule H9c2 subconfluenti in terreno DMEM senza siero e in assenza di ossigeno per i tempi indicati nella sezione risultati. L'anossia è stata ottenuta, utilizzando una "workstation-incubatore" (BUGBOX - Jouan) ermetica saturata con una miscela gassosa priva di ossigeno, composta da N_2/CO_2 (95/5%), umidificata e riscaldata a 37°C. Il gruppo di controllo è stato mantenuto nelle condizioni di coltura standard per tutta la durata dell'esperimento.



Figura 2 BUG-BOX

2.3 Determinazione delle proteine

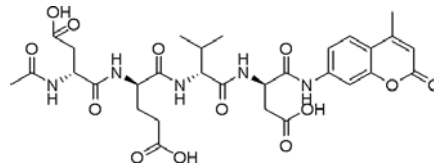
Le proteine sono state determinate, nel sovranatante estratto dalle cellule, secondo il metodo di Bradford¹¹⁸.

2.4 Determinazione dell'attività caspasi

L'attività delle caspasi è stata misurata valutando la digestione del peptide fluorogenico¹¹⁹ Ac-DEVD-AMC (cioè Acetil-AcidoAspartico-Acido Glutamico-Valina-AcidoAspartico-7-amino-4-metilcumarina) substrato della caspasi-3. La rottura proteolitica a livello del residuo di acido aspartico terminale provoca la liberazione dell'amminometilcumarina, che può essere

determinata fluorimetricamente con lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente di 455 nm e 370 nm.

L'attività delle caspasi è stata dosata fluorimetricamente utilizzando un peptide fluorogenico con la sequenza che rappresenta il substrato ottimale per la caspasi di cui si misura l'attività. A scopo dimostrativo è stato riportato il dosaggio della caspasi-3 il cui substrato è l'oligopeptide DEVD.



Ac – Asp – Glu – Val – Asp – AMMINOMETILCUMARINA



CASPASI

Ac – Asp – Glu – Val – Asp + AMMINOMETILCUMARINA
(ALTAMENTE FLUORESCENTE)

La sequenza DEVD viene riconosciuta dalla caspasi 3, la caspasi più conosciuta e studiata, di cui rappresenta il substrato ottimale, però questo peptide viene attaccato anche da altri membri della famiglia della caspasi come la caspasi 6 e la caspasi 7. Per misurare l'attività caspasi nelle colture cellulari, quindi, alla fine delle incubazioni le cellule venivano staccate nel loro medium, raccolte e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm, il pellet veniva poi risospeso in 50 µl di tampone di lisi CHET composto da Hesper 20 mM a pH 7, ditiotreitolo 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0.1%, TritonX100 allo 0.1% e contenente anche i seguenti inibitori di proteasi: fenilmetilsolfonilfluoruro 1 mM ed 1 µg/ml di aprotinina, pepstatina e leupeptina. I lisati cellulari erano poi congelati a -20 °C e scongelati tre volte, ed infine centrifugati 10 minuti a 14.000 g ed il sovrantante veniva conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Per misurare l'attività enzimatica, un volume di 10 µl di estratto (contenente approssimativamente 10 µg di proteina) era mescolato con 20 µl di una miscela di saggio contenente Hesper 100 mM a pH 7, CHAPS 0.1%, saccarosio al 10% e con 0.15 mM di substrato fluorogenico. I campioni, preparati in provette di plastica dal volume totale di 4 ml, erano quindi incubati a 37°C per 15 minuti. Nei bianchi, al posto del campione, erano messi 10 µl di tampone di lisi.

Alla fine dell'incubazione la reazione veniva bloccata mettendo le provette in un bagno di acqua e ghiaccio aggiungendo a ciascun campione 0,1 ml di una soluzione al 2% di sodio

acetato in acido acetico 0.2 M. I campioni erano quindi diluiti con 2,5 ml di acqua e la specifica rottura del substrato Ac-DEVD-AMC veniva misurata per mezzo di uno spettrofluorimetro. Per trasformare la fluorescenza misurata in moli di substrato tagliato, è stata fatta una curva di calibrazione misurando la fluorescenza di concentrazioni crescenti di amminometilcumarina e di amminotrifluorocumarina. Questo ha permesso di ottenere il fattore di conversione nel nostro sistema di dosaggio, che era pari a 0.4 unità di fluorescenza per picomole di substrato trasformato (misurazioni effettuate in condizioni standard con slit di emissione e di eccitazione di 5 nm e valore di fixed scale-attenuazione-di 1.0).

L'attività delle caspasi è stata espressa come U/mg proteine, dove una unità era definita come la quantità di enzima che spezzava 1.0 nanomole di substrato per minuto nelle condizioni descritte. L'attività della caspasi 3 è stata indicata come attività DEVDasica includendo l'attività di tutte le caspasi che digerivano il substrato Ac-DEVD-AMC (soprattutto caspasi 3, 6 e 7).

2.5 Frammentazione del DNA

Per valutare la frammentazione del DNA, sono state utilizzate 2 tecniche diverse: il *laddering* ed il TUNEL.

Per il *laddering* le cellule, al termine del periodo d'incubazione, erano raccolte, lavate con PBS freddo, lisate in 10 mM Tris-HCl a pH 8,2, 10 mM EDTA, SDS 1 % e incubate per tutta la notte con 0,1 mg/ml di proteinchinasi k. Il DNA era estratto con fenolo/cloroformio e precipitato con etanolo in presenza di 0,5 M NaCl a 20°C. Dopo la quantificazione del DNA, 2 µg di ciascun campione erano sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1% impregnato con bromuro di etidio e visualizzati con raggi UV.

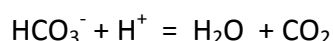
Per quanto riguarda il TUNEL (*terminal deoxytransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) le cellule, seminate su vetrino, al termine del periodo di incubazione erano lavate con PBS, fissate con paraformaldeide e permeabilizzate con TritonX100. I filamenti di DNA tagliati, presenti nei nuclei apoptotici, possono essere identificati marcando i terminali 3'-OH liberi del DNA con un nucleotide modificato, ad opera di una deossinucleotidil-transferasi-terminale (TdT). Il nucleotide modificato, coniugato con Fluoresceina-isotiocianato (FITC, Santa Cruz), rende quindi identificabili perché fluorescenti i nuclei apoptotici utilizzando un microscopio a fluorescenza rovesciato con luce d'emissione a λ compresa tra 494-518 nm. Per effettuare questo saggio è stato utilizzato un kit (*kit Apoptosis Detention System fluorescence*, Promega, WI, USA), in accordo con le istruzioni della casa produttrice. I nuclei delle cellule apoptotiche e non, erano marcati con DAPI (0,1 µg/ml). La percentuale delle

cellule in apoptosi era calcolata attraverso il rapporto tra il numero delle cellule TUNEL-positive e il numero totale delle cellule colorate con DAPI, contate in tre campi scelti a caso.

2.6 Dosaggio dell'attività ornitina-decarbossilasi

Per il dosaggio dell'attività dell'ODC le cellule erano lavate due volte con PBS; staccate in tampone di omogenizzazione sodio fosfato 10 mM, DTT 2,5 mM, raccolte in pool, gelate e scongelate tre volte e centrifugate a 15000 per 10 minuti.

L'attività ODC presente nel soprannatante era misurata attraverso la liberazione della $^{14}\text{CO}_2$ sviluppata dalla L-[1- ^{14}C]-ornitina. La miscela di reazione conteneva 50 μl di soprannatante (100-120 μl di proteina), 0,05 μCi di L-[1- ^{14}C]-ornitina (58 mCi/mole) e 6 nmoli di ornitina non marcata, in un volume finale di 60 μl . La reazione era condotta per 1 ora a 37°C e bloccata con l'aggiunta di 200 μl di acido tricloroacetico al 40%:

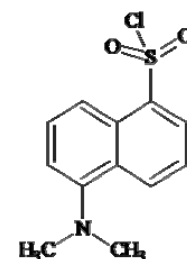


La CO_2 che si sviluppava era raccolta su opportuni filtri di carta impregnati di 20 μl di protosol. Dopo 30 minuti a 37°C, i dischetti di carta erano trasferiti in fiale contenenti 5 ml di liquido scintillante e la radioattività misurata con un apparecchio di scintillazione (Camberra, Packard, MINAXI tricarb 4000).

L'attività ODC era espressa come pmoli di $^{14}\text{CO}_2$ liberata/mg proteina/minuto.

2.7 Dosaggio delle poliamine

Per il dosaggio delle poliamine le cellule, dopo incubazione, erano lavate due volte con soluzione fisiologica (NaCl 0,85%), staccate con HClO_4 0,6 M, raccolte in pool, gelate e scongelate tre volte e centrifugate a 29000 g per 10 minuti. Le poliamine erano quantificate con HPLC dopo derivatizzazione con cloruro di dansile¹²⁰ (la cui formula è mostrata qui accanto).



Il *pellet* era usato per determinare le proteine. Il contenuto di poliamine è stato espresso come nmol/mg proteina.

2.8 Dosaggio immunocitochimico del citocromo c

Per il dosaggio immunocitochimico del citocromo c, le cellule erano seminate su vetrino in piastre *multiwell* da sei pozzetti alla concentrazione di 60000 cellule/pozzetto. Al termine dei periodi di incubazione, le cellule erano lavate per due volte con PBS, fissate con paraformaldeide al 3% in PBS a 37°C per 15 minuti. Erano lavate nuovamente per tre volte in PBS / glicina, poi permeabilizzate in etanolo assoluto a -20°C per 20 minuti. Dopo aver

saturato con PBS / BSA 1% / Tween 20 0,1% a temperatura ambiente per 30 minuti, erano incubate con anticorpo primario monoclonale anti-citocromo c (BD Biosciences) 1:100 per 45 minuti a temperatura ambiente, quindi lavate e incubate con anticorpo secondario anti-mouse 1:500 coniugato con FITC. Dopo 30 minuti di incubazione veniva verificato il rilascio del citocromo c utilizzando un microscopio a fluorescenza rovesciato con luce d'emissione a λ compresa tra 494-518 nm.

2.9 Western blotting

Le cellule venivano staccate nel loro *medium*, raccolte e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm, il *pellet* veniva poi risospeso in 50-100 μ l di tampone di lisi CHET composto da Hepes 20 mM a pH 7, ditiotreitolo 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0.1%, TritonX100 allo 0.1% e contenente anche i seguenti inibitori di proteasi: fenilmetilsolfonilfluoruro 1 mM ed 1 μ g/ml di aprotinina, pepstatina e leupeptina. Per effettuare analisi di proteine fosforilate, al tampone di lisi erano aggiunti anche inibitori delle fosfatasi. I lisati cellulari erano poi congelati e scongelati 3 volte per facilitare la rottura delle cellule, infine centrifugati per 10 minuti a 14.000 g. Sul sovrantante venivano dosate le proteine ed i campioni venivano diluiti in *loading buffer* (2 % SDS / 5 % glicerolo / 0,002 % blu di bromo fenolo / 4 % β -mercaptoetanolo in 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8) e bolliti per 3 minuti per denaturare le proteine. Aliquote corrispondenti a 10-80 μ g di proteine (a seconda della proteina da identificare) erano analizzate attraverso SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilamide con SDS). I gel utilizzati erano solitamente al 10% di acrilamide. Le proteine separate su gel erano poi trasferite su membrana di nitrocellulosa, saturata per un'ora con latte al 5%. Gli anticorpi primari sono stati utilizzati secondo le specifiche del produttore effettuando diluizioni variabili tra 1:500 e 1:2000, ad eccezione dell'anticorpo anti- β -actina, che è stato diluito 1:50.000. Gli anticorpi secondari sono stati utilizzati secondo le specifiche del produttore effettuando diluizioni 1:2000 per gli anti-*rabbit* (SantaCruz) e 1:2500 per gli anti-*mouse* (SantaCruz).

Per garantire che le variazioni nelle proteine rilevate con questa tecnica non siano frutto di errori di carico dei campioni nel gel, è stata utilizzata come proteina *housekeeping* la β -actina, che risulta essere piuttosto costante nelle cellule cardiache anche in seguito a trattamenti vari.

2.10 Analisi statistica

I valori riportati rappresentano la media \pm S.D. di 3 determinazioni, condotte in duplicato, ottenute da 3 colture indipendenti. Il confronto fra i gruppi è stato effettuato usando il test "t" di student e con two-way ANOVA. Le differenze sono considerate significative per $p < 0.05$.

3.0 Risultati

3.1 Ruolo delle poliamine nell'apoptosi indotta da ischemia simulata nelle cellule H9c2

Durante l'ischemia molteplici fattori contribuiscono all'attivazione del processo di morte cellulare. Alcuni di questi sono la deprivazione di nutrienti, di fattori di crescita e di sopravvivenza e di ossigeno. Sperimentalmente è possibile mimare una condizione di ischemia in colture cellulari, privando il terreno di coltura di fattori nutritivi, energetici e di ossigeno. In uno studio precedentemente effettuato¹²¹ è stato esaminato il processo di apoptosi nelle H9c2 sottoposte a questa combinazione di stimoli che simulano la situazione di stress del tessuto ischemico.

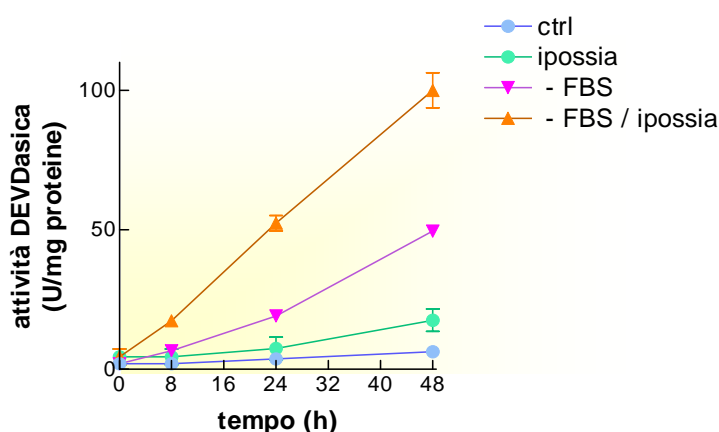


Figura 3 La deprivazione di siero e di ossigeno stimola l'attività delle caspasi in cellule H9c2.

Le cellule H9c2 sono state incubate, per i tempi indicati, in DMEM contenente il 10% di FBS (Ctrl) o in DMEM senza FBS (-FBS), in normossia o in ipossia. Al termine dell'incubazione è stata misurata l'attività caspasi. I dati riportati sono una media \pm S.E.M. di tre determinazioni.

In queste condizioni, definite di ischemia simulata, si attiva il processo di morte apoptotica nella linea di cardiomioblasti di ventricolo di ratto H9c2. Come indice di apoptosi è stato scelto il dosaggio dell'attività delle caspasi, considerate a tutt'oggi un *marker* precoce e un punto centrale del processo di morte apoptotica.

Le cellule sono state incubate per 8, 24 e 48 ore in condizioni di coltura standard (DMEM con 10% di FBS) e in DMEM deprivato di siero, sia in presenza che in assenza di ossigeno.

La figura 3 mostra che l'assenza di siero causa, in queste cellule, l'attivazione delle caspasi, effetto che è progressivo nel tempo e che è già evidente dopo 8 ore di trattamento. La contemporanea assenza di ossigeno, cioè la condizione di ischemia simulata, aumenta significativamente l'attivazione delle caspasi, già evidente nella deprivazione di siero. È interessante notare che la sola ipossia non sembra indurre un significativo aumento dell'attività caspasi nelle cellule di controllo. Sembra quindi che l'assenza di siero e la mancanza di ossigeno abbiano effetto sinergico sull'attivazione delle caspasi.

3.1.1 Il DFMO protegge dall'apoptosi indotta da ischemia simulata le cellule H9c2

Allo scopo di verificare un coinvolgimento delle poliamine, mediatori endogeni coinvolti in numerosi eventi che possono influenzare la proliferazione, la sopravvivenza e la morte cellulare, nell'attivazione delle caspasi a seguito del trattamento ischemico, abbiamo trattato per 48 ore le colture cellulari con α -difluorometilornitina (DFMO) 100 μ M, un inibitore dell'ornitina decarbossilasi (ODC), primo enzima della via di biosintesi delle poliamine. Questa condizione causa una completa deplezione del contenuto intracellulare di putrescina e riduce il contenuto di spermidina e di spermina (tabella 1).

	CONTROLLO	DFMO
Putrescina	2.1 \pm 0.5	0.2 \pm 0.1
Spermidina	2.9 \pm 0.3	1.6 \pm 0.5
Spermina	3.5 \pm 0.9	2.8 \pm 0.8

Tabella 1 contenuto di poliamine in H9c2, trattate con DFMO 100 μ M per 24 ore

La Fig. 4 mostra che le cellule sopravvissute dopo pre-trattamento con DFMO, ed esposizione all'ischemia simulata, erano significativamente più numerose di quelle mantenute in assenza di DFMO.

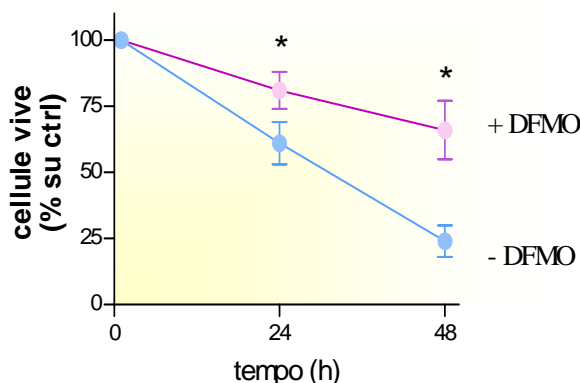


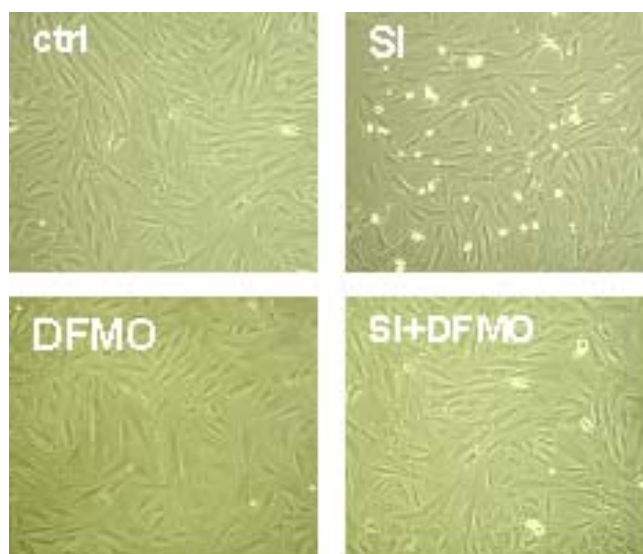
Figura 4 Cellule esposte ad ischemia simulata in presenza e in assenza di DFMO.

Le cellule, mantenute per 24 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state sottoposte per i tempi indicati a condizioni di ischemia simulata, rappresentata da assenza di siero e di ossigeno. La sopravvivenza delle cellule trattate con ischemia simulata in presenza o assenza di DFMO, era misurata con il metodo del trypan blu. *P<0,05 vs cellule controllo.

L'effetto protettivo del DFMO è anche evidenziato nella Fig. 5, la quale mostra che l'aumento di cellule morte a seguito dell'ischemia simulata (SI) è fortemente ridotto in presenza di DFMO (SI+DFMO).

Figura 5 Immagine rappresentativa di cellule H9c2 in condizioni di ischemia simulata.

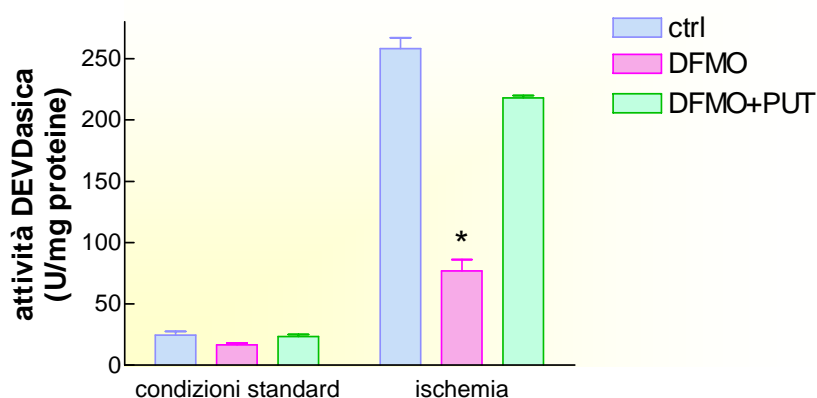
Le cellule, mantenute per 24 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state sottoposte per i tempi indicati a condizioni di ischemia simulata (SI), rappresentata da assenza di siero e di ossigeno. *P<0,05 vs cellule controllo.



Allo scopo di valutare possibili meccanismi attraverso i quali la deplezione di poliamine esplica l'osservato effetto protettivo nella morte cellulare, sono stati esaminati alcuni eventi molecolari caratteristici del processo dell'apoptosi quali l'attivazione delle caspasi e la frammentazione del DNA.

Figura 6 Effetto delle deplezione di poliamine sull'attività delle caspasi in cellule H9c2 esposte ad ischemia simulata

Le cellule H9c2, fatte crescere per 24 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M sono state incubate per 24 h in condizioni di controllo o di ischemia simulata. Colture parallele erano trattate con DFMO 100 μ M e putrescina (PUT) 100 μ M. *P<0,05 vs cellule controllo.



Il pretrattamento con DFMO determina, dopo 24 ore di trattamento ischemico, una significativa riduzione dell'attivazione delle caspasi (figura 6). La figura 6 mostra inoltre che l'aggiunta di Putrescina 100 μ M al terreno di coltura contenente DFMO, condizione che porta ad un recupero dei livelli intracellulari di poliamine, ripristina quasi completamente la capacità delle cellule di attivare le caspasi a seguito del trattamento ischemico. Questi risultati indicano pertanto un coinvolgimento delle poliamine nell'attivazione delle caspasi in cardiomioblasti H9c2 sottoposti ad ischemia simulata. Il trattamento con DFMO è in grado di

ridurre non solo l'attività caspatica, ma anche la frammentazione del DNA, altro evento che si verifica nell'attivazione del programma apoptotico.

Figura 7 Effetto della deplezione di poliamine sulla frammentazione del DNA in cellule H9c2 sottoposte ad ischemia simulata.

Le cellule H9c2, fatte crescere per 24 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state incubate per 24 ore in condizioni di controllo o di ischemia simulata.



Infatti (figura 7) l'elettroforesi su gel d'agarosio del DNA estratto da cellule H9c2 sottoposte per 24 ore ad ischemia simulata, mostra le tipiche bande di frammentazione del DNA che non sono più rilevabili dopo trattamento delle cellule con DFMO.

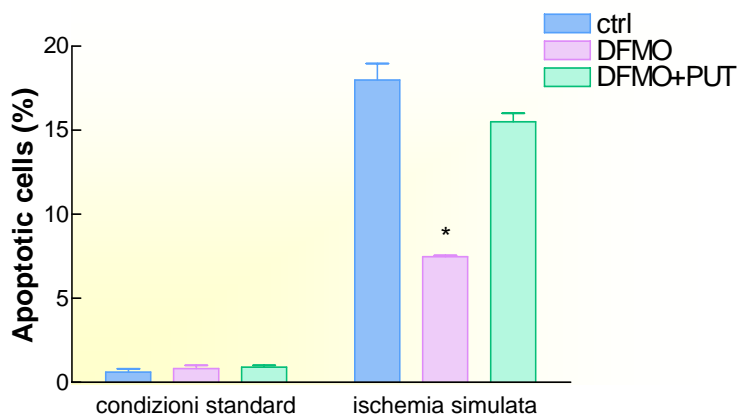


Figura 8 Effetto della deplezione delle poliamine sulla frammentazione del DNA in H9c2 esposte ad ischemia simulata

Le cellule H9c2, fatte crescere per 24 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M sono state incubate per 48 h in condizioni di controllo o di ischemia simulata. Colture parallele erano trattate con DFMO 100 μ M e putrescina (PUT) 100 μ M. *P<0,05 vs cellule controllo.

Attraverso la tecnica del TUNEL (Figura 8) abbiamo ottenuto anche un'indicazione quantitativa dell'effetto protettivo ottenuto con il DFMO. Si può osservare che il trattamento con DFMO riduce di circa il 60% il numero di cellule morte per apoptosi in seguito al trattamento ischemico.

3.1.2 L'ischemia simulata altera il contenuto intracellulare di poliamine

Il trattamento delle colture cellulari H9c2 con ischemia simulata determina una rapida induzione dell'ODC. La figura 9 mostra infatti che dopo 3 ore di trattamento con ischemia simulata si osserva un aumento dell'attività ODC pari a circa il 300% del controllo. Tale attività declina poi nel tempo, raggiungendo i valori controllo dopo 24 ore. La rapida induzione dell'ODC è completamente prevenuta quando le cellule erano trattate con DFMO ed è parallela ad un aumento del contenuto intracellulare di poliamine (figura 10).

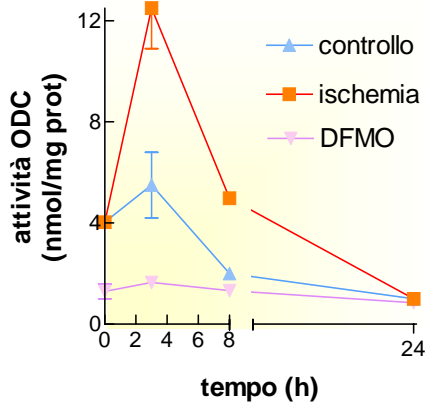


Figura 9 Effetto dell'ischemia simulata sull'attività ODC in cellule H9c2.

Le cellule, mantenute per 24 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state sottoposte per i tempi indicati a condizioni di ischemia simulata, rappresentata da assenza di siero e di ossigeno.

In particolare, in coincidenza con il picco di attività dell'ODC, si osserva un accumulo di putrescina, pari a circa due volte i valori di controllo. Il contenuto di putrescina declina nel tempo raggiungendo i valori basali dopo 24 ore di trattamento.

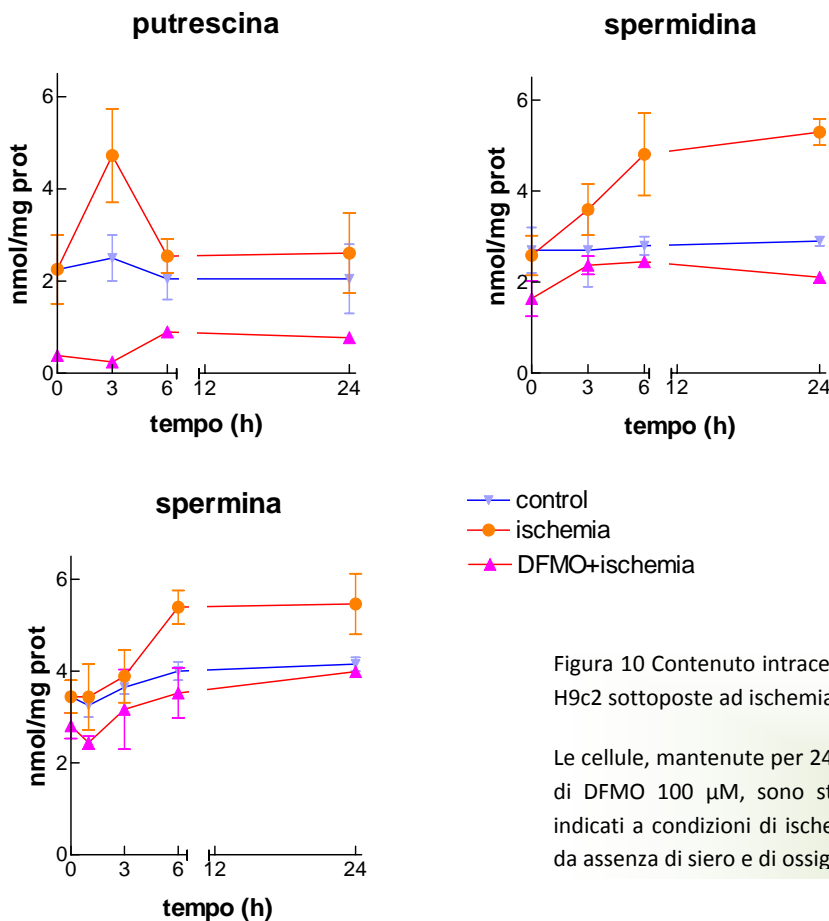


Figura 10 Contenuto intracellulare di poliamine in cellule H9c2 sottoposte ad ischemia simulata.

Le cellule, mantenute per 24 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state sottoposte per i tempi indicati a condizioni di ischemia simulata, rappresentata da assenza di siero e di ossigeno.

Al contrario la concentrazione intracellulare di spermidina e di spermina aumenta progressivamente nel tempo mantenendosi su valori pari al 200% del controllo dopo 24 ore di trattamento.

La figura 10 mostra inoltre che la presenza di DFMO nel terreno di coltura causa, rispetto al controllo, una forte riduzione di putrescina e di spermidina, mentre riduce solo parzialmente i livelli di spermina. Questi risultati suggeriscono pertanto che l'osservata attivazione delle caspasi dipenda soprattutto dagli alti livelli di spermina e di spermidina, mentre il precoce aumento di putrescina potrebbe essere responsabile solamente della successiva biosintesi di spermidina e spermina.

3.1.3 Le poliamine influenzano la via intrinseca di attivazione dell'apoptosi nelle cellule H9c2 sottoposte ad ischemia simulata

Per individuare a quale livello la deprivazione di poliamine esercita l'effetto protettivo evidenziato nei precedenti esperimenti, sono stati indagati alcuni eventi che caratterizzano la via mitocondriale di attivazione dell'apoptosi: la *down-regulation* di Bcl-xl, il rilascio del citocromo c dai mitocondri e l'attivazione della procaspasi-9.

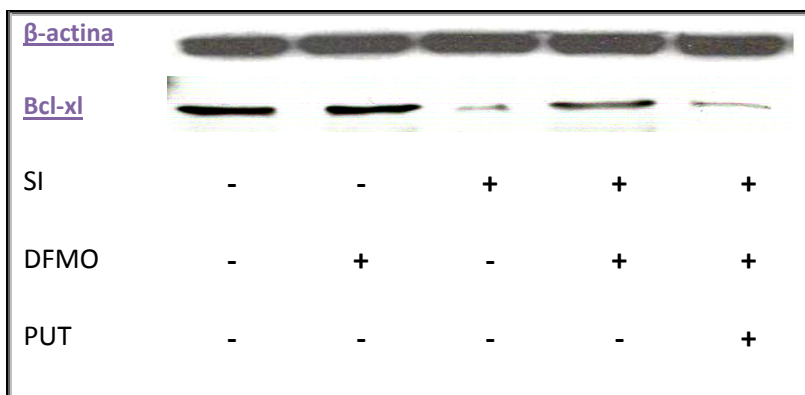


Figura 11 Effetto della deplezione delle poliamine sulla espressione delle Bcl-xl

Le cellule H9c2, fatte crescere per 24 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M sono state incubate per 24 h in condizioni di controllo o di ischemia simulata (SI). Colture parallele erano trattate con DFMO 100 μ M e putrescina (PUT) 100 μ M. La β -actina era usata come controllo interno.

I risultati mostrano che l'ischemia simulata determina una riduzione dell'espressione della proteina a significato anti-apoptotico Bcl-xl (figura 11). Tale effetto è prevenuto in presenza di DFMO. La figura 11 indica inoltre che la contemporanea presenza di putrescina nel terreno di coltura abolisce l'effetto protettivo del DFMO.

Il rilascio del citocromo c da parte del mitocondrio è una conseguenza della risposta della cellula a stimoli apoptotici. E' stato valutato, grazie all'utilizzo di un anticorpo specifico, la localizzazione del citocromo c in H9c2 sottoposte per 24 ore ad ischemia simulata.

La figura 12 mostra chiaramente che, rispetto a colture controllo (Ctrl) dove il citocromo *c* è uniformemente distribuito attorno al nucleo sotto forma di “bastoncini” fluorescenti, che rappresentano i mitocondri, le colture trattate per 24 ore con ischemia (SI) mostrano una maggiore diffusione del citocromo *c* nel citoplasma, con formazione di aggregati puntiformi, che indicano l’avvenuto rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio. Questo effetto è completamente prevenuto quando le colture cellulari erano trattate con DFMO (SI+DFMO). La figura 12 mostra inoltre che la somministrazione di putrescina esogena (100 μ M) a colture trattate con DFMO ripristina il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, come era stato osservato nelle colture sottoposte al trattamento ischemico (SI+DFMO+Put).

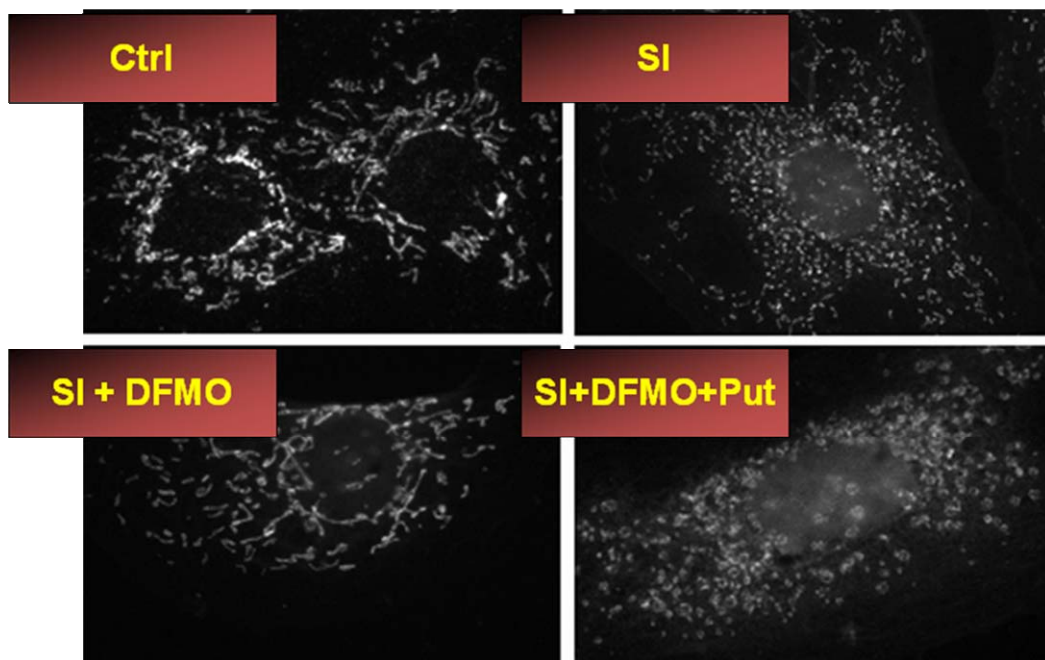


Figura 12 Rilascio del citocromo *c* dai mitocondri in cellule H9c2.

Ctrl: Controllo.

SI: Ischemia 24 ore.

SI + DFMO: Ischemia 24 ore + DFMO 100 μ M.

SI + DFMO + PUT: Ischemia 24 ore + DFMO 100 μ M + Putrescina 100 μ M.

Una volta rilasciato, prendendo parte alla formazione dell’apoptosoma, il citocromo *c* può scatenare l’attivazione di una caspasi iniziatrice, come la caspasi 9, che poi darà il via alla cascata di eventi che rappresentano la fase di esecuzione del programma di morte cellulare.

Per tanto è stata valutata mediante *western blotting* la quantità di procaspasi 9 inattiva presente nelle cellule sottoposte ai vari trattamenti. Da ciò è emerso che l’ischemia simulata provoca una riduzione della banda immunoreattiva relativa al proenzima (Figura 13), evento che corrisponde ad un’attivazione della cascata caspasi. Il pretrattamento delle cellule con

DFMO contrasta questo evento. Anche in questo caso il trattamento combinato con DFMO e putrescina permette l'attivazione della procaspasi-9.

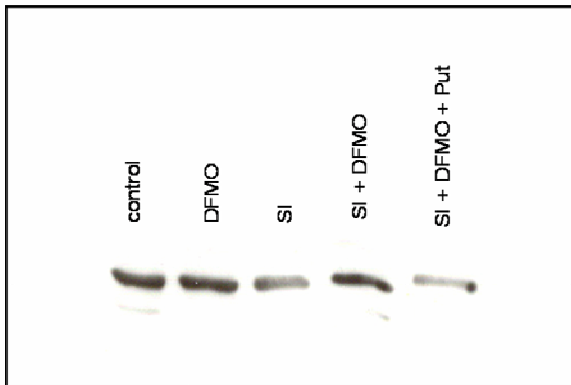


Figura 13 Effetto della deplezione di poliamine sull'attivazione della caspasi 9

Le cellule H9c2, fatte crescere per 24 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M sono state incubate per 24 h in condizioni di controllo o di ischemia simulata (SI). Colture parallele erano trattate con DFMO 100 μ M e putrescina (PUT) 100 μ M. L'anticorpo utilizzato riconosce la procaspasi 9, ovvero la forma inattiva dell'enzima.

Nel loro insieme questi risultati sono stati oggetto di una pubblicazione sul *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* ("Involvement of polyamines in apoptosis of cardiac myoblasts in a model of simulated ischemia." *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006;40:775-782).

3.2 Meccanismi di danno cellulare indotto da stimoli neuro-ormonali in cardiomiociti neonatali di ratto. Ruolo delle poliamine

Diverse linee di ricerca hanno dimostrato che i meccanismi neuro-ormonali giocano un ruolo fondamentale nella progressione dell'insufficienza cardiaca. Gli stimoli di cui abbiamo indagato gli effetti sulle cellule cardiache sono la norepinefrina e l'aldosterone.

3.2.1 La norepinefrina e l'aldosterone alterano il metabolismo delle poliamine

E' stato innanzi tutto valutato l'effetto della norepinefrina (NE) e dell'aldosterone (ALD) sull'attività dell'ODC, enzima chiave del metabolismo delle poliamine.

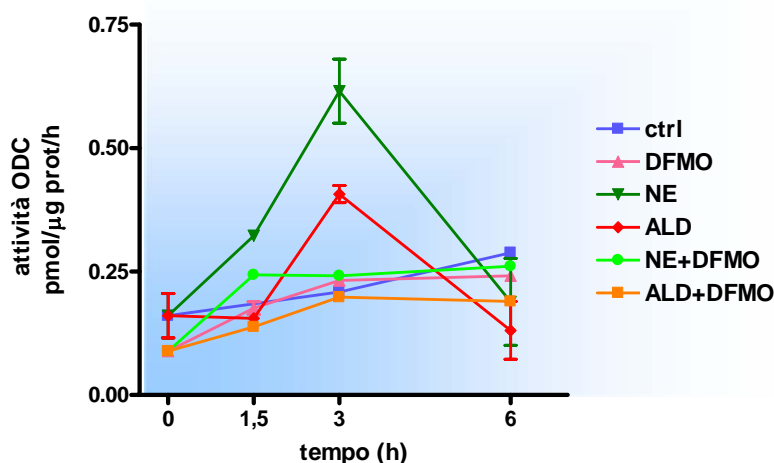


Figura 14 Effetto della norepinefrina e dell'aldosterone sull'attività ODC in cardiomiociti neonatali di ratto.

Le cellule, mantenute per 72 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state trattate per i tempi indicati con NE 50 μ M o ALD 10 μ M.

I risultati ottenuti indicano che entrambi gli effettori aumentano dopo 3 ore l'attività ornitina-decarbossilasica. Tale aumento è di circa il 300% nel caso della NE 50 μ M e del 180% nel caso del trattamento con ALD 10 μ M.

Il pretrattamento con DFMO in entrambi i casi previene completamente l'attivazione dell'enzima.

3.2.2 La norepinefrina e l'aldosterone inducono un aumento dell'attività caspatica. Effetto del DFMO

E' stato successivamente studiato l'effetto di tali mediatori neuro-ormonali su parametri indicatori della morte per apoptosi quale l'attivazione delle caspasi. I risultati ottenuti indicano che la NE 50 μ M determina dopo 48 ore un aumento di circa 8 volte dell'attività caspatica (figura 15). I dati ottenuti mostrano inoltre che il pretrattamento delle colture cellulari con DFMO riduce tale attivazione delle caspasi, suggerendo un effetto protettivo conferito dalla deplezione del contenuto intracellulare di poliamine nei confronti di questo stimolo di morte.

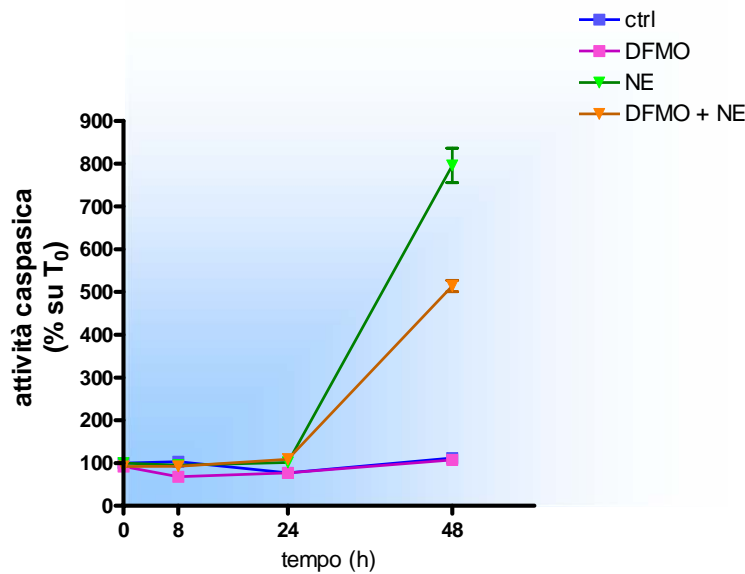


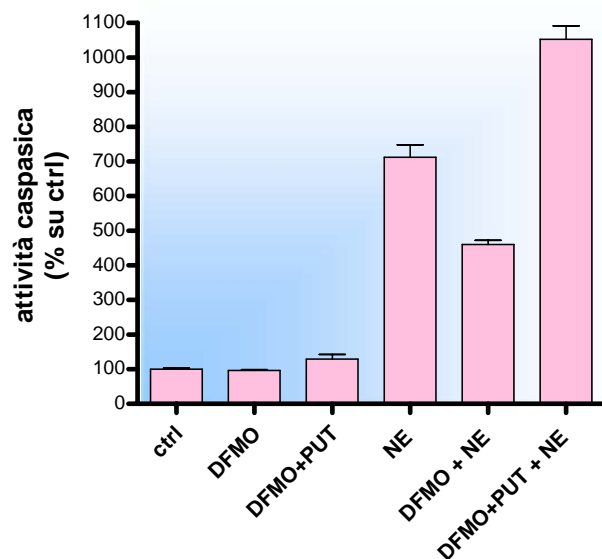
Figura 15 Effetto delle deplezioni di poliamine sull'attività delle caspasi in cardiomiociti neonatali di ratto trattati con norepinefrina.

Le cellule, fatte crescere per 72 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state incubate per 48 h con o senza norepinefrina (NE) 50 μ M.

A conferma che l'effetto legato al pretrattamento con DFMO sull'osservata attivazione delle caspasi sia da imputare alla deplezione di poliamine e non ad altre eventuali azioni del farmaco, la figura 16 mostra che la somministrazione di putrescina esogena contemporanea al trattamento con DFMO, è in grado non solo di ripristinare, ma anche di incrementare ulteriormente l'attivazione delle caspasi ad opera della NE.

Figura 16 Effetto del pretrattamento contemporaneo con DFMO e putrescina (PUT) sull'attività caspasi indotta da norepinefrina.

Le cellule, fatte crescere per 72 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M sono state incubate per 48 h con o senza norepinefrina (NE) 50 μ M. Colture parallele erano trattate con DFMO 100 μ M e putrescina (PUT) 100 μ M.



Seppure di entità molto minore, anche l'aldosterone causa un aumento dell'attività caspasi nei cardiomiociti neonatali di ratto, particolarmente evidente dopo 24 ore di

trattamento (figura 17). Anche in questo caso il pretrattamento con DFMO esercita un'azione protettiva, riducendo l'effetto dell'aldosterone sulle caspasi.

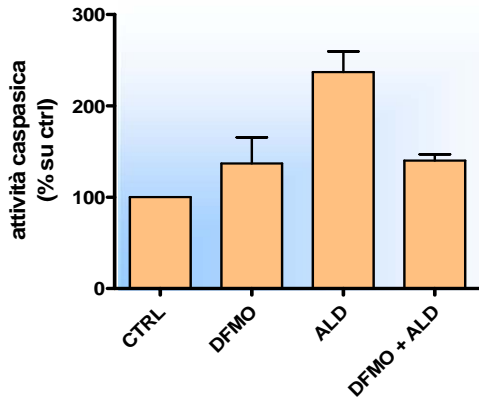


Figura 17 Effetto delle deplezione di poliamine sull'attività delle caspasi in cardiomiociti neonatali di ratto trattati con aldosterone.

Le cellule, fatte crescere per 72 h in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state incubate per 24 h con o senza Aldosterone 10 μ M.

3.2.3 Effetto della norepinefrina, dell'aldosterone e del DFMO sull'espressione della survivina

Allo scopo di indagare possibili vie attraverso le quali la deplezione di poliamine esercita l'osservato effetto protettivo sui processi di morte cellulare, è stata studiata l'espressione della survivina, una proteina a significato antiapoptotico. Una diminuzione della sua espressione è infatti correlata alla morte cellulare programmata.

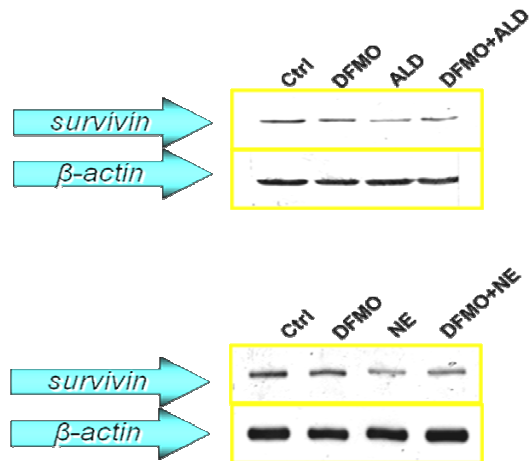


Figura 18 *Down-regulation* della survivina in seguito a trattamento con norepinefrina ed aldosterone. Effetto del pretrattamento con DFMO.

Le cellule, mantenute per 72 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono state trattate per 24 ore con NE 50 μ M o ALD 10 μ M. La β -actina era usata come controllo interno.

La figura 18 mostra che sia l'aldosterone che la norepinefrina sono in grado di ridurre l'espressione della survivina nei cardiomiociti, e che in presenza di DFMO tale effetto è molto meno evidente.

3.2.4 Il DFMO altera la trasduzione del segnale indotta dalla norepinefrina

Diverse sono le vie di trasduzione del segnale coinvolte nel controllo sia dell'apoptosi che della crescita della cellula cardiaca. In generale una condizione di stress metabolico, quale potrebbe essere quella modulata da NE, comporta l'attivazione della via della chinasi attivata dall'AMP (AMPK), un sensore dello stato energetico della cellula, che attiva diverse vie metaboliche correlate con la produzione di ATP.

Allo stato attuale, alcune ricerche indicano un ruolo pro-apoptotico della via del segnale mediato dall'AMPK in alcuni modelli sperimentali di apoptosi indotta nei cardiomiociti, mentre tra le proteine chinasi coinvolte nei meccanismi di cardioprotezione particolare attenzione è stata rivolta alla serina/treonina chinasi Akt. Sembra infatti che l'attivazione di questa via sia correlata con la sopravvivenza cellulare e con l'inibizione dei processi apoptotici.

La successiva fase della ricerca è stata pertanto condotta allo scopo di verificare se queste vie di segnalazione sono coinvolte nel meccanismo attraverso il quale il trattamento con NE porta alla morte per apoptosi le cellule cardiache.

I risultati ottenuti indicano che la NE causa un rapido aumento dello stato di fosforilazione, e quindi dell'attivazione della proteina Akt già dopo 15 minuti di trattamento (Figura 19). Questo effetto permane dopo un'ora, mentre dopo 5 ore di trattamento il livello di fosfo-Akt torna al livello del controllo.

Le cellule pretrattate con DFMO non mostrano significative differenze rispetto alle cellule trattate solo con NE nei tempi brevi (15 minuti ed 1 ora). Tuttavia dopo 5 ore di trattamento, mentre nelle cellule trattate solo con NE la fosforilazione

dell'Akt non è più osservabile, nelle cellule pretrattate con DFMO si mantiene ancora elevata. Questi risultati suggeriscono che il pretrattamento con DFMO influenzi la durata del segnale pro-sopravvivenza dell'Akt prolungando la sua attivazione.

Il trattamento con NE causa anche un aumento della fosforilazione/attivazione di AMPK già evidente dopo un'ora e che si mantiene nel tempo fino ad 8 ore (figura 20).

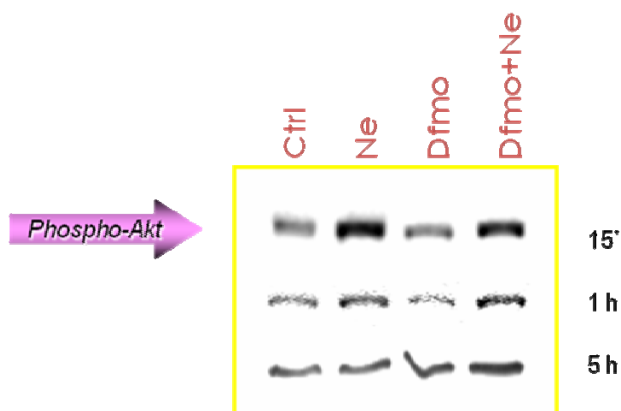
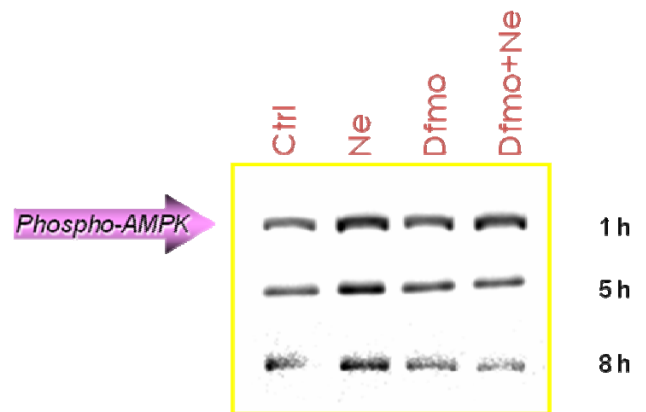


Figura 19 Livelli di fosfo-Akt in seguito a trattamento con norepinefrina. Effetto del pretrattamento con DFMO.

I cardiomiociti neonatali, mantenuti per 72 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono stati trattati per i tempi indicati con NE 50 μ M.

Figura 20 Livelli di fosfo-AMPK in seguito a trattamento con norepinefrina. Effetto del pretrattamento con DFMO.

I cardiomiociti neonatali, mantenuti per 72 ore in presenza o in assenza di DFMO 100 μ M, sono stati trattati per i tempi indicati con NE 50 μ M.



La figura 20 mostra inoltre che anche in questo caso il pretrattamento con DFMO sembra influenzare la durata del segnale. Infatti mentre non altera la risposta alla NE dopo un'ora di trattamento, dopo 5 ore il livello di fosforilazione di AMPK nei campioni pretrattati con DFMO torna ai valori controllo.

3.2.5 Il trattamento con un induttore dell'AMPK e un inibitore dell'Akt causa morte cellulare in cellule H9c2

Per valutare il coinvolgimento dell'AMPK e dall'Akt nel processo di morte cellulare nella cellula cardiaca, abbiamo trattato le cellule con AICAR, un attivatore dell'AMPK, e/o con LY, un inibitore della via dell'Akt.

I risultati ottenuti indicano che il trattamento con AICAR induce un aumento della morte cellulare, e che inibendo contemporaneamente l'Akt tale effetto è notevolmente potenziato (figura 23).

Questi risultati sono a sostegno dell'ipotesi di un coinvolgimento di entrambe le vie nella trasduzione del segnale mediata dalla NE e che porta a morte per apoptosi.

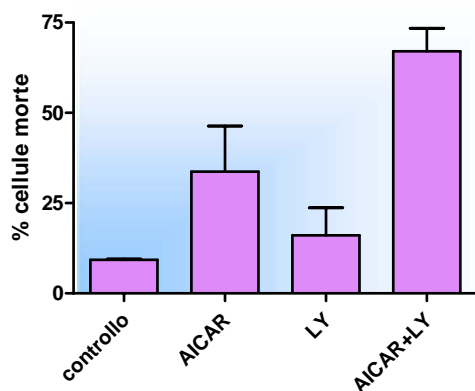


Figura 21 Aumento della morte cellulare in cellule H9c2 in seguito alla stimolazione dell'AMPK ed all'inibizione dell'Akt.

Le cellule, cresciute per 24 ore, sono state trattate con LY 20 μ M e/o AICAR 4 mM per 48 ore.

3.2.6 Il DFMO modula l'espressione delle fosfatasi coinvolte nella disattivazione dell'Akt e dell'AMPK

Alla luce dei risultati sopra riportati si può ipotizzare che l'osservato effetto protettivo del DFMO nei confronti dell'apoptosi indotta da NE nei cardiomiociti neonatali di ratto, possa essere mediato dalla modulazione della durata dei segnali responsabili del controllo dei processi di crescita, proliferazione e morte cellulare. Allo scopo di verificare tale ipotesi sono stati condotti esperimenti per verificare se la deplezione di poliamine possa essere messa in correlazione con alterazioni nell'espressione delle fosfatasi specifiche delle due vie che, defosforilando i rispettivi enzimi li riportano alla forma inattiva. E' stato per tanto valutato l'effetto del trattamento con DFMO sull'espressione della fosfatasi-2-A (PP2A), deputata alla defosforilazione-inattivazione dell'Akt, e sull'espressione della fosfatasi-2-C (PP2C) deputata alla defosforilazione-inattivazione dell'AMPK.

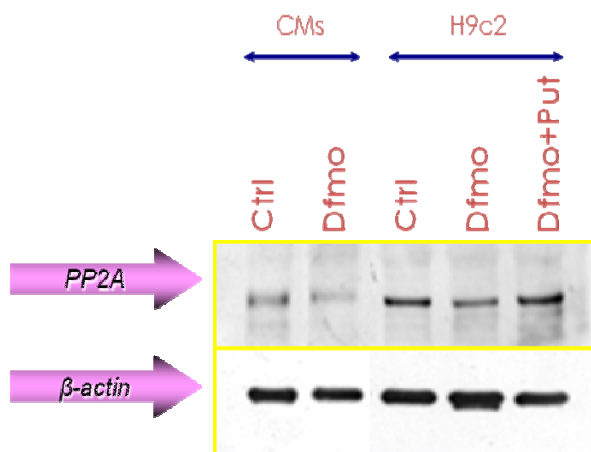


Figura 22 Livelli di PP2A in cardiomiociti neonatali (CMs) e in H9c2 cresciuti in presenza o in assenza di DFMO.

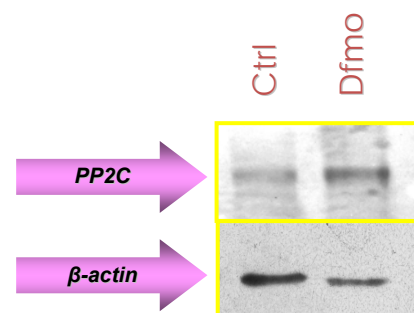
I cardiomiociti sono cresciuti per 72 h in presenza di DFMO 100 μ M. Le H9c2 sono cresciute per 48 h in presenza di DFMO 100 μ M o in presenza di DFMO e putrescina (Put) 100 μ M.

I risultati ottenuti sostengono questa ipotesi. Infatti la figura 22 mostra che sia cardiomiociti neonatali che cardiomioblasti H9c2 cresciuti in presenza di DFMO esprimono un contenuto di PP2A inferiore alle cellule cresciute in condizioni controllo.

Al contrario la PP2C, enzima che defosforilando la AMPK la inattiva, è più espressa rispetto ai controlli, nei cardiomiociti trattati con DFMO (Figura 23).

Figura 23 Livelli di PP2C in cardiomiociti neonatali cresciuti in presenza o in assenza di DFMO.

I cardiomiociti sono cresciuti per 72 h in presenza di DFMO 100 μ M.



4.0 Discussione

L'insufficienza cardiaca rappresenta l'evoluzione finale comune ad una serie di patologie cardiovascolari che comprendono l'ipertensione, le patologie valvolari, l'infarto ed altre cardiomiopatie. Le patologie cardiovascolari, ed in particolare le malattie di tipo ischemico, rappresentano la più frequente causa di morte nei paesi industrializzati. Per questa ragione attualmente uno degli obiettivi di maggior interesse per la ricerca in ambito cardiovascolare consiste nello studio dei meccanismi molecolari che sottostanno al danno ischemico. La comprensione di tali meccanismi potrebbe infatti offrire l'opportunità di nuove strategie terapeutiche che consentano una riduzione del danno.

L'ischemia del miocardio si verifica quando il cuore riceve un apporto ematico inferiore a quello richiesto dal suo metabolismo. Diverse componenti contribuiscono al danno dei cardiomiociti durante l'episodio ischemico. Essi infatti sono sottoposti a stress metabolico a causa del diminuito apporto di substrati energetici, della mancanza di ossigeno e della mancata rimozione dei cataboliti.

Una delle risposte cellulari a situazioni di "stress" è l'attivazione del programma di morte cellulare chiamato apoptosi, inizialmente con un intento "protettivo", ma che può diventare critico, al perdurare della condizione di stress. L'apoptosi è caratterizzata da diversi eventi biochimici, ma il punto centrale di questo processo è rappresentato dall'attivazione delle caspasi, una famiglia di cistein-proteasi responsabili di molte se non di tutte, le caratteristiche del processo apoptotico. Questi enzimi vengono sintetizzati come precursori inattivi, e sono attivati mediante scissione proteolitica, processo che coinvolge interazioni ligando-recettore e/o i mitocondri³³.

Dati presenti in letteratura indicano che il processo apoptotico può essere attivato nei cardiomiociti sia nel cuore intatto *in vivo* che in coltura *in vitro*, se esposti a differenti stimoli tossici⁷⁰⁻²⁷. E' stato dimostrato che sia l'ischemia da sola, che in combinazione con la riossigenazione, può innescare l'apoptosi in cardiomiociti in modo simile ad altri stress cellulari, come la deprivazione di fattori di crescita o di sopravvivenza, radiazioni UV e agenti chemioterapici. Nonostante numerose evidenze sperimentali suggeriscano che si attivi nel cuore, in seguito a danno ischemico, il processo di morte apoptotica, i meccanismi e la trasduzione del segnale attraverso i quali questo stimolo induce apoptosi non sono ancora completamente noti.

Nel corso degli ultimi anni alcune osservazioni sperimentali hanno suggerito, anche se in modo contrastante, un coinvolgimento delle poliamine nell'induzione di apoptosi. Dall'evidenza sperimentale risulta infatti che, a seconda del modello cellulare utilizzato, la deplezione del contenuto intracellulare di poliamine può ridurre o aumentare la sensibilità delle cellule verso stimoli citotossici.

La prima parte di questa tesi è stata dedicata all'indagine di alcuni eventi biochimici e molecolari che portano all'attivazione del processo apoptotico in cardiomioblasti di ratto

sottoposti ad ischemia, in relazione al contenuto intracellulare ed al metabolismo delle poliamine. E' stato simulato un evento ischemico esponendo le colture ad ipossia severa ($pO_2 < 1\%$) in un terreno privo di siero per tempi diversi. Per stabilire una correlazione tra gli eventi scatenati dall'ischemia e le poliamine, le cellule sono state coltivate in presenza ed in assenza di DFMO, un inibitore specifico della sintesi di questi poliamine organici.

I risultati ottenuti indicano che l'esposizione delle colture di cellule H9c2 ad ischemia simulata, rappresentata da deprivazione di siero e di ossigeno, determina un precoce e progressivo incremento dell'attività caspasi. Tale incremento si correla a variazioni della concentrazione intracellulare di poliamine. La condizione di ischemia simulata determina infatti un precoce aumento dei livelli intracellulari di putrescina, spermidina e spermina. Il trattamento delle colture cellulari con DFMO previene la capacità dell'ischemia di attivare le caspasi e quindi di indurre la morte cellulare per apoptosi. Tale capacità risulta completamente ripristinata quando il contenuto intracellulare di poliamine è ristabilito dall'aggiunta nel mezzo colturale di putrescina esogena.

Il trattamento ischemico a cui sono sottoposte le colture cellulari causa non solo l'attivazione delle caspasi, ma anche la frammentazione del DNA, altro indice che nella cellula è attivato il programma apoptotico. Anche in questo caso il trattamento delle colture cellulari con DFMO previene la frammentazione del DNA.

Questi risultati pertanto suggeriscono che, in colture di cardiomioblasti di ratto sottoposte ad ischemia simulata, le poliamine siano necessarie per l'attivazione del programma apoptotico.

Recenti evidenze mostrano che anche in altri modelli sperimentali le poliamine mediano l'attivazione dell'apoptosi. In particolare, è stato osservato che in fibroblasti immortalizzati di topo la riduzione del contenuto intracellulare di poliamine riduce la stimolazione delle caspasi ad opera dell'etoposide, attraverso l'inibizione della via del segnale mediata da ERK²⁸.

L'incremento dei livelli di ODC e di poliamine che si instaura rapidamente nelle cellule cardiache in ischemia simulata potrebbe favorire il processo apoptotico.

Alti livelli di poliamine sono stati riscontrati anche in altri tessuti a seguito di trattamento ischemico. E' stato infatti riportato che nel polmone la concentrazione di tali poliamine aumenta dopo ipossia¹²² e che l'inibizione farmacologica di questo aumento attenua il rimodellamento vascolare successivo ad ipossia¹²³. Una induzione dell'ODC mediata dall'ischemia è stata osservata nel cervello di ratto¹²⁴⁻¹²⁵, mentre lo stesso trattamento causa, in cellule endoteliali di arteria polmonare, una riduzione dell'attività. Sembra quindi che l'aumento dell'ODC a seguito di trattamento ischemico dipenda anche dal modello sperimentale utilizzato.

Un evento precoce che si verifica nell'attivazione dell'apoptosi e che precede la cascata caspasi è il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri. Recenti risultati sperimentali indicano

che il rilascio del citocromo *c* è legato ad un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale a seguito di stimoli di stress, quali il danno ossidativo, l'aumento di radicali liberi e un incremento della concentrazione di calcio. La modifica della permeabilità della membrana mitocondriale porta alla rottura della membrana esterna con fuoriuscita del contenuto mitocondriale tra cui il citocromo *c*¹²⁶. Alcune proteine rivestono un ruolo modulatore nei confronti dell'apoptosi attivata per questa via. Non è ancora chiaro il preciso meccanismo d'azione, ma pare influenzino la permeabilità della membrana. Tra le proteine che appartengono a questa categoria, ovvero i membri della famiglia di Bcl-2, è stata indagata la variazione d'espressione di Bcl-xl, un modulatore di questo processo che risulta avere un ruolo antiapoptotico. Dai risultati è emerso che l'ischemia simulata induce una *down-regulation* di questa proteina. Questo evento è prevenuto dal pretrattamento delle cellule con DFMO. I dati riportati in questa tesi indicano anche che l'ischemia simulata provoca, in cellule H9c2, il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, effetto che viene parzialmente prevenuto quando le colture cellulari sono pretrattate con DFMO.

Il citocromo *c*, una volta liberato nel citosol prende parte all'assemblaggio dell'apoptosoma, un complesso nel quale la pro-caspasi iniziatrice 9 viene attivata, scatenando poi la cascata caspasi. È stata valutata quindi la presenza della forma inattiva di questa caspasi, ed è emerso che l'ischemia simulata riduce la quantità della proteina nella forma inattiva, il che coincide con un aumento del suo stato attivato. La deplezione di poliamine contrasta questo evento.

In conclusione, i risultati della prima parte di questo studio indicano che in cellule H9c2 l'ischemia simulata, cioè la deprivazione del siero e dell'ossigeno, scatena il processo di morte cellulare programmata attraverso il rilascio del citocromo *c* e l'attivazione delle caspasi. Per l'esecuzione di questo programma è necessario che siano mantenuti i livelli intracellulari di poliamine. Una deplezione del loro *pool* endogeno blocca infatti la capacità del danno ischemico di indurre la morte cellulare.

Diverse linee di ricerca sottolineano un ruolo importante dei meccanismi neuro-ormonali nella progressione dell'insufficienza cardiaca. In particolare è stata evidenziata nei pazienti con questa patologia una iperattivazione di alcuni sistemi tra cui l'adrenergico ed il sistema renina-angiotensina-aldosterone¹¹⁶⁻¹¹⁷. Gli effetti proapoptotici della norepinefrina sulle cellule cardiache sono stati evidenziati in molti studi¹²⁷⁻¹²⁸⁻¹²⁹⁻¹³⁰. È stata anche riportata una possibile correlazione tra livelli di norepinefrina, produzione della citochina pro-infiammatoria TNF, aumento di ROS ed apoptosi¹³¹. In ogni caso i meccanismi attraverso i quali questo mediatore agisce non sono ancora chiari. L'aldosterone è in grado di promuovere la deposizione di collagene, fibrosi miocardica, apoptosi, rimodellamento ventricolare e disfunzione endoteliale. Gioca per tanto un ruolo importante nella progressione dell'insufficienza cardiaca¹³². Inoltre da recenti evidenze è emerso che parte dei suoi effetti non sono riconducibili all'attivazione dei classici recettori nucleari mineralcorticoidi, ma piuttosto a meccanismi non genomici che consentono risposte più rapide¹³³.

La ricerca pertanto è stata indirizzata alla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso i quali questi mediatori neuro-ormonali possano danneggiare il tessuto cardiaco, nell'ottica dell'individuazione di nuovi *target* molecolari sui quali dirigere strategie terapeutiche e preventive. Inoltre poiché le poliamine possono mediare il processo di morte cellulare programmata, è stato ricercato un possibile loro coinvolgimento.

Colture cellulari primarie di cardiomiociti neonatali di ratto, sono state trattate con norepinefrina e con aldosterone per tempi diversi. Per prima cosa è stato verificato l'effetto di questi due mediatori sul metabolismo delle poliamine, osservando variazioni di attività del loro enzima chiave (ODC). In tal modo è stato evidenziato che entrambi questi mediatori causano un aumento (seppur in misura diversa) dell'attività enzimatica, in particolare dopo tre ore di trattamento.

Studi precedenti presenti in letteratura hanno evidenziato che questi ormoni causano sui cardiomiociti un aumento di *marker* apoptotici. Per verificare se l'attuazione del programma apoptotico da parte della norepinefrina e dell'aldosterone sia legato all'azione sul metabolismo delle poliamine, è stata indotta una deprivazione di tali poliamine a livello cellulare pretrattando le colture con DFMO. Ciò ha evidenziato una riduzione dell'attività caspasi nelle cellule private di poliamine. La protezione da parte del DFMO risulta prevenuta se contemporaneamente le cellule erano trattate anche con putrescina.

Inoltre è stato valutato l'effetto della stimolazione neuro-ormonale sull'espressione della survivina, una proteina a significato antiapoptotico. È emerso che sia la norepinefrina che l'aldosterone causano una riduzione della sua espressione e che tale evento risulta almeno in parte prevenuto dal pretrattamento delle cellule con DFMO. La survivina è una proteina citoplasmatica in grado di esercitare un effetto non ancora chiaramente determinato sui mitocondri. Nel tessuto cardiaco sembra essere in grado di modulare l'apoptosi dei cardiomiociti. In particolare uno studio recente ha indagato l'espressione della survivina nell'invecchiamento e nell'insufficienza cardiaca, utilizzando come modello sperimentale i ratti spontaneamente ipertesi, ed è stato dimostrato che una diminuzione di espressione della survivina a livello del tessuto cardiaco è correlata con un aumento dell'apoptosi ed alla progressione dell'insufficienza cardiaca⁶⁴.

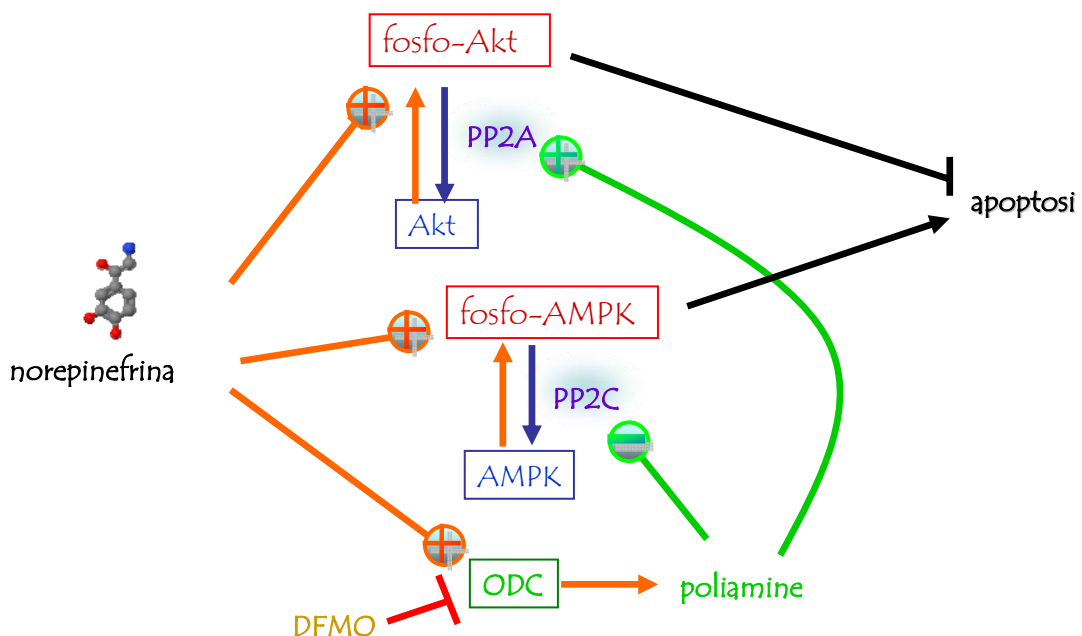
Sono stati condotti ulteriori studi per comprendere i meccanismi molecolari a livello dei quali le poliamine possano esercitare i loro effetti sulla morte cellulare. Poiché il trattamento con norepinefrina può attivare diverse vie di trasduzione del segnale coinvolte nei processi di apoptosi e di crescita cellulare, come le vie dell'Akt e dell'AMPK, si è pensato di studiare un possibile coinvolgimento delle poliamine nella modulazione di queste vie di segnalazione. L'Akt è una serina/treonina-chinasi a valle della fosfoinositide-3-chinasi. Nei mammiferi regola la crescita cellulare, la sintesi proteica, la sopravvivenza cellulare ed il metabolismo del glucosio. A livello cardiaco numerosi studi presenti in letteratura hanno attribuito un ruolo antiapoptotico a questa proteina¹³⁴⁻¹³⁵. Nel nostro modello sperimentale l'effetto pro-

apoptotico di AMPK è stato dimostrato utilizzando un attivatore specifico quale l'AICAR. Tale effetto risulta potenziato dall'inibizione farmacologica della via dell'Akt.

I nostri risultati mostrano che nei cardiomiociti pretrattati con DFMO l'attivazione mediata dalla NE delle vie dell'Akt e dell'AMPK non è bloccata né potenziata. Tuttavia è emerso anche che la mancanza di poliamine, pur non modificando direttamente l'attivazione massimale di questi segnali, può influenzarne la cinetica. In particolare è stato evidenziato che nel caso dell'Akt il pretrattamento con DFMO aumenta la durata dello stato di fosforilazione della proteina, mentre nel caso dell'AMPK la diminuisce. Per capire i meccanismi attraverso cui avviene ciò si è pensato di valutare eventuali effetti sulle fosfatasi deputate all'interruzione dei segnali presi in considerazione, che cioè defosforilano l'Akt e l'AMPK riportandole allo stato inattivo.

Per quanto riguarda la Akt è stata presa in considerazione la serina/treonina-fosfatasi PP2A. In letteratura è stato riportato che in un modello cellulare costituito da cellule epiteliali intestinali, le poliamine possono influenzare l'attività di questa fosfatasi¹³⁶. Anche dai nostri risultati è emerso che il pretrattamento dei cardiomiociti neonatali e delle H9c2 con DFMO diminuisce l'espressione della PP2A.

Altri risultati suggeriscono inoltre che anche l'espressione della PP2C, deputata alla defosforilazione dell'AMPK, è influenzata dal contenuto di poliamine delle cellule. Infatti pretrattando le cellule con DFMO i suoi livelli aumentano.



Schema 1: modulazione da parte delle poliamine delle vie di segnalazione indotte dalla norepinefrina.

In definitiva questi risultati permettono di delineare uno schema delle vie di trasduzione coinvolte nell'apoptosi dei cardiomiociti stimolati con norepinefrina (schema 1).

L'effetto apoptotico della norepinefrina risulta essere mediato dall'attivazione dell'AMPK, la cui durata è mantenuta nel tempo anche grazie alla modulazione negativa della PP2C da parte delle poliamine endogene, il cui aumento è conseguente all'induzione dell'ODC. L'effetto della norepinefrina sull'attivazione di Akt è transitorio e si spegne come conseguenza dell'attivazione della PP2A.

Il pretrattamento delle cellule con DFMO, quindi la deplezione delle poliamine endogene, risulta avere un effetto protettivo in quanto, modulando negativamente i livelli di PP2A, potenzia la via pro-sopravvivenza rappresentata dall'Akt. Contemporaneamente, favorendo l'espressione della PP2C, blocca la via dell'AMPK, la cui stimolazione è associata ad un'aumento dell'apoptosi, come è stato dimostrato anche utilizzando l'AICAR.

In conclusione, i risultati fino ad ora raggiunti indicano che le poliamine svolgono un'azione di modulazione di alcune importanti vie di segnalazione che influenzano la risposta dei cardiomiociti a stimoli apoptotici che intervengono nell'insufficienza cardiaca.

Bibliografia

-
- ¹ Heather M. Wallace, Alison V. Fraser and Alun Hughes. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* (2003) 376, 1–14
- ² Robert A. Casero Jr and Laurence J. Marton. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews*. VOLUME 6 | MAY 2007
- ³ Heather M. Wallace. Polyamines and their role in human disease – an introduction. *Biochemical Society* (2003)
- ⁴ Pegg, A.E. (1986) Recent Advances in the biochemistry of polyamines in eukariotes. *Biochem. J.* 234,249-262
- ⁵ Pegg, A.E. Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 281, 14529-14532 (2006)
- ⁶ Cohen NN (1998) A guide to the polyamines, New York : Oxford
- ⁷ Bolkenius, F.N. and Seiler, N. (1981) Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *int. J. Biochem.* 13,287-292
- ⁸ Kingsnoth, A.N. and Wallas. H.M. (1985) Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancers. *Eur. J. Cancer clin. oncol.* 21.1057-1062
- ⁹ Fallace, H.M. Duthie, J., Evans D.M. Lamond, S. Nicoll, K.M. and Heys, S.D. (2000) Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clin. cancer Res.* 6,3657-3661
- ¹⁰ N. Babbar, T. Murray-Stewart and R.A. Casero, Jr. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly. *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 2
- ¹¹ Larqué E., Sabater-Molina M., Zamora S. (2007) Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* 23 87–95
- ¹² Seiler, M. Delcros, J.G. and Moulinoux, J.P. (1996) Polyamines transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28,843-861
- ¹³ Fallace, H.M. (1981) Uptake and excretion of polyamines from baby hamster kidney cells (BHT-21/C13): the effect of serum of confluent cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 676,25-30
- ¹⁴ Pekka Kilpelainen, Department of Biochemistry, University of Oulu. Ornithine Decarboxylase: Expression and regulation in rat brain and in transgenic mice, 2002, Extensive review of literature through 2001 on polyamine structure, properties, metabolism in mammals, and physiological and pathophysiological roles.
- ¹⁵ Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. A.E. Pegg, D.J. Feith, L.Y.Y. Fong, C.S. Coleman, T.G. O'Brien and L.M. Shantz. *Biochemical Society Transactions* (2003) Volume 31, part 2

-
- ¹⁶ Thomas, T. and Thomas, T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 244–258
- ¹⁷ Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncaglia, R., Boraldi, F., Tiozzo, R., Sharrard, M. and Corti, A. (1999) Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 446, 18–22
- ¹⁸ Kingsnorth, A. N., Wallace, H. M., Bundred, N. J. and Dixon, J. M. (1984) Polyamines in breast cancer. *Br. J. Surg.* 71, 352–356
- ¹⁹ Kingsnorth, A. N., Lumsden, A. B. and Wallace, H. M. (1984) Polyamines in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 71, 791–794
- ²⁰ Fair, W. R., Wehner, N. and Brorsson, U. (1975) Urinary polyamine levels in the diagnosis of carcinoma of the prostate. *J. Urol.* 114, 88–92
- ²¹ Gilmour, S. K., Verma, A. K., Madara, T. and O'Brien, T. G. (1987) Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis. *Cancer Res.* 47, 1221–1225
- ²² Haddox, M. K., Magun, B. E. and Russell, D. H. (1980) Ornithine decarboxylase induction during B1 progression of normal and Rous sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res.* 40, 604–608
- ²³ Sistonen, L., Holtta, E., Lahvaslaiho, H., Lahtola, L. and Alitalo, K. (1989) Activation of the neu tyrosine kinase induces fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase. *J. Cell Biol.* 109, 1911–1919
- ²⁴ Metcalf, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P. and Vever, J. P. (1978) Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 2551–2553
- ²⁵ Schipper R. G., Penning L. C. Verhofstad A. A. J. (2000) *Semin Cancer Biol* 10, 55-68
- ²⁶ Nitta T, Igrashi K, Yamamoto N (2002) *Exp Cell Res* 276, 120-128
- ²⁷ Penning et al. (1998) *Cytokine* 10: 423-431
- ²⁸ Stefanelli C, Pignatti C, Tantini B, Fattori M, Stanic I, Mackintosh CA, Flamigni F, Guarnieri C, Caldarera CM, Pegg AE (2001) *Biochem J* 355: 199-206
- ²⁹ Kitsis RN, Mann DL (2005) Apoptosis and the heart: a decade of progress. *J Mol Cell Cardiol* 38: 1–2
- ³⁰ Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9: 1195–1201
- ³¹ Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasher A (2003) Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J* 166: 140–158

-
- ³² F. Flamigni, I. Stanic', A. Facchini, S. Cetrullo, B. Tantini, R. M. Borzi`, C. Guarnieri, and C. M. Caldarera. Polyamine biosynthesis as a target to inhibit apoptosis of non-tumoral cells. *Amino Acids* (2007) 33: 197–202
- ³³ Thornberry N.A. et al., (1998) *Science*, 281, 1312
- ³⁴ Adams J. M. Et al., (1998) *Science*, 281, 1322
- ³⁵ Majno G, Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15
- ³⁶ Golstein P., Ojcius D.M., Young J. D-E. (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121, 29-65
- ³⁷ L.Czerski, G.Nunez; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2004), 643-652
- ³⁸ Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–65
- ³⁹ Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634–5
- ⁴⁰ Tsukumo SI, Yonehara S. Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively. *Gene Cell* 1999;4: 541–9
- ⁴¹ Sculze-Osthoff K. Et al. (1998) *Eur. J. Biochem.* 254, 439
- ⁴² Cortese JD, Voglino AL, Hackenbrock CR. Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c. *Biochemistry* 1998; 37:6402–9
- ⁴³ Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1259–63
- ⁴⁴ Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:63–7
- ⁴⁵ Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann NY Acad Sci* 1999;887:18–30
- ⁴⁶ Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727–30
- ⁴⁷ Nomura M, Shimizu S, Ito T, Narita M, Matsuda H, Tsujimoto Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 1999;59: 5542–8
- ⁴⁸ Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000;103:645–54
- ⁴⁹ Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276:33869–74

-
- ⁵⁰ Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ : a control point for apoptosis. *Science* 2003;300:135–9
- ⁵¹ Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003;162:59–69
- ⁵² Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996;381:335–41
- ⁵³ Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405–13
- ⁵⁴ Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998;273:33489–94
- ⁵⁵ Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* 1999;18:3586–95
- ⁵⁶ Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000;275:6067–70
- ⁵⁷ Purring-Koch C, McLendon G. Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 11928–31
- ⁵⁸ Twiddy D, Brown DG, Adrain C, Jukes R, Martin SJ, Cohen GM, et al. Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem* 2004;279:19665–82
- ⁵⁹ Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002;84:203–14
- ⁶⁰ Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000;275:31199–203
- ⁶¹ Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Gene Dev* 1999;13:3179–84
- ⁶² Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9: 423–32
- ⁶³ Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401–10
- ⁶⁴ Abbate A, Scarpa S, Santini D, Palleiro J, Vasaturo F, Miller J, Morales C, Vetrovec G W, Baldi A. Myocardial expression of survivin, an apoptosis inhibitor, in aging and heart failure.

An experimental study in the spontaneously hypertensive rat. *International Journal of Cardiology* 111 (2006) 371 – 376

⁶⁵ Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997;48:267-81

⁶⁶ Olivetti G, Quaini F, Sala R et al (1996) Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28:2005–2016

⁶⁷ Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (1997) Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95:320–323

⁶⁸ Narula J, Haider N, Virmani R et al (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335:1182–1189

⁶⁹ Aharinejad S, Andrukhova O, Lucas T et al (2008) Programmed cell death in idiopathic dilated cardiomyopathy is mediated by suppression of the apoptosis inhibitor Apollon. *Ann Thorac Surg* 86:109–114.

⁷⁰ Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA et al (1996) Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 226:316–327

⁷¹ Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94:1621–1628

⁷² Gao HK, Yin Z, Zhou N, Feng XY, Gao F, Wang HC (2008) Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia–reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:286–292

⁷³ James O'D Mc Gee; *Patologia* 1, i principi

⁷⁴ Guido Majno; *Cellule, tessuti e malattie*

⁷⁵ Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci.* 2004 Nov;29(11):609-17. Review.

⁷⁶ Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation.* 2000 Nov 14;102(20 Suppl 4):IV14-23

⁷⁷ Lips, D.J. et al. (2003) Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur. Heart J.* 24, 883–896

⁷⁸ Matsubara, L.S. et al. (2000) Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H1534–H1539

⁷⁹ Anversa P, Leri A, Beltrami CA, Guerra S, Kajstura J. Myocyte death and growth in the failing heart. *Lab Invest* 1998; 78: 767-86.

⁸⁰ Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 560-9.

-
- ⁸¹ Lotrionte M, Galiuto L, Biondi-Zoccai G G L, Abbate A. Ruolo fisiopatologico dell'ipertrofia miocardica, della disfunzione micro circolatoria e dell'apoptosi miocardiocitaria nella stenosi valvolare aortica. *G Ital Cardiol* Vol 7 Luglio 2006
- ⁸² G Jackson, C R Gibbs, M K Davies, G Y H Lip. ABC of heart failure Pathophysiology. *BMJ* VOLUME 320 15 JANUARY 2000
- ⁸³ Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, Limana F, Nadal-Ginard B, Leri A, Anversa P. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1414-24
- ⁸⁴ Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, Jadoon AK. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997 Dec;81(6):1094-107
- ⁸⁵ Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1042-52
- ⁸⁶ Singh K, Xiaio L, Remondino A, Sawyer B D, Colucci W S. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Journal of cellular physiology* (2001) 189:257-265
- ⁸⁷ De Angelis N, Fiordaliso F, Latini R, Calvillo L, Funicello M, Gobbi M, Mennini T, Masson S. Appraisal of the role of angiotensin II and aldosterone in ventricular myocyte apoptosis in adult normotensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1655–1665.
- ⁸⁸ Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL: Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemiareperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002;105:1497-1502.
- ⁸⁹ Sugden PH, Clerk A: Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res* 2001;88:975-977.
- ⁹⁰ Pekarsky, Y. et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3028–3033 (2000).
- ⁹¹ Shiraishi, I. et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* 94, 884–891 (2004).
- ⁹² Arad M., Seidman C.E., Seidman J.C. (2007) *Circ. Res.* 100: 474-488
- ⁹³ Stefanelli C., Stanic I., Bonavita F., Flamigni F., Pignatti C., Guarnieri C., Caldarera C.M. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 243(3):821-6
- ⁹⁴ Flamigni, F., Rossoni, C., Stefanelli, C., and Caldarera, C.M. 1986, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18, 3.

-
- ⁹⁵ Caldarera, C.M., Casti, A., Rossoni, C., and Visioli, O. 1971, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 3, 121.
- ⁹⁶ Feldman, J.M., and Russel, D.H. 1972, *Am. J. Physiol.*, 222, 1199.
- ⁹⁷ Caldarera, C.M., Orlandini, G., Casti, A., and Moruzzi, G. 1974, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6, 95.
- ⁹⁸ Russell, D.H., Shiverick, K.T., Hamrell, B.B., and Alpert, N.R. 1971, *Am. J. Physiol.*, 221, 1287.
- ⁹⁹ Warnica, J.W., Antony, P., Gibson, K., and Harris, P. 1975, *Cardiovasc. Res.*, 9, 793.
- ¹⁰⁰ Moruzzi, G., Caldarera, C.M., and Casti A. 1974, *Mol. Cell. Biochem.*, 3, 153.
- ¹⁰¹ Gibson, K., and Harris, P. 1974, *Cardiovasc. Res.*, 8, 668.
- ¹⁰² Shantz, L.M., Feith, D.J., and Pegg, A.E. 2001, *Biochem. J.*, 358, 25.
- ¹⁰³ Giordano, E., Shantz, L.M., Hillary, R.A., Guarnieri, C., Caldarera, C.M. and Pegg, A.E. 2003, *Signal Transduction and Cardiac Hypertrophy*, N.S. Dhalla, L.V. Hryshko, E. Kardami and P.K. Singal (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, 49.
- ¹⁰⁴ Barouch, L.A., Cappola, T.P., Harrison, R.W., Crone, J.K., Rodriguez, E.R., Burnett, A.L., and Hare, J.M. 2003, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 35, 637.
- ¹⁰⁵ Zhao, Y.J., Xu, C.Q., Zhang, W.H., Zhang, L., Bian, S.L., Huang, Q., Sun, H.L., Li, Q.F., Zhang, Y., Tian, Y., Wang, R., Yang, B.F., and Li, W.M. 2007, *Eur. J. Pharmacol.*, 562, 236
- ¹⁰⁶ Pignatti, C., Tantini, B., Stefanelli, C., Giordano, E., Bonavita, F., Clo', C., and Caldarera, C.M. 1999, *Amino Acids*, 16, 181.
- ¹⁰⁷ Tantini, B., Pignatti, C., Fattori, M., Flamigni, F., Stefanelli, C., Giordano, E., Menegazzi, M., Clô, C, and Caldarera, C.M. 2002, *FEBS Lett.*, 512, 75.
- ¹⁰⁸ Tantini, B., Flamigni, F., Pignatti C., Stefanelli, C., Fattori, M., Facchini, A., Giordano, E., Clô, C., and Caldarera, C.M. 2001, *Cardiovasc. Res.*, 49, 408.
- ¹⁰⁹ Han, L., Xu, C., Jiang, C., Li, H., Zhang, W., Zhao, Y., Zhang, Y., Zhao, W., and Yang, B. 2007, *Cell. Biol. Intern.*, 31, 1345.
- ¹¹⁰ Ryu, J.H., Cho, Y.S., Chun, Y.S., and Park, J.W. 2008, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 438.
- ¹¹¹ Muscari, C., Bonafé, F., Stanic, I., Flamigni, F., Stefanelli, C., Farruggia, G., Guarnieri, C., and Caldarera, C.M. 2005, *Stem Cells*, 23, 983.
- ¹¹² Muscari, C., Bonafé, F., Carboni, M., Govoni, M., Stanic, I., Gamberini, C., Ricci, F., Tazzari, PL., Caldarera, C.M., and Guarnieri, C. 2008, *J. Cell. Biochem.*, 103, 1046.
- ¹¹³ Yusuf S., Reddy S., Ounpuu S. and Anand S. *Circulation* 2002 : 104, 2746-2753
- ¹¹⁴ Van Empel V.P., Holfstral BAT, Crijns H.J., Doevandans P.A., De Windt L.J. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 2005;67:21-9

-
- ¹¹⁵ Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Henriksen K., Parvinen M., Voipio-Pulkki L.M. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-3
- ¹¹⁶ Haskings GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Korner PI. 1986. Norepinephrine spillover to plasma in patients with chronic congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 73:615-621.
- ¹¹⁷ Delcayre, C. Silvestre, J.S. (1999). Aldosterone and the heart: towards a physiological function? *Cardiovasc. Res.*, 43, 7–12.
- ¹¹⁸ Bradford H et al. (1998) *Anal biochem* 72, 248
- ¹¹⁹ Earnshaw W C et al. (1999) *Annu Rev Biochem* 68, 383-424
- ¹²⁰ Stefanelli C., Carati D., Rossoni C. (1996) *J Chromatogr* 375: 49
- ¹²¹ Bonavita F, Stefanelli C, Giordano E, Columbaro M, Facchini A, Bonafè F, Caldarera CM, Guarnieri C. H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA. *FEBS Lett.* 2003 Feb 11;536(1-3):85-91.
- ¹²² Olson J W et al. (1986) *Biochem Pharmacol* 35: 714-716
- ¹²³ Atkinson J E et al. (1987) *J Appl Physiol* 62: 1562-1568
- ¹²⁴ Longo L D et al. (1995) *Reprod Fertil Dev* 7: 385-389
- ¹²⁵ Longo L D et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 692-696
- ¹²⁶ Petit, P. X., Gubern, M., Diolez, P., Susin, S. A., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* 426, 111–116
- ¹²⁷ Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. *J Card Failure* 2000;6:1– 7.
- ¹²⁸ Singh K, Communal C, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45: 713– 9.
- ¹²⁹ Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998;98:1329– 34.
- ¹³⁰ Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MA. Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation* 2000;102:344–50.
- ¹³¹ Fu YC, Chi CS, Yin SC, Hwang B, Chiu YT, Hsu SL. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF alpha-caspase signaling pathway. *Cardiovasc Res.* 2004 Jun 1;62(3):558-67.
- ¹³² Verma A, Solomon SD. Optimizing care of heart failure after acute MI with an aldosterone receptor antagonist. *Curr Heart Fail Rep.* 2007 Dec;4(4):183-9. Review.

¹³³ Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T, Matsubara H. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res.* 2008 Feb;31(2):363-75.

¹³⁴ Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E et al. (2000) Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1385–1394.

¹³⁵ Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. (2003) Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle.* 2:220-223.

¹³⁶ Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR. Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005 Sep 2;280(35):31091-100. Epub 2005 Jul 1.