

INDICE

| | |
|--|-----------|
| SOMMARIO | 1 |
| ABSTRACT | 4 |
| ABBREVIAZIONI..... | 7 |
| INTRODUZIONE..... | 9 |
| 1. Risposte cellulari allo stress, proteine dello stress e loro ruolo biologico | 9 |
| 2. Risposta cellulare allo stress delle cellule muscolari striate..... | 12 |
| 2.1 Condizioni che generano risposta allo stress | 12 |
| 2.2 Evidenze che mostrano i benefici di una risposta allo stress..... | 16 |
| 3. Stato delle conoscenze sulle proteine dello stress | 20 |
| 3.1 Hsp70 | 20 |
| 3.2 Eme-ossigenasi | 22 |
| 3.3 Grp94 | 25 |
| 3.4 Grp75 | 28 |
| 3.5 Grp78/BiP | 29 |
| 3.6 Calreticulina..... | 30 |
| 4. Problematiche aperte..... | 30 |
| 4.1 Studio della risposta allo stress in modelli sperimentali che replicano condizioni umane protettive o patologiche..... | 30 |
| 4.2 Strategie di induzione di una risposta cellulare allo stress | 33 |
| 4.3 Studio dei meccanismi responsabili della protezione esercitata dalle proteine dello stress, in particolare il contributo al controllo dell'omeostasi del calcio.. | 36 |
| OBIETTIVO..... | 37 |
| RISULTATI IN VIVO..... | 39 |
| 1. Modulazione dell'espressione delle proteine dello stress nelle cellule muscolari striate..... | 39 |
| 1.1 Effetti dell'allenamento di entità moderata. | 39 |
| 1.1.1 Risposta nel miocardio | 39 |
| 1.1.2 Risposta nel muscolo scheletrico | 41 |
| 1.2 Effetti della riduzione del carico sul muscolo scheletrico | 50 |
| 1.2.1 Riduzione del carico e atrofia muscolare | 50 |
| 1.2.2 Effetti sull'espressione delle proteine dello stress..... | 52 |
| 1.2.3 Effetti sull'ossidazione delle proteine muscolari | 59 |
| DISCUSSIONE..... | 61 |

| | |
|---|------------|
| RISULTATI IN VITRO..... | 71 |
| 1. Modelli per la sovraespressione di Grp94 | 71 |
| 1.1 Effetti di una singola esposizione a Curcumina..... | 71 |
| 1.2 Sovraespressione stabile e transiente di Grp94..... | 73 |
| 2. Ruolo biologico del chaperone/proteina dello stress Grp94 | 75 |
| 2.1 Sovraespressione di Grp94 e protezione anti-apoptotica..... | 76 |
| 2.2 Sovraespressione di Grp94 e protezione anti-ossidante..... | 82 |
| 2.2.1 Effetti dell'esposizione a perossido di idrogeno sull'ossidazione delle proteine di cellule C2C12 di controllo e sovraesprimenti Grp94 | 82 |
| 2.2.2 Effetti di una singola esposizione a curcumina sulla protezione anti- ossidante..... | 84 |
| 2.3 Effetto della sovraespressione di Grp94 sull'omeostasi intracellulare del calcio | 86 |
| 2.3.1 Determinazione del contenuto di calcio intracellulare in cloni C2C12 sovraesprimenti stabilmente Grp94. | 86 |
| 2.3.2 Variazioni della [Ca ²⁺] intraluminare (RE) in seguito alla sovraespressione stabile e transiente di Grp94 in cellule C2C12 e dopo sovraespressione transiente di Grp94 in linee cellulari non miogeniche mediante l'uso di AEQ RE. | 89 |
| 2.3.3 Effetto sull'omeostasi intracellulare di Ca ²⁺ della sovraespressione transiente di forme delete di Grp94 in cellule C2C12. | 99 |
| 2.4 Interazioni tra Grp94 e altre proteine legate al controllo dell'omeostasi del calcio. | 103 |
| 2.4.1 Immunoprecipitazioni in presenza e assenza di cross-linking chimico in cellule C2C12 e in altre linee cellulari..... | 103 |
| 2.4.2 Immunoprecipitazione di Grp94 nel cuore. | 106 |
| DISCUSSIONE | 110 |
| MATERIALI E METODI | 118 |
| 1 Animali e procedura sperimentale..... | 118 |
| 1.1 Primo modello sperimentale: Allenamento..... | 118 |
| 1.2 Secondo modello sperimentale: induzione dell'atrofia muscolare. | 118 |
| 1.3 Campioni di cuore umano | 119 |
| 2 Mantenimento in coltura delle cellule e trasfezione. | 119 |
| 2.1 Costrutti..... | 121 |
| 2.1.1 Purificazione del DNA..... | 121 |
| 2.2 Trasfezione transiente delle cellule C2C12 e HeLa..... | 122 |
| 2.3 Trasfezione transiente delle cellule HEK293..... | 122 |
| 3 Immunoistochimica | 123 |
| 4. Analisi elettroforetica e Western blotting | 125 |
| 4.1 Estrazione di proteine..... | 128 |
| 4.2 Immunoprecipitazione..... | 128 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 Determinazione della ossidazione proteica mediante Oxiblot..... | 130 |
| 4.4 Analisi densitometrica e statistica | 131 |
| 5 Apoptosi | 131 |
| 5.1 Saggio Tunel | 131 |
| 5.2 Saggio per la Caspasi 3 | 132 |
| 6 Misura della $[Ca^{2+}]_i$..... | 133 |
| 6.1 Uso della fotoproteina Equorina | 133 |
| 6.2 Strumentazione e misura della bioluminescenza dell'equorina..... | 134 |
| 6.3 Microscopio a fluorescenza | 134 |
| 6.3.1 Caricamento con Fura-2/AM..... | 135 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 136 |

SOMMARIO

Lo scopo di questa tesi è stato lo studio del grado della risposta allo stress nelle cellule muscolari mediante l'utilizzo di procedure sperimentali *in vivo* ed *in vitro*.

I modelli animali che replicano condizioni citoprotettive (allenamento di entità moderata) o patologiche (atrofia muscolare da disuso) sono state usate per analizzare la risposta allo stress e la distribuzione cellulare delle proteine dello stress nei tessuti muscolari. In questo studio è stato dimostrato che l'allenamento di entità moderata (fino a 30m/min di corsa su tappeto motorizzato per 1 ora/giorno) aumentava in modo significativo l'espressione di Hsp70 nel muscolo cardiaco e scheletrico. Studi sulla distribuzione cellulare di questa proteina mostrano che la percentuale di miofibre positive per Hsp70 aumentava di circa 3 volte nei muscoli rapidi allenati degli arti posteriori di ratto, rispetto a quelli sedentari ($p < 0,001$), e coinvolgeva sia una più ampia sotto-popolazione di fibre rapide di tipo 2A e intermedie 2A/2X ($p < 0,01$), che cellule muscolari lisce dei vasi. Pertanto l'induzione cronica dell'espressione di Hsp70 nei muscoli scheletrici di ratto non è necessariamente relazionata al fenotipo delle fibre lente, ma evidenzia la presenza di una risposta cellulare allo stress (Tarricone et al. 2008). Inoltre, l'allenamento induceva nel miocardio un significativo aumento dei livelli proteici di HO-1, che contribuisce a ridurre l'area infartuata in seguito ad un evento di ischemia/riperfusione (Marini et al. 2007).

L'atrofia muscolare da disuso è caratterizzata da un aumento della produzione di ROS. Il modello sperimentale dell'atrofia da disuso è stato studiato nel soleo di ratto mediante riduzione del carico muscolare agli arti posteriori attraverso la sospensione (tramite la coda) dai 4 ai 21 giorni. I nostri risultati mostravano una sovraregolazione significativa e transiente di HO-1 a 7 giorni di sospensione, mentre le quantità proteiche delle proteine regolate da glucosio Grp94 e Grp78 diminuivano in modo significativo dopo 14 giorni di sospensione di circa il 50 e 75%, rispettivamente, rispetto ai livelli proteici dei relativi controlli sedentari per sesso ed età. Inoltre l'ossidazione proteica aumentava significativamente nei muscoli atrofici sottoposti a riduzione del carico. E' quindi possibile che i ridotti livelli delle proteine chaperoni di RE che legano calcio, quali Grp94 e Grp78,

possano influenzare l'omeostasi del calcio e potenzialmente aumentare lo stress ossidativo nelle miofibre, favorendo la progressione dell'atrofia muscolare.

Studi *in vitro* sono stati in seguito attuati allo scopo di analizzare, in modo più preciso, il contributo dei livelli proteici di Grp94 sulla citoprotezione delle cellule muscolari contro l'apoptosi e il danno ossidativo, e sui meccanismi cellulari di controllo dell'omeostasi del calcio. La sovraespressione di Grp94 è stata ottenuta attraverso sia trasferimento stabile che transiente del cDNA di Grp94 nella linea cellulare miogenica C2C12. Sono stati inoltre studiati gli effetti di trattamenti farmacologici che aumentano in modo significativo i livelli di Grp94.

I risultati mostrano che la sovraespressione di Grp94, attraverso trasferimento genico, proteggeva le cellule C2C12 contro l'apoptosi indotta da esposizione a staurosporina 1 μ M. L'attivazione della Caspasi-3 risultava ridotta del 40-80% se paragonata ai cloni di controllo ($p < 0,05$). Altri esperimenti mostravano che la percentuale di morte apoptotica, rilevata attraverso saggio TUNEL, in cellule C2C12 trasfettate transientemente con il cDNA di Grp94, era ridotta del 50%, confrontata alle cellule trasfettate con il vettore vuoto.

Inoltre la sovraespressione di Grp94 riduceva il grado di ossidazione proteica indotta da esposizione a perossido di idrogeno. Un effetto paragonabile è stato ottenuto quando le cellule sono state esposte transientemente, 24 ore prima, a curcumina, un anti-ossidante e inibitore della pompa SERCA. Attraverso quest'ultima proprietà, curcumina è efficace nell'indurre una lieve risposta allo stress di RE, che apparentemente sovraregola Grp94, in modo selettivo, senza alterare i livelli proteici delle altre proteine di RE, quali Grp78, calreticulina e HO-1. La successiva esposizione a perossido di idrogeno di cellule pre-trattate con curcumina mostrava infatti un grado ridotto di ossidazione proteica.

Allo scopo di identificare il meccanismo molecolare attraverso cui Grp94 esercita citoprotezione antiapoptotica e antiossidante, è stata studiata l'effetto della sovraespressione di Grp94 nella modulazione dell'omeostasi del calcio. Attraverso l'uso dell'indicatore fluorescente per il calcio fura-2, i cloni sovraespressanti Grp94 mostravano una riduzione dal 40 all'80% nel rilascio di calcio dal RE in seguito a stimolo con acido ciclopiazonico, rispetto ai cloni di controllo. La co-trasfezione transiente delle C2C12 sia con Grp94 che con il cDNA codificante per la proteina ricombinante Aequorina, sensore luminescente

per il calcio, specificatamente indirizzata al RE, mostrava una lieve (20%), ma significativa diminuzione nella $[Ca^{2+}]_{er}$ ($p < 0,01$), rispetto al controllo (cellule trafettate con il vettore vuoto). Tuttavia quando la co-trasfezione transiente è stata attuata in cellule HeLa o HEK293, nessuna differenza significativa nella $[Ca^{2+}]_{er}$ è stata osservata fra le cellule sovraesprimenti Grp94 e controllo, suggerendo che la sovraespressione di Grp94 non influenza direttamente il contenuto di calcio nel RE. Esperimenti di immunoprecipitazione da cellule C2C12, processate con cross-linking chimico prima della lisi cellulare, mostravano che SERCA2 coimmunoprecipita con Grp94. La co-immunoprecipitazione Grp94-SERCA2 era chiaramente evidente nelle cellule C2C12, mentre era scarsamente rilevabile nelle cellule HeLa ed HEK293, sebbene in queste due ultime linee cellulari le relative quantità proteiche sia di Grp94 che di SERCA2 sia più elevate. La possibilità che la sovraespressione di Grp94 influenzi la $[Ca^{2+}]_{er}$, attraverso l'interazione con SERCA2, è stata inoltre suggerita mediante analisi delle tracce di riassunzione dello ione calcio nel RE: l'attività di SERCA2 mostrava una riduzione significativa (20%) ($p < 0,01$) nelle cellule C2C12 rispetto ai controlli, mentre nessuna differenza è stata trovata nelle cellule HeLa ed HEK293. Si ipotizza pertanto che la sovraespressione di Grp94 eserciti un ruolo citoprotettivo attraverso la riduzione della $[Ca^{2+}]_{er}$ nelle cellule miogeniche attraverso una specifica interazione di tipo inibitoria con SERCA2.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study the stress response of muscle cells using *in vivo* and *in vitro* experimental procedures.

Animal models which replicate cytoprotective (mild exercise training) or pathologic (muscle disuse atrophy) conditions were used to analyze the extent of the stress response and the cellular distribution of stress proteins in muscle tissues. Here we show that mild exercise training (up to 30m/min treadmill run for 1h/day) significantly increased Hsp70 expression in cardiac and skeletal muscles. Studies on the cellular distribution of this protein showed that the percentage of Hsp70-positive myofibers increased about 3-fold in trained fast muscles of the posterior rat hindlimb, compared to the sedentary ones ($P < 0.001$), and involved a larger subset of both type 2A and intermediate type 2A/2X-myofibers ($P < 0.001$), and vascular smooth muscle cells. Therefore, chronic induction of Hsp70 expression in rat skeletal muscles is not obligatory related to the slow fiber phenotype, but reveals the occurrence of a stress-response (Tarricone et al. 2008). In addition, training significantly increased protein levels of HO-1 in the myocardium, which contributed to the reduced infarct size occurring after ischemia-reperfusion (Marini et al. 2007).

Muscle disuse atrophy is characterized by increased ROS production. Experimental muscle disuse atrophy was achieved in the rat soleus muscles by means of hindlimb unloading by tail-suspension for 4 to 21 days. Our results showed significant and transient upregulation of heme oxygenase-1 at 7 days of unloading, whereas the relative amounts of the Glucose-regulated proteins Grp94 and Grp78 decreased significantly after 14 days of unloading to about 50% and 75%, respectively, of the protein levels of the non-suspended age- and sex-matched controls. In addition, protein oxidation was significantly increased in unloaded atrophic muscles. It is therefore possible that the reduced levels of the ER chaperones which bind calcium, such as Grp94 or Grp78, might adversely affect calcium homeostasis and potentially enhance oxidative stress of disused myofibers and favour progression of muscle atrophy.

In vitro studies were then performed in order to analyze more precisely the contribution of Grp94 protein levels to cytoprotection of muscle cells against

apoptosis and oxidative damage, and mechanistically to the control of calcium homeostasis. Grp94 overexpression was achieved by means of both stable and transient transfer of Grp94 cDNA into the myogenic cell line C2C12. The effects of pharmacological treatments, which selectively increased Grp94 cellular levels, were also explored.

Results show that Grp94 overexpression obtained by gene transfer, protected myogenic C2C12 cells against apoptosis induced by exposure to 1 μ M staurosporin. Caspase-3 activation was reduced by 40-80% compared to control clones ($p < 0.05$). Additional experiments showed that the percentage of apoptotic death, revealed by TUNEL assay, in C2C12 cells transiently transfected with grp94 cDNA was reduced by 50%, compared to empty vector-transfected cells.

Furthermore, Grp94 overexpression reduced the degree of protein oxidation induced by exposure to hydrogen peroxide. A comparable effect was obtained when cells were transiently exposed, 24 hour in advance, to curcumin, an antioxidant which is also a SERCA inhibitor. Through its latter property, curcumin was effective in inducing a mild ER response, which apparently upregulated Grp94, in a selective manner, without changing protein levels of other ER chaperones, such as Grp78, calreticulin and HO-1. Subsequent exposure of curcumin-pretreated cells to hydrogen peroxide indeed showed reduced degree of protein oxidation.

In order to identify the molecular mechanism through which Grp94 exerts anti-apoptotic and anti-oxidant cytoprotection, we investigated changes in calcium homeostasis occurring in Grp94 overexpressing cells. By means of the fluorescent Ca^{2+} probe fura-2, Grp94-overexpressing clones showed a reduction ranging from 40 to 80% in cyclopiazonic acid-released Ca^{2+} compared to control clones. Transient co-transfection of C2C12 with both Grp94 and the cDNA coding for the recombinant luminescent Ca^{2+} sensor aequorin specifically targeted to the ER showed a slight (20%), but significant, decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{er}}$ ($p < 0.01$), compared to control, void vector-transfected cells. However, when transient co-transfections were performed in HeLa or HEK-293 cells, no significant difference in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{er}}$ was observed between Grp94 overexpressing and control cells, suggesting that Grp94 overexpression did not directly affect ER Ca^{2+} load. Experiments of immunoprecipitation from wild type C2C12 cells, processed with chemical cross-

linking before lysis, showed that SERCA2 co-immunoprecipitated with Grp94. The Grp94-SERCA2 co-immunoprecipitation was clearly evident in C2C12 cells, whereas it was barely detectable in HeLa and HEK-293 cells, despite the higher relative amount of both Grp94 and SERCA2 in these two latter cell lines. The possibility that Grp94 overexpression affected $[Ca^{2+}]_{er}$ by interaction with SERCA2 was further suggested by the analysis of the ER calcium refilling traces: the SERCA2 activity showed a significant decrease (20%) ($p < 0.01$) in Grp94 overexpressing C2C12 cells compared to controls, while no differences were found in HeLa and HEK293. The possibility that Grp94 overexpression exerts a cytoprotective role by reducing $[Ca^{2+}]_{er}$ load of myogenic cells through a specific inhibitory interaction with SERCA2 is supposed.

ABBREVIAZIONI

| | |
|------------------|---|
| AEQ | proteina Equorina |
| BSA | albumina sierica bovina |
| BW | peso in grammi del ratto |
| C | muscoli di controllo |
| CCL | cross linking chimico |
| CNX | calnessina |
| CO | monossido di carbonio |
| $[Ca^{2+}]_i$ | concentrazione intracellulare di Ca^{2+} |
| $[Ca^{2+}]_{re}$ | concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico |
| COX | enzima ciclossigenasi |
| CPA | acido ciclopiazonico |
| CPK | creatin chinasi |
| CRT | calreticulina |
| Cs | calsequestrina |
| DCM | cardiomiopatia dilatativa |
| DMSO | di-metil-solfossido |
| DNP | disaccoppiante mitocondriale |
| DS | deviazione standard |
| DTT | agenti riducenti |
| EDL | muscolo estensore lungo delle dita |
| EDL | flexor digitorum brevis |
| ERSE | ER stress response element |
| ES | errore standar |
| GRP | Glucose-Regulated Proteins |
| Grp94 | glucose-regulated-protein-94 |
| GSH | glutathione perossidasi |
| HO | eme-ossigenasi |
| HO-1 | emi-ossigenasi-1 |
| H_2O_2 | perossido di idrogeno |
| HSE | heat shock element |
| HSF | heat shock transcription factor |

| | |
|-------|---------------------------------------|
| HSP | Heat Shock Proteins |
| HSP | proteine chaperone |
| HSPs | proteine dello stress |
| IL s | interleuchine |
| LPS | lipopolisaccaridi |
| MW | peso in grammi del muscolo prelevato |
| MCH | miosina –miosin heavy chain |
| MAPK | mitogen activated protein kinase |
| P | proline |
| PDI | proteine disolfuroisomerasi |
| PL | muscolo plantare |
| PLA | muscolo plantare in ratti sedentari |
| PLC | muscolo plantare in ratti allenati |
| PGE | prostaglandine |
| PKC | protein kinase C |
| RE | reticolo endoplasmatico |
| ROS | radicali liberi |
| SOD | superossido dismutasi |
| SOL | muscolo soleo |
| TA | muscolo tibiale anteriore |
| TBHP | ter-butyl-idroperossido |
| t-BHQ | 2,5-di(terbutil)-1,4-benzoidrochinone |
| Tg | tapsigargina |
| UPR | unfolded protein response |
| UPRE | unfolded protein response element |

INTRODUZIONE

1. Risposte cellulari allo stress, proteine dello stress e loro ruolo biologico

In risposta a stimoli che alterano l'omeostasi cellulare in modo subletale (stress cellulare), le cellule inducono rapidamente la sintesi di alcune proteine, note come HSP, "Heat Shock Proteins", proteine dello stress termico, che sono state identificate primariamente come risposta all'esposizione a temperature di 43-45 gradi centigradi per 1 ora (Kelley e Schlesinger 1978).

L'esposizione allo stress è in grado di attivare, simultaneamente o in alternativa, tre tipi di risposta in grado di indurre o di incrementare l'espressione delle proteine dello stress. Il calore, l'esercizio, l'ischemia e la ri-perfusione inducono nel muscolo scheletrico prevalentemente una risposta di tipo citoplasmatico che consiste nell'aumentata espressione di proteine dello shock termico (famiglia delle HSP, Heat Shock Proteins). Lo stress metabolico secondario a deprivazione di glucosio, oppure l'accumulo di proteine nel reticolo endoplasmatico (RE) rugoso, sia conseguente ad inibizione della glicosilazione che ad aumento eccessivo di sintesi proteica, che ad incompleto ripiegamento di proteine mutate, oppure alterazioni nell'omeostasi del calcio o in seguito ad anaerobiosi possono invece evocare la risposta allo stress del RE (Locke and Noble 1995). In questo caso sono sovraesprese le proteine chaperone residenti nel RE, tra i cui membri figurano le proteine regolate da glucosio (famiglia delle GRP, Glucose-Regulated Proteins). Il terzo tipo di risposta è indotto dallo stress ossidativo e consiste nell'aumentata espressione di enzimi coinvolti nella difesa contro agenti ossidanti; questo tipo di risposta viene attivata nel muscolo scheletrico nell'atrofia da disuso (Hunter et al., 2001).

Le HSP sono proteine chaperone, che giocano un ruolo principale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. In condizioni fisiologiche le proteine chaperone aiutano altre proteine a ripiegarsi nella conformazione nativa allo scopo di prevenire l'aggregazione di proteine parzialmente ripiegate e favorire la corretta formazione dei legami intramolecolari (Gorza and Del Monte, 2005). Le HSP partecipano direttamente al corretto ripiegamento dei polipeptidi nascenti nell'assunzione della struttura secondaria/terziaria e sono parte attiva del processo di sintesi, ripiegamento e assemblaggio proteico (Figura 1).

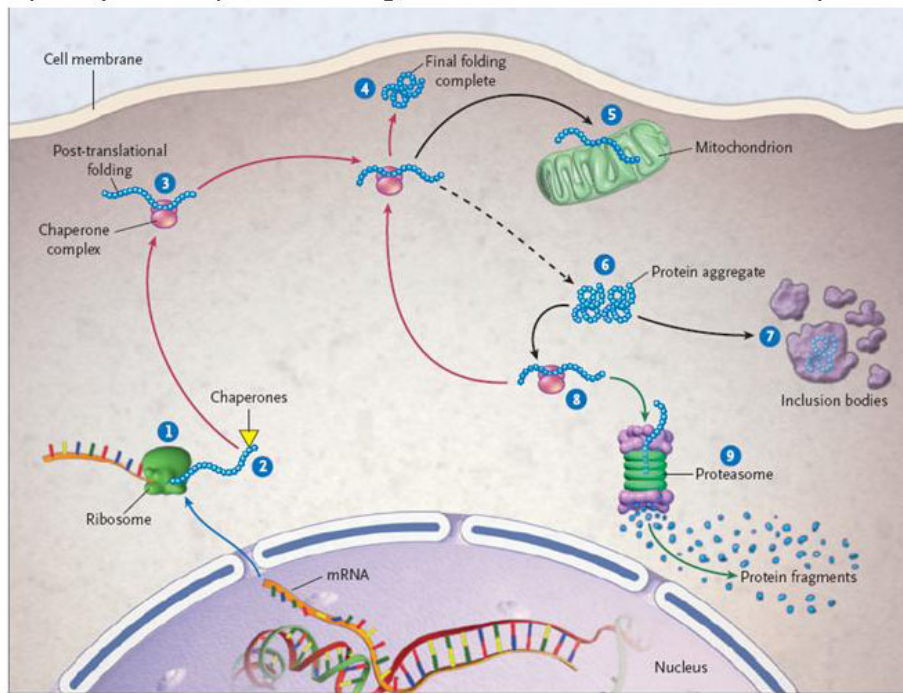


Figura 1. Traduzione dell'RNA messaggero a livello dei ribosomi (1); ripiegamento dei polipeptidi nascenti, assistito dalle proteine chaperone (2), che si protrae dopo la traduzione (3); la nuova proteina assume una corretta conformazione (4) ed è traslocata agli organelli, ad esempio i mitocondri (5); polipeptidi con alterata conformazione si aggregano (6) e precipitano a formare corpi inclusi (7); i polipeptidi non ripiegati o parzialmente ripiegati sono sottratti agli aggregati dalle proteine chaperone, che assistono la riassunzione della corretta struttura secondaria e terziaria (8) o li indirizzano alla degradazione nel proteasoma (9). Freccie rosse, indicano la via del ripiegamento; freccia nera tratteggiata, indica ripiegamento difettoso e aggregazione proteica, freccia verde, via della degradazione (Macario and Conway de Macario 2005).

In condizioni di stress, in cui la probabilità di perdita della conformazione nativa delle proteine aumenta, le HSP possono essere rapidamente sintetizzate. La loro sintesi è regolata dallo “heat shock element” (HSE) una sequenza di DNA specifica nel promotore dei geni HSP. HSE è legato dal fattore di trascrizione dello shock termico (HSF, heat shock transcription factor) (Liu et al., 2001).

La famiglia di proteine HSP, la cui espressione è altamente conservata nelle cellule eucariotiche, è composta da molti membri, alcuni dei quali sono espressi nella cellula in modo costitutivo (Liu et al., 2001). Le HSP si diversificano non solo per l'espressione differenziale dipendente dal tipo di stress, ma anche per la localizzazione subcellulare.

La famiglia genica delle HSP70 è costituita da diversi membri che possono essere espressi costitutivamente (Hsc70) e/o venire indotti in risposta a stress di particolari compartimenti intracellulari, quali il citosol (Hsp70), i mitocondri

(Grp75) e il reticolo endoplasmico (Grp78) e che possono inoltre essere identificati in base al peso molecolare: Hsc70 (73kDa), Hsp70 (72kDa), Grp75 (75kDa) e Grp78 (nome alternativo BiP) (78kDa). Grp75 e Grp78 sono così denominate perché in realtà appartenenti anche alla famiglia delle GRP, in quanto non indotte dallo shock termico.

La famiglia delle HSP90 comprende tre proteine: due sono isoforme citoplasmatiche, Hsp90 α e Hsp90 β , e una terza proteina nota come Grp94 (98 kDa). Le HSP90 sono state identificate nel citosol, nel nucleo e nel RE in molti tipi di cellule (Moseley et al. 1997).

Le small-Hsps sono un gruppo di HSP con peso molecolare tra 8 e 27 kDa che includono l'Ubiquitina, l' $\alpha\beta$ -cristallina, Hsp20, Hsp25 e Hsp27; sono coinvolte nella rimozione (sistema proteosoma-ubiquitina), nel corretto ripiegamento delle proteine denaturate e nella stabilizzazione dei microfilamenti.

Tutti gli stimoli di stress che perturbano le funzioni del RE inducono una risposta cellulare denominata Unfolded Protein Response (UPR) innescata dall'interazione di fattori di trascrizione specifici con due sequenze consenso nel promotore di geni bersaglio, ERSE (ER stress response element) e UPRE (unfolded protein response element). Tre proteine transmembrana del RE iniziano la via di trasduzione di segnale per l'attivazione della trascrizione dei geni GRP: IRE1, ATF6 e PERK. Ruolo principale in questa risposta è quello di Grp78: in condizioni fisiologiche BiP lega queste tre proteine inibendo la loro attivazione. In condizioni di stress le proteine denaturate che si accumulano nel RE legano avidamente Grp78, che riduce il suo legame con IRE1, ATF6 e PERK (Kadowaki, Nishitoh et al. 2004).

La risposta allo stress del RE presenta aspetti di ambiguità, in quanto non sempre determina aumento della sopravvivenza cellulare. Quando lo stimolo stressante è persistente e le funzioni del RE sono severamente compromesse si attivano le vie apoptotiche, che, pur eliminando le cellule danneggiate, permetterebbero quindi la sopravvivenza dell'organismo (Oyadomari and Mori 2004).

La risposta UPR può essere attivata in risposta a stimoli che alterano l'omeostasi cellulare come gli ionofori del calcio, gli agenti riducenti (2-mercaptoetanololo), gli inibitori della glicosilazione proteica (tunicamicina), gli inibitori della pompa di RE (tapsigargina) o l'accumulo di catene pesanti delle immunoglobuline.

2. Risposta cellulare allo stress delle cellule muscolari striate

2.1 Condizioni che generano risposta allo stress

Il muscolo scheletrico è un tessuto la cui funzione principale è quella di sviluppare forza e velocità per eseguire un lavoro fisico. L'energia prodotta dal muscolo scheletrico, per l'accorciamento (contrazione isotonica) o per sostenere uno sforzo fisico (contrazione isometrica), comporta lo sviluppo di energia termica, che induce una variazione nella temperatura del muscolo. L'esercizio muscolare si accompagna inoltre ad aumentata produzione di ROS, aumento della glicolisi e della produzione di lattato a seconda dell'intensità dell'esercizio, e a temporanei e ripetuti episodi di ischemia-riperfusion (Liu, Gampert et al. 2006).

In risposta a stimoli di stress, le cellule muscolari sintetizzano rapidamente un limitato numero di proteine, le "proteine dello stress" o HSPs.

Nel muscolo scheletrico le HSPs presenti sono le Small Hsps, HSP60 (forma mitocondriale), HSP70 e HSP90.

In seguito a stimoli di stress la famiglia maggiormente espressa è quella delle HSP70 che è composta da molti membri, alcuni dei quali sono espressi nella cellula in modo costitutivo: per esempio l'isoforma costitutiva Hsc70, viene lievemente indotta in condizioni di stress (Sorger et al. 1987), mentre l'isoforma inducibile, Hsp70 (Hsp72i), praticamente assente in condizioni fisiologiche, viene sintetizzata rapidamente, raggiungendo valori di espressione superiori al 20% rispetto alle proteine cellulari totali, in condizioni di stress (Tanguay et al. 1993). Hsp70, insieme ad altre proteine chaperone come Hsp90, è coinvolta nell'assemblaggio dei miofilamenti (Srikakulam e Winkelmann, 2004).

L'esercizio fisico induce un aumento dell'espressione delle HSP70 nel plasma, nel fegato, nel cuore e nel muscolo scheletrico (Salo, Donovan et al. 1991).

Esistono dati in letteratura che dimostrano come l'ipertrofia, indotta attraverso esercizio fisico da sforzo muscolare, induca la risposta Hsp70 sia nel muscolo scheletrico (Kilgore, Timson et al. 1994) che cardiaco, quest'ultima in conseguenza anche dell'aumento della pressione cardiocircolatoria (Izumo and Aoki 1998).

L'espressione delle HSPs avviene in relazione alla tipologia e all'intensità del segnale di stress. L'induzione di HSP70 è associata all'intensità e alla tipologia

dell'esercizio fisico. Noble et al. (1999) dimostrarono che a livello cardiaco l'isoforma inducibile di Hsp70 veniva espressa 4 volte in più in quei ratti a cui veniva imposto giornalmente 1 ora di corsa (di resistenza) su tappeto motorizzato (10% di pendenza, percorrendo una distanza totale di circa 8000m a settimana per 8 settimane), rispetto al gruppo di ratti che, pur percorrendo una simile distanza nelle 8 settimane disponibili, distribuivano liberamente questa attività durante il giorno (su ruota). Le HSP non solo hanno la funzione di sensori dello stress muscolare, ma giocano anche un ruolo principale nei processi patologici di questo tessuto. E' noto infatti che il muscolo danneggiato da eccessivo esercizio fisico o da eventi infettivi mostra segni di infiammazione e la risposta Hsp70, che ne consegue, può essere indotta dalla produzione di citochine (IL-6, TNF α) o da attivazione di NF-kB (Kaufmann 1994; Hirose, Nosaka et al. 2004).

L'induzione di Hsp70 è associata anche alla variazione della temperatura corporea: evidenze dimostrano come l'innalzamento della temperatura corporea (60 minuti di ipertermia a 42°C) porti all'aumento di Hsp70 nel muscolo scheletrico di circa 2 volte (Mitchell, Dugas et al. 2002; Oishi, Taniguchi et al. 2002). È stato inoltre dimostrato che la risposta Hsp70, in ratti femmine sottoposti ad ipertermia dell'intero corpo (15 minuti a 42°C), può conferire protezione contro episodi ripetuti di ischemia (30 min)/riperfusione (30 min) nel miocardio. La risposta Hsp70 sembra suggerire una protezione cellulare che coinvolge in modo incrociato diversi tessuti (Demirel et al. 2002; Powers et al. 2008).

C'è tuttavia da sottolineare che l'attività fisica in un ambiente freddo, che previene l'innalzamento della temperatura corporea in seguito all'esercizio fisico, non inibisce l'incremento di Hsp70 (Locke and Celotti 2001).

Anche un episodio ischemico di breve durata induce l'espressione di Hsp70; l'entità della risposta allo stress sembra dipendere dalla durata delle fasi di ischemia/riperfusione: l'aumento dei livelli proteici di Hsp70 è maggiore in seguito all'evento di riperfusione che segue il singolo episodio ischemico (Nishizawa, Nakai et al. 1996).

Un altro tipo di risposta è indotto dallo stress ossidativo e consiste nell'aumentata espressione di proteine dello stress coinvolte nella difesa contro agenti ossidanti, un esempio è Heme-ossigenasi (HO-1), una proteina membro della famiglia delle HSP con ruolo antiossidante, la cui induzione a livello trascrizionale sembra

essere indotta da condizioni di ipossia e danno ossidativo (Yet, Tian et al. 2001; Ryter, Alam et al. 2006; Borger and Essig 1998). L'esercizio fisico può indurre una diminuzione del pH cellulare, un incremento della concentrazione di acido lattico nel sangue e l'aumento di radicali liberi (ROS) che inducono l'espressione di Hsp70 (Khassaf, Child et al. 2001; Poso 2002). Quest'ultima evidenza sembra essere anche supportata dal fatto che la vitamina C, un antiossidante, attenua l'espressione di Hsp70 nel muscolo scheletrico (Khassaf, McArdle et al. 2003).

Incremento dello stress ossidativo si verifica anche in presenza di atrofia da disuso nel muscolo scheletrico (Hunter, Mitchell-Felton et al. 2001; Lawer et al. 2003; Macario and Conway de Macario 2005); l'atrofia è un processo patologico che è conseguenza dell'aumento del processo di degradazione proteica e inibizione della sintesi proteica e probabilmente questo potrebbe spiegare come l'espressione di Hsp70 sembra subire una diminuzione (circa il 38%) nel muscolo scheletrico dopo 21 giorni di sospensione (Oishi, Taniguchi et al. 2003). Il modello sperimentale dell'atrofia muscolare da disuso è noto essere associato ad aumentata produzione di ROS ed ad un'alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare (Hunter et al. 2001; Powers et al. 2007; Muller et al. 2007), eventi che contribuiscono ad indurre una risposta allo stress di RE e la sovraregolazione di geni codificanti per alcune proteine leganti questo ione nel reticolo sarcoplasmatico. Hunter et al. (2001) ha infatti osservato come l'induzione di atrofia (dopo 7 giorni di riduzione del carico muscolare) nel muscolo soleo di ratto non induca alterazioni nei livelli di Grp78, calreticulina e CHOP/GADD-153 (un fattore trascrizionale che induce apoptosi), ma un aumento significativo dell'espressione di calsequestrina, una proteina legante calcio presente in modo specifico nel muscolo, così come di HO-1. La sovraespressione di HO-1 è un dato importante perché potrebbe indicare una risposta protettiva da parte della cellula nei confronti dello stress ossidativo durante l'atrofia da disuso.

La risposta allo stress nel tessuto muscolare sembra differenziarsi tra muscoli rapidi e lenti e tra le stesse popolazioni di fibre muscolari. Ad esempio, l'induzione delle HSP70, conseguente ad ipertermia o ad altri stress, sembra coinvolgere specificamente i muscoli e le fibre lente (Neufer, Ordway et al. 1996; Liu and Steinacker 2001; Oishi, Taniguchi et al. 2003).

Il muscolo scheletrico richiede la presenza di cellule altamente specializzate per caratteristiche strutturali e metaboliche; è un sistema eterogeneo che comprende diversi tipi di fibre muscolari che contengono molteplici proteine contrattili; in particolare la miosina è una tra le proteine più abbondanti ed è espressa in diverse isoforme di catena pesante (myosin heavy chain, MHC).

L'isoforma MHC di tipo I, per esempio, è presente nelle fibre che esprimono l'isoforma di catena pesante della miosina a bassa attività ATPasica; queste fibre si contraggono in maniera lenta in quanto caratterizzate da metabolismo di tipo ossidativo. L'isoforma MHC di tipo II è invece caratterizzate per l'espressione di diverse isoforme di catena pesante della miosina ad elevata attività ATPasica (Gorza 1990). Sono fibre che si contraggono rapidamente (fibre di tipo veloce) in quanto presentano un'elevata attività glicolitica e si possono suddividere in diversi sottogruppi, a seconda della presenza di mitocondri (fibre rapide con metabolismo ossidativo, MHC IIa) o per la loro scarsità (fibre rapide con metabolismo glicolitico, MHC IIb). Infine esiste anche l'isoforma intermedia che si identifica con le fibre MHC di tipo Iix.

L'espressione di Hsp70 inducibile è costitutiva nel muscolo scheletrico di ratto ricco di fibre lente (di tipo I, come il SOL) rispetto ai muscoli costituiti prevalentemente da fibre rapide glicolitiche (di tipo IIb, EDL) (Locke and Noble 1995). Nei muscoli di tipo misto (PL), il contenuto di Hsp70 è grosso modo proporzionale alla percentuale di fibre lente (Locke et al. 1991). La specificità della risposta Hsp70 rispetto alla tipologia di fibre coinvolte è stata osservata anche in seguito a stress da calore: l'induzione di Hsp70 nel SOL è più rapida, elevata e duratura rispetto al muscolo PL (Oishi et al. 2001; Oishi et al. 2003).

Questi risultati suggeriscono una specifica espressione di Hsp70 nelle fibre muscolari di tipo I.

La correlazione tra contenuto in Hsp70 e miosina lenta sembra essere riscontrabile solamente nell'animale sedentario; infatti, dopo esercizio fisico, anche il muscolo privo di miosina lenta può presentare livelli di Hsp70 simili a quelli riscontrati nei muscoli lenti (Kelly, Tiidus et al. 1996). Uno studio effettuato nel muscolo tibiale anteriore di coniglio, un muscolo rapido con prevalenza di fibre glicolitiche, ha analizzato la distribuzione di Hsp70 dopo che il muscolo era stato stimolato con un pattern di impulsi a bassa frequenza, tipico dell'innervazione delle fibre lente

(Neufer, Ordway et al. 1996). L'incremento dei livelli proteici dopo 14 o 21 giorni era di 10 o 12 volte, rispettivamente. Dopo 3 giorni di stimolazione, Hsp70 è dimostrabile all'interno di una ristretta popolazione di fibre, nella parte profonda del muscolo, dove abbondano le fibre rapide ossidative (tipo IIa) e le fibre lente (tipo I). Dopo 21 giorni di stimolazione Hsp70 si estendeva alle fibre rapide di tipo IId(x)/IIb. La maggior parte dei modelli analizzati ha infatti considerato la transizione fenotipica di fibre rapide in fibre lente, come l'esposizione ad aumentato carico di lavoro e conseguente ipertrofia ottenuta nel muscolo PL (prevalentemente costituito da fibre rapide), con la rimozione chirurgica del gastrocnemio. Questo modello determina un aumento del numero di fibre di tipo lento I e IIa e dei livelli di Hsp70, suggerendo quindi che l'espressione di Hsp70 sembra essere dipendente dalla transizione fenotipica da rapida a lenta (Locke et al 1994; O'Neill et al 2006).

Condizioni come la senescenza, la denervazione muscolare l'atrofia muscolare da disuso, quale si ottiene sperimentalmente nell'animale da laboratorio, tramite la sospensione degli arti posteriori (Jaspers and Tischler 1984), sono caratterizzate da una transizione delle fibre dalla tipologia lenta a rapida (Pette et al. 2000). Dopo 2 settimane di sospensione, che portano inizialmente ad atrofia i muscoli costituiti principalmente da fibre lente, come il muscolo SOL, non si evidenziano cambiamenti nell'espressione di Hsp70, suggerendo quindi che la risposta Hsp70 non sembra essere direttamente influenzata dalla transizione delle fibre (Desplanches, Ecochard et al. 2004), ma probabilmente da altri fattori ancora sconosciuti e da investigare.

2.2 Evidenze che mostrano i benefici di una risposta allo stress

L'incremento di espressione delle HSP aumenta la sopravvivenza cellulare in seguito a successive esposizioni a stimoli di stress, anche di maggiore intensità (Snoeckx, Cornelussen et al. 2001). Questo fenomeno, noto come preconditionamento, consiste nella comparsa di una maggior resistenza, anche se transitoria, nei confronti di un insulto più grave. La resistenza viene indotta mediante pre-esposizione a uno o più eventi stressanti di entità e di durata moderata (Bolli 2000; Snoeckx et al. 2001). Sia nel tessuto muscolare cardiaco che scheletrico una prima esposizione ad uno stress moderato come uno stress

termico o l'esposizione a condizioni di ischemia ha effetti benefici contro i danni provocati da una successiva, più intensa, ischemia e riperfusione (Donnelly et al. 1992; Lepore, Knight et al. 2001).

L'esposizione per breve tempo a temperature di 42°C per 30 min di colture cellulari muscolari scheletriche, come la linea miogenica murina C2C12, riduce la mortalità dopo trattamento con lo ionoforo per il calcio A23187 e con il disaccoppiante mitocondriale DNP, che blocca la catena respiratoria. Maglara, Vasilaki et al. (2003) hanno dimostrato che il danno cellulare indotto a livello dei miotubi, indicato da un aumento del rilascio di creatin chinasi (CPK), un marcatore di danno delle cellule muscolari, può essere ridotto di circa il 40% dopo esposizione ad un periodo di ipertermia. Ulteriori esperimenti su colture cellulari più differenziate come i miotubi da cellule murine L6, mostrano che lo stress termico, inducendo una risposta Hsp70, protegge le cellule muscolari dalla degradazione proteica conseguente all'esposizione a glucocorticoidi, (Luo, Sun et al. 2001). Sembra quindi esistere una correlazione tra l'entità della protezione cellulare e l'aumento dell'espressione di Hsp70 e di altre HSP, come Hsp25, Hsp60 e Hsc70. Questi risultati suggeriscono che, queste proteine, anche se in modo differenziato, eserciterebbero un ruolo protettivo sulla sopravvivenza cellulare compromessa da stimoli che riproducono il danno muscolare indotto dall'esercizio fisico (sovraccarico di calcio conseguente alla presenza dello ionoforo) o dall'ischemia-riperfusione (deplezione di ATP conseguente all'esposizione al disaccoppiante DNP).

Il ruolo citoprotettivo di Hsp70 è stato confermato da studi con topi transgenici. L'esposizione del miocardio di topi transgenici sovraespressanti stabilmente Hsp70 ad un'ischemia di 30 minuti, seguita da 2 ore di riperfusione determina la comparsa di un'area infartuale ridotta di circa 3 volte rispetto a topi di controllo, confermando che l'effetto protettivo è attribuibile, almeno in parte, all'aumento di espressione di Hsp70 (Hutter et al. 2006).

Il pretrattamento termico porta ad un significativo aumento dell'Hsp70 insieme all'attenuazione della perdita di massa muscolare in modelli di atrofia muscolare indotta da disuso, suggerendo un ruolo protettivo di Hsp70 nei confronti della comparsa di atrofia (Naito, Powers et al. 2000). La sovraespressione stabile di Hsp70 nel muscolo scheletrico, quale si osserva in topi transgenici di età avanzata,

sembra contribuire in modo significativo ad accelerare il recupero del deficit di forza contrattile, attribuibile al minor numero di fibre muscolari presenti e possibilmente danneggiate dall'aumentato stress ossidativo che accompagnerebbe la sarcopenia (McArdle, Dillmann et al. 2004; Broome et al. 2006). Esistono evidenze che correlano l'effetto protettivo di Hsp70 all'allenamento fisico. L'esercizio fisico moderato induce un aumento dell'espressione di Hsp70 e della trascrizione e relativa espressione proteica di Bcl-2 nel SOL e nel cuore, mentre si evidenzia una diminuzione della trascrizione di Bax (Siu, Bryner et al. 2004). Anche a livello epatico il pre-esercizio fisico di entità moderata ha un effetto citoprotettivo in seguito all'esposizione delle cellule del fegato a diversi stimoli di stress (calore, freddo, stress ossidativo): con l'aumento dei livelli di Hsp70, si osserva una diminuita attivazione della Caspasi-3, (Mikami et al. 2004). Questi risultati suggeriscono un coinvolgimento di Hsp70 nella protezione all'apoptosi; è noto infatti che Hsp70 sembrerebbe inibire la formazione dell'apoptosoma agendo in diversi punti della via apoptotica (Beere and Green, 2001). L'attività di Caspasi-3 potrebbe essere indirettamente inibita dall'aumento di Hsp70 (Li CY et al. 2000).

L'effetto citoprotettivo della risposta allo stress si osserva anche dopo induzione della risposta allo stress del RE. Questa risposta allo stress è indotta da diversi fattori quali l'alterazione dell'omeostasi del calcio, la deprivazione di glucosio, l'accumulo di proteine malripiegate nel RE che inducono principalmente l'espressione delle GRP. Molte proteine implicate nella risposta allo stress del RE risiedono nel RE, svolgono funzioni di chaperone e hanno un'elevata capacità di legare calcio; è possibile, quindi, che la loro sovraespressione influenzi la quantità di ione presente nel RE e modifichi l'entità del suo rilascio nel citosol, evento che è stato dimostrato essere determinante la suscettibilità all'apoptosi (Pinton et al. 2001; Scorrano et al. 2003). Modulando i livelli di Grp94 in modo selettivo in diverse linee cellulari si è dimostrato che questa proteina svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare. La sua sovraespressione stabile, tramite trasferimento genico in linee cellulari miogeniche scheletriche, C2C12, e cardiache, H9C2, o in cardiomiociti primari di ratto trasfettati transientemente si accompagna a diminuita mortalità cellulare, dovuta a necrosi (valutata usando Propidio Ioduro) in seguito a sovraccarico di calcio, ottenuto mediante

esposizione allo ionoforo A23187 o ad ischemia. Questa ridotta mortalità si accompagnava ad un ridotto incremento di calcio libero nel citosol (valutato usando un indicatore fluorescente citosolico del calcio, Fluo-3), suggerendo che i livelli di espressione di Grp94 influiscono sul controllo dell'omeostasi di questo ione (Vitadello, Penzo et al. 2003). Medesimi risultati furono evidenziati in una linea cellulare umana di neuroblastoma, SH-SY5Y; le cellule sovraesprimenti Grp94, ottenuta con infezione con adenovirus, mostravano una diminuita percentuale di apoptosi indotta da trattamento con A23187 o ischemia, rispetto alle cellule di controllo. le cellule SH-SY5Y sovraesprimenti Grp94, mostravano una significativa diminuzione dell'attività di Caspasi-3 e Calpaina, la cui attivazione è indotta da un incremento dei livelli di calcio intracellulare, rispetto alle cellule di controllo o antisense. Al contrario la riduzione dei livelli di Grp94 nelle cellule antisense è caratterizzata da una significativa diminuzione della sopravvivenza cellulare (Little e lee 1995; Bando et al. 2003; Bando, Katayama et al. 2004).

La risposta da stress di RE viene indotta anche da stimoli di stress ossidativo che inducono la perossidazione delle membrane e l'aumento di calcio libero rilasciato dai depositi intracellulari. In cellule epiteliali di rene lo stress di RE, in seguito ad esposizione ad agenti riducenti (DTT) (Liu, Bowes et al. 1997; Liu, Miller et al. 1998) o in neuroni di ippocampo di ratto (Yu Z et al. 1999), mediante pretrattamento con un potente induttore (2 deossi-D-glucosio), induce l'aumento dell'espressione di Grp78 aumentando la sopravvivenza cellulare, mentre tale citoprotezione viene persa se le cellule vengono trasfettate con il costrutto antisense, si verifica infatti un aumento dei livelli ROS e di calcio intracellulare.

Anche l'esposizione a tunicamicina, un inibitore della glicosilazione proteica, determina incremento dei livelli di Grp78 in coltura, a causa dell'accumulo di proteina non correttamente ripiegate nel RE (Sweet et al. 2003), inducendo una risposta UPR.

Lo stress del RE induce la sovraespressione di HO-1, una proteina ubiquitaria che viene solitamente indotta in seguito a stress ossidativo ed emodinamico (Itoh et al. 2003). Liu XM et al. (2005) dimostrarono l'effetto citoprotettivo della sovraespressione di HO-1 nelle cellule muscolari lisce dei vasi, in seguito ad esposizione a diversi stimoli che inducono stress del RE; le cellule furono trattate

con Brefeldina A, un inibitore della traslocazione delle proteine dal RE al Golgi, con Omocisteina, che impedisce il corretto ripiegamento delle proteine interferendo con la formazione dei ponti disolfuro, con taspargina o con un inibitore del proteosoma, MG-132, inducendo in tutti i casi l'espressione di HO-1. L'effettiva dimostrazione di un'avvenuta risposta allo stress del RE fu confermata dall'aumento dei livelli di Grp78. L'effetto antiapoptotico di HO-1 attraverso stress del RE sembra esplicarsi attraverso l'azione del monossido di carbonio, derivato dell'azione catalitica di HO-1, inducendo diminuzione dell'espressione di GADD153 (Liu XM et al. (2005).

3. Stato delle conoscenze sulle proteine dello stress

3.1 Hsp70

Nella risposta allo stress Hsp70 risulta essere una delle proteine HSP maggiormente espresse nella cellula; numerosi sono gli insulti che inducono un aumento della sua espressione: lo stress ossidativo, i cambiamenti nel pH cellulare, l'esercizio fisico che induce ipertermia e contrazione muscolare o l'aumento della degradazione proteica. Le proteine denaturate potrebbero perciò servire come "termometro cellulare" al fine di indurre una risposta Hsp70. Per questi motivi Hsp70, in quanto proteina chaperone, funge da sensore dello stress giocando un ruolo citoprotettivo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Hsp70 appartiene alla famiglia genica delle HSP70, i cui membri possono essere espressi costitutivamente (Hsc70) e/o venire indotti in risposta a stress di particolari compartimenti intracellulari, quali il citosol (Hsp70).

Il gene HSP70-1 codifica la forma inducibile Hsp70, mentre il gene HSP70-2A codifica per Hsc70, cioè per l'isoforma costitutivamente espressa e debolmente inducibile, che viene sintetizzata in condizioni fisiologiche nella maggior parte delle cellule a livello citoplasmatico, mentre migra nel nucleo e nel nucleolo in condizioni di stress. Diversamente da Hsc70, Hsp70 è presente a basse quantità nelle cellule non stressate, ma può essere rapidamente sintetizzata nel citoplasma in risposta allo stress, e migra poi nel nucleo, dove si lega a proteine e ad altre strutture. Oltre che con l'aumento della temperatura, Hsp70 incrementa notevolmente accumulandosi sia nel nucleo che nel citosol, anche in seguito a deplezione di ATP, ad acidosi e all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno

(ROS), condizioni che si verificano sia fisiologicamente, con l'esercizio muscolare, che in seguito a patologie che coinvolgono la perfusione e l'ossigenazione dei tessuti (Liu, Gampert et al. 2006).

La struttura molecolare delle HSP70 comprende tre parti: il dominio ATPasico N-terminale, il sito di legame peptidico e il dominio C-terminale. La forma citosolica di Hsp70 agisce come Hsc70 facilitando le prime tappe della maturazione proteica. Le interazioni Hsc70-Hsp70/polipeptide nascente sono transienti e sembrano aver luogo nel corso della sintesi stessa a livello dei ribosomi (Liu et al., 2001; (Gorza and del Monte 2005). L'attività chaperonica di Hsp70 è mediata attraverso interazioni tra il suo dominio C-terminale e i residui idrofobici esposti dei substrati polipeptidici non correttamente ripiegati. L'associazione di Hsp70 con il suo bersaglio è inoltre regolata dal dominio N-terminale, che è in grado di legare e idrolizzare ATP. L'ATP media dei cicli di associazione e dissociazione tra Hsp70 e il suo substrato; infatti Hsp70 nella forma legata ad ATP associa e rilascia rapidamente il substrato con bassa affinità, mentre quando è legata ad ADP lega più lentamente ma in modo più stabile il substrato (Beere and Green 2001). E' anche stato descritto come Hsp70 sia in grado di legare alcune proteine già ripiegate nella loro conformazione, come p53, Heat Shock Transcriptional Factor (HSF) e altre Hsp.

Hsp70 è indotta nel muscolo scheletrico, come in altri tessuti, da stimoli di stress, come l'ipertermia, la ridotta perfusione e lo stress ossidativo, oppure da stimoli fisici specifici, come l'esercizio muscolare (Liu, Gampert et al. 2006). I meccanismi responsabili dell'induzione di Hsp70 tramite attività fisica non sono ancora del tutto chiari. L'aumento della sopravvivenza cellulare mediato da Hsp70 sembra, almeno in parte, essere dovuto alla capacità di inibire la morte cellulare programmata agendo in molteplici punti della via apoptotica. Hsp70 infatti inibirebbe la formazione dell'apoptosoma, costituito da polimeri del fattore Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) legato al citocromo c e da procaspasi 9, sia interferendo con il rilascio di citocromo c dai mitocondri o impedendo il reclutamento di procaspasi 9 nell'apoptosoma (Beere and Green, 2001).

3.2 Eme-ossigenasi

L'Eme-ossigenasi (HO) comprende una famiglia altamente conservata di enzimi che catalizzano la degradazione del gruppo prostetico Eme. Tale reazione produce quantità equimolari di bilirubina, un antiossidante, ferro, nella forma ferrosa (FeII), e monossido di carbonio (CO), un modulatore del ciclo cellulare nonché un vasodilatatore. HO catalizza la rottura dell'anello prostetico Eme per formare biliverdina, che viene di seguito convertita a bilirubina da una riduttasi NADPH dipendente (figura 2). Questa reazione enzimatica richiede tre moli di ossigeno molecolare per ciascuna molecola di Eme ossidata e la conseguente riduzione del NADPH.

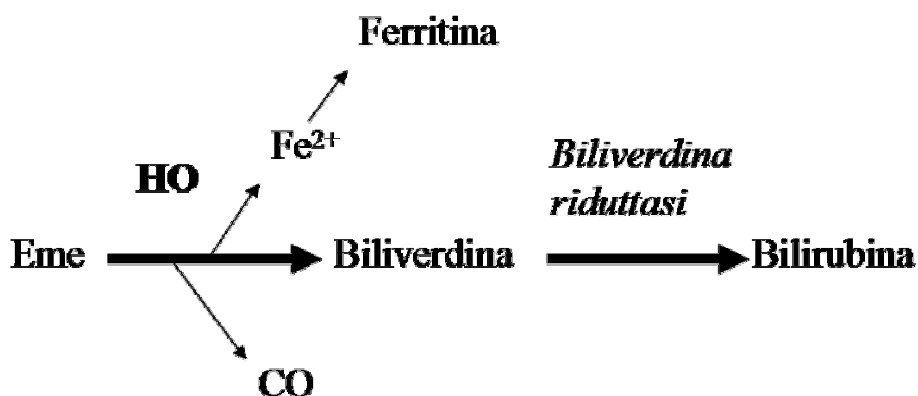


Figura 2. Durante il processo di catabolismo dell'Eme, l'eme-ossigenasi (HO) scinde l'anello prostetico dell'Eme per formare Biliverdina, la quale è conseguentemente convertita a Bilirubina dall'enzima Biliverdina Riduttasi. Questa reazione produce anche Ferro (Fe²⁺), che può legarsi alla ferritina e non essere temporaneamente più disponibile nella cellula, e monossido di carbonio (CO).

Esistono tre isoforme di Eme-ossigenasi. L'HO-1 (32 kDa) è l'isoforma inducibile, in quanto l'induzione della relativa espressione proteica può avvenire in risposta a stress ossidativo come l'ipossia, l'iperossia o H₂O₂ (Keyse and Tyrrell 1987) o in seguito a trattamenti quali ipertermia (Raju and Maines 1994), taspigargina (Liu, Peyton et al. 2005), metalli pesanti, lipopolissacaridi (LPS), citochine (TNF- α) o indotta dal catabolismo dello stesso Eme (Platt and Nath 1998).

HO-1 (Hsp32) appartiene alla grande famiglia delle proteine dello stress indotte da shock di calore (HSPs); è stato infatti dimostrato che, in seguito a trattamento ipertermico nei roditori, c'è un aumento della responsività, a livello trascrizionale, per l'induzione dell'espressione di questa proteina (Shibahara, Muller et al. 1987). Inoltre le regioni promotrici dei diversi geni, che codificano per HO-1, presentano

elementi molto simili a quelli identificati nei promotori dei geni che codificano per le HSPs, sebbene sia importante ricordare che HO-1 non condivide un'apparente omologia aminoacidica con le HSPs, ne mostra attività di chaperone. L'HO-2 (36 kDa) è invece l'isoforma costitutiva espressa sotto condizioni di omeostasi in tutti i tessuti. Sia HO-1 che HO-2 sono espresse e catalizzano la stessa reazione biochimica in tutte le cellule.

Una terza isoforma è l'HO-3 (33kDa) che non è attiva dal punto di vista catalitico, ma si pensa invece essere un sensore cellulare dell'ossigeno.

Sotto normali condizioni fisiologiche, l'attività di HO è più elevata nella milza, dove risulta essere coinvolta nel catabolismo e ricambio degli eritrociti. HO è anche presente nelle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo (Abraham 1991). Nella maggior parte dei tessuti, dove HO non è coinvolta nel metabolismo dell'emoglobina, HO-1 viene rilevata a bassi livelli, ma la sua espressione ed attività aumenta fortemente se sottoposta a stimoli chimici e fisici, come l'emolisi. (Pimstone, Engel et al. 1971).

HO-2 infatti non risponde ad attivazione trascrizionale dovuta a condizioni di stress, ma viene indotta da adrenal-gluco corticoidi nel cervello (Raju, McCoubrey et al. 1997).

Inizialmente l'enzima HO-1 fu identificato come una proteina associata al reticolo endoplasmatico (RE) attraverso un segmento del dominio COOH-terminale; l'attività di HO fu infatti rilevata in frazioni microsomiali.

HO-1 viene indotta da NO e suoi derivati in molti tipi cellulari, come fibroblasti e cellule vascolari. HO-1 è anche indotta da diversi fattori di crescita (TGF- β , PDGF) (Durante, Peyton et al. 1999; Ning, Song et al. 2002) e da antiossidanti come curcumina (Balogun, Hoque et al. 2003).

HO-1 può essere utilizzata come marker molecolare degli stati proinfiammatori indotti da TNF- α ed interleuchine (ILs). Nelle cellule endoteliali vascolari la sovraespressione di HO-1 regola l'espressione e l'attività dell'enzima ciclossigenasi (COX) influenzando la disponibilità di Eme nella cellula. L'Eme è importante per la corretta attività catalitica dell'enzima COX. La sovraespressione di HO-1 inibendo la produzione di prostaglandine (PGE) attenua apoptosi e infiammazione mediata da TNF- α (Haider et al. 2002; Kushida, Li Volti et al. 2002).

L'incremento dei radicali liberi (ROS) nella cellula porta alla perturbazione dell'equilibrio tiolico intracellulare con riduzione della GSH e rilascio nucleare di Bach1, un repressore trascrizionale di HO-1 (Kikuchi et al. 2005).

La superfamiglia della MAPK (mitogen activated protein kinase) comprende Ser/Thr protein chinasi (p38, ERK1/2, JNK/SAPK) che regolano la crescita, l'apoptosi e il differenziamento cellulare. L'induzione di HO-1 sembra coinvolgere la via trasduzionale di p38 (Kacimi, Chentoufi et al. 2000), il fattore inducibile indotto da ipossia, Hif-1, (Lee, Jiang et al. 1997) e l'attivatore della proteina 1, AP-1, attraverso gli LPS (Wijayanti, Huber et al. 2004).

Diversi modelli in vitro ed in vivo, come modelli di topi knock-out per il gene di HO-1 (HO-1 $-/-$) e un paziente umano mancante di HO-1 (Otterbein and Choi 2000) hanno evidenziato il ruolo citoprotettivo dovuto all'induzione di HO-1. La maggior parte dei topi HO-1 $-/-$ muoiono durante lo sviluppo embrionale e solo pochi casi sopravvivono fino al primo anno di vita. Le cellule derivate dai topi transgenici HO-1 $-/-$ risultano più suscettibili al danno ossidativo. Le medesime alterazioni fenotipiche furono trovate nel paziente umano HO-1 $-/-$.

Il meccanismo attraverso cui HO-1 induce citoprotezione non è ancora chiaro. Probabilmente i tre principali prodotti derivanti dalla degradazione dell'Eme sono coinvolti nella protezione cellulare.

Il ferro rilasciato dall'Eme, attraverso l'attività enzimatica di HO, è transientemente disponibile per la produzione di ROS intracellulari. Questa reazione catalitica porta a nitrosilazione dei tioli dipendente da NO, generazione di reattivi ossidanti e perossidazione lipidica della membrana cellulare. Quest'ultima può inoltre anche essere indotta dall'Eme libero, anch'esso un pericoloso potenziale composto pro-ossidante (Halliwell 1999).

Tuttavia la protezione antiossidante fornita dall'attività di HO, nei confronti del metabolismo del ferro, è spiegata attraverso il ruolo delle proteine regolatorie leganti ferro (iron regulatory proteins, IRPs). La cellula utilizza tale meccanismo per ridurre i livelli di ferro intracellulari. In condizioni di deficit di ferro le IPR inibiscono la traduzione di ferritina a livello di mRNA message. La ferritina si lega al ferro citoplasmatico disponibile impedendogli di catalizzare reazioni fino al suo rilascio. Esiste un'associazione tra l'attività di HO-1 e l'aumento dell'espressione di Ferritina (Eisenstein, Garcia-Mayol et al. 1991) dimostrando

che l'induzione di quest'ultima sembra avere un ruolo citoprotettivo dipendente da HO.

3.3 Grp94

Grp94, sebbene sia una tra le più abbondanti proteine che risiedono nel lume del RE (5-10%), insieme a BiP, calreticulina e PDI, rimane tutt'oggi una proteina poco indagata per cui il suo ruolo fisiologico resta ancora enigmatico. Grp94 è una proteina altamente conservata fra i Vertebrati, costitutivamente espressa nel RE delle cellule di mammifero in modo ubiquitario. Il tessuto muscolare scheletrico rappresenterebbe un'eccezione, in quanto nel coniglio l'espressione di Grp94 si presenta esclusivamente durante lo sviluppo prenatale e nelle prime fasi vitali dopo la nascita, diventando rilevabile nel muscolo adulto solo nelle cellule interstiziali e vascolari (Vitadello, Colpo et al. 1998). Tuttavia è proprio nelle prime fasi dello sviluppo di un organismo che Grp94 sembra avere un ruolo principale. Topi KO per Grp94 *-/-* non sopravvivono durante lo sviluppo embrionale morendo al settimo giorno di gestazione (Wanderling et al. 2007). Nel muscolo scheletrico la marcata espressione di Grp94, sulla superficie della membrana cellulare, è necessaria per il processo di fusione dei mioblasti in miotubi in cellule di topo C2C12 (Gorza and Vitadello 2000).

La proteina Grp94 matura di topo consiste di 782 residui aminoacidici dopo taglio del peptide segnale di 21 residui. Grp94 ha una forma a bastoncino ripiegato ed è suddivisa in distinti domini strutturali; biologicamente esiste in forma dimerica grazie alla presenza di interazioni idrofobiche tra due segmenti della regione C-terminale. Inoltre esistono due domini acidi presenti rispettivamente a livello C-terminale, aminoacidi (aa) 735-781, e lungo la sequenza della proteina, aa 266-347. Gli aa 421-448 formano una sequenza leucine zipper ripetuta che potrebbe servire come un modulo di interazione proteina-proteina. Esiste inoltre un dominio proteico ricco di aa con carica opposta (aa 559-609) la cui funzione è ancora sconosciuta e che contiene un motivo KEKE (aa 572-587), importante per l'interazione con le proteine substrato di Grp94 (figura 3). Infine a livello N-terminale è presente un dominio che contiene i siti di legame per farmaci inibitori quali Radicol e Geldamicina, che competono per lo stesso sito di legame con l'ATP (Argon and Simen 1999). Grp94 presenta attività ATPasica, lega infatti

ATP con bassa affinità e lo idrolizza, ma sembra non necessitare dell'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per svolgere le sue funzioni e il ruolo dell'adenin nucleotide nella regolazione dell'attività di Grp94 è ancora sconosciuto (Csermely, Schnaider et al. 1998). Grp94 è una proteina N-glicosilata; nonostante i sei potenziali siti di glicosilazione, solo il residuo Asn 196, che è conservato in tutti i geni Grp94 conosciuti dei Mammiferi, lega un oligosaccaride (Cala 2000) (figura 3).

Grp94 è inoltre fosforilata, ma non in modo costitutivo (Welch, Garrels et al. 1983). E' stata dimostrata la presenza di fosforilazione in Ser e Thr dovuta a casein chinasi II (CK-II) (Cala 2000) e recenti evidenze indicano che può essere fosforilata in tirosina, da parte di tirosin-chinasi della famiglia delle Src (Brunati et al., sottoposto).

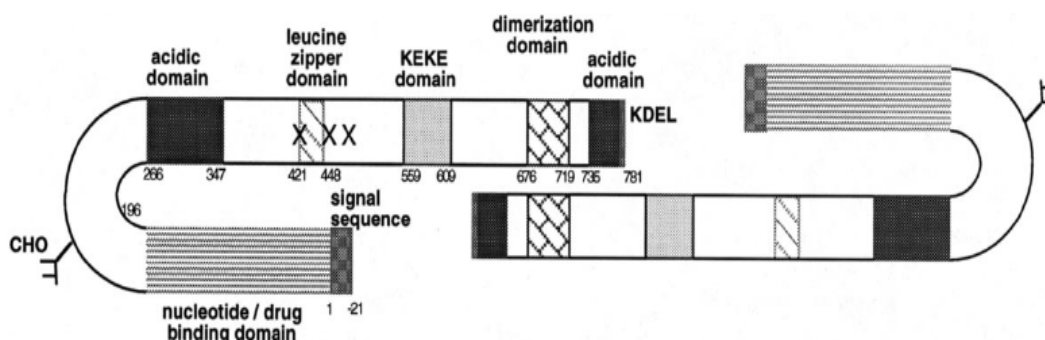


Figura 3. Modello di struttura proteica per Grp94. La proteina è raffigurata come un dimero di monomeri a forma di bastoncino ripiegato, che si associano attraverso il dominio di dimerizzazione. La sequenza segnale N-terminale e il tetrapeptide KDEL al C terminale indirizzano Grp94 al RE. Il dominio N-terminale della proteina matura contiene il sito di legame per i farmaci radicicol e geldamicina e l'oligosaccaride (CHO) a livello dell'aminoacido Asp196. Inoltre si evidenzia il primo dei due domini acidi (dominio coil coiled, in nero) che regolano il legame con tali farmaci. Un altro dominio (in grigio) contiene una serie di aminoacidi adiacenti con carica opposta e il motivo di interazione con i substrati proteici KEKE. Il dominio leucin zipper invece contiene i tre siti di glicosilazione visualizzati con la lettera X (Argon and Simen 1999).

La fosforilazione in tirosina di Grp94 è dimostrabile solo dopo stimolazione al differenziamento delle cellule miogeniche C2C12. Mentre non si conoscono le conseguenze funzionali della fosforilazione in serina, è stato dimostrato che la fosforilazione in tirosina si accompagna alla traslocazione della proteina dal RE al Golgi e alla superficie cellulare (Brunati et al., sottoposto).

Come altre proteine del lume del RE, Grp94 è caratterizzata da una elevata capacità, pur con bassa affinità, di legare calcio. Grp94 presenta circa quindici siti di legame per questo ione in regioni, con residui carichi negativamente, distribuite lungo la sequenza della proteina; di questi siti, quattro apparentemente presentano moderata affinità di legame ($KD \sim 2\mu M$) e undici bassa affinità ($KD \sim 600\mu M$) (Argon and Simen, 1999). Tale capacità potrebbe conferire a questa Grp proprietà di proteina tampone e quindi coinvolgerla nella regolazione dell'omeostasi del calcio nel RE. Come per altre proteine chaperone del RE, il legame con il Ca^{2+} è importante nel regolarne l'attività e quindi l'interazione con le proteine clienti e con altre proteine chaperone del RE. In particolare, è stato identificato nel dominio carico al N-terminale un sito di legame ad alta affinità per il calcio, che regolerebbe l'attività di legame del chaperone con i peptidi substrato (Biswas, Sriram et al. 2006). Una fondamentale differenza tra Grp94 e il chaperone BiP o calnessina è che Grp94 interagisce con un ristretto numero sia di proteine clienti da ripiegare che di altre proteine che intervengono nel processo di ripiegamento (chaperonine); Grp94 interagisce in modo relativamente stabile con le catene delle immunoglobuline (Melnick, Aviel et al. 1992), con gli antigeni del complesso MHC di tipo II (Schaiff, Hruska et al. 1992), con la tireoglobulina (Kuznetsov, Chen et al. 1994), l'apolipoproteina B (Linnik and Herscovitz 1998), il collagene (Ferreira, Norris et al. 1994), ErbB2 (Chavany, Mimnaugh et al. 1996) e un'esterasi del colesterolo (Bruneau, Lombardo et al. 1998). Recentemente sono state individuate nuove possibili proteine clienti: Grp94 sembra infatti essere coinvolta nella localizzazione subcellulare, a livello del Golgi, di TRL4 in cellule epiteliali murine (m-ICcl2) (Hornef et al. 2003). Inoltre cellule staminali embrionali di topo Grp94^{-/-} crescono in coltura e sono in grado di differenziarsi, ma non in cellule muscolari. Questo difetto sembrerebbe essere dovuto alla mancata produzione del fattore di crescita insulina-dipendente (IGF)-II in queste cellule mutanti, proponendo IGF-II come proteina cliente di GRP94 (Wanderling et al. 2007).

Studi recenti effettuati utilizzando cross-linking chimico, hanno dimostrato che in realtà Grp94 è associata attraverso legami deboli, con Grp78 e altre proteine formando un complesso chaperone, anche in assenza di proteine substrato (Meunier, Usherwood et al. 2002).

Grp94 è in prevalenza uniformemente distribuita nel lume del RE. Inoltre Grp94 può esistere, oltre che come proteina endoluminale, anche come proteina transmembrana, a livello del RE e dell'apparato di Golgi, in quanto possiede un putativo dominio idrofobico compatibile con questa conformazione (Mazzarella and Green, 1987). In condizioni di stress, in seguito ad alterazione dell'omeostasi del calcio con lo ionoforo A23187, in fibroblasti murini (Booth and Koch, 1989) o in cellule di mammifero (Welch et al. 1983), Grp94 si ridistribuisce nell'apparato del Golgi, nel nucleo nel lato esterno della membrana plasmatica e viene parzialmente secreta nello spazio extracellulare (McCormick et al. 1982; Takemoto et al. 1992; Csermely et al. 1998). Le molecole di Grp94 presenti sulla superficie cellulare esistono anche come forme tronche, prive del gruppo C-terminale per la perdita della sequenza segnale di ritenzione nel reticolo KDEL, presente all'estremità C-terminale (Altmeyer, Maki et al. 1996).

Recentemente lo studio di Grp94 si è esteso ad un possibile ruolo nella risposta immune, in particolare sta ricevendo notevole attenzione come futuro potenziale vaccino contro il cancro: Grp94 extracellulare può legare peptidi derivanti da cellule necrotiche tumorali e interagire fisicamente con recettori specifici posti sulla membrana dei macrofagi, giocando un ruolo chiave nella presentazione antigenica mediante il complesso di immunoistocompatibilità (MHC)-I (Podack and Racz 2007; Strbo and Podack 2008).

Modulando i livelli di Grp94 in modo selettivo in diverse linee cellulari si è dimostrato che questa proteina svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare, specialmente dopo esposizione a stress caratterizzati da alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} (Little e Lee 1995; Vitadello, Penzo et al. 2003; Bando, Katayama et al. 2004).

3.4 Grp75

Grp75 [mortalina/Hsp70 mitocondriale (mtHsp70)], classificata come membro della famiglia delle HSP70, in realtà, sia strutturalmente che per modalità di induzione, appartiene alla famiglia delle GRP. Questa proteina di 66-75 kDa si localizza principalmente nei mitocondri, ma è stata identificata anche nel RE, nella membrana plasmatica e in vescicole del citoplasma (Ran, Wadhwa et al. 2000; Yang, Liu et al. 2008) A differenza della maggior parte delle HSP, la sua

espressione non è inducibile con il calore; mentre viene indotta dalla deprivazione di glucosio e dallo ionoforo del calcio, come la maggior parte delle GRP. È stato dimostrato sia in vitro che in vivo che Grp75 si può legare Grp94, localizzata prevalentemente nel RE, influenzando l'attività delle due proteine (Takano et al., 2001). Grp75 nel mitocondrio è prevalentemente libera nella matrice dove svolge funzioni di proteina chaperone. Grp75 è abbondantemente espressa nel miocardio e nei muscoli scheletrici ricchi in mitocondri del ratto, come il muscolo soleo, composto prevalentemente da fibre lente, e la porzione del gastrocnemio contenente fibre rapide rosse (Ornatsky, Connor et al. 1995). L'espressione di Grp 75 nel muscolo scheletrico sembra aumentare durante l'esercizio in modo indipendente dalla temperatura corporea. È stato osservato che nel gastrocnemio di ratti sottoposti ad un allenamento fisico in un ambiente freddo, mantenendo la temperatura corporea a 38°C (valore di riposo), l'espressione di Grp75 aumenta, mentre nell'estensore delle dita (EDL) tale espressione rimane invariata (Mitchell, Dugas et al. 2002).

3.5 Grp78/BiP

GRP78, conosciuto anche con il nome di BiP, è una delle più abbondanti proteine del RE e svolge il ruolo maggiore di proteina chaperone. Dopo la sintesi proteica, le proteine nascenti, che entrano nel lume del RE, presentano corte sequenze idrofobiche che BiP (Binding Protein) riconosce e lega, prevenendone così la denaturazione e le eventuali aggregazioni non specifiche. BiP presenta legami forti, ma transienti con numerose proteine clienti, incluse le catene immunoglobuliniche (Knittler and Haas 1992). Grp78 pertanto risulta essere un regolatore centrale nell'omeostasi del RE come conseguenza dei suoi molteplici ruoli funzionali, quali il ripiegamento delle proteine, un'elevata capacità, pur con bassa affinità, di legare calcio (Lievremont, Rizzuto et al. 1997) e nel controllo dell'attivazione delle proteine transmembrana, sensori dello stress di RE, nella risposta UPR. Tuttavia il ruolo fisiologico di Grp78 nello sviluppo non è ancora stato chiarito sebbene sia espressa nel muscolo adulto (Volpe, Villa et al. 1992). Grp78 lega ATP con bassa affinità e utilizza l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per svolgere le sue funzioni di chaperone (Munro and Pelham 1987).

3.6 Calreticulina

Calreticulina è una proteina di 46 kDa, che possiede, assieme alla calnessina, due funzioni principali nel lume del RE: il ruolo di chaperone e di regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} agendo come proteina tampone

Il gene che codifica per la calreticulina è attivato dalla deplezione di calcio dei depositi cellulari, deplezione di aminoacidi, taspigargina, calore (Michalak, Corbett et al. 1999).

Calreticulina presenta tre domini strutturali: attraverso il dominio N-terminale si ha l'interazione con altre proteine chaperone del RE, come PDI (Protein Disulfide Isomerase), o con chaperonine, come ERp57 (ER protein57), mentre il dominio ricco in proline (P) lega il Ca^{2+} con alta affinità, interagisce con PDI ed è responsabile dell'attività di proteina chaperone nel ripiegamento delle glicoproteine. Il dominio C-terminale, in grado di legare Ca^{2+} con un'alta capacità, è coinvolto nel deposito di Ca^{2+} nel lume del RE (Michalak et al., 1999).

Durante la sintesi proteica e immediatamente dopo la traslocazione nel RE, si forma il complesso di proteine chaperone, in cui i polipeptidi nascenti vengono riconosciuti e legati dalla calreticulina, con un legame sensibile alla concentrazione di Ca^{2+} . Calnessina e calreticulina quindi aiutano il corretto ripiegamento delle proteine destinate alla secrezione o alle membrane (Michalak and Hendrich 2002).

La calreticulina è espressa a concentrazioni molto basse nel miocardio e nel muscolo scheletrico adulto. La funzione di tampone Ca^{2+} di calreticulina sembra svolgere un ruolo importante durante lo sviluppo, nel cuore e nei cardiomiociti del sistema di conduzione cardiaco (Nakamura, Robertson et al. 2001), mentre nelle cellule muscolari striate adulte è primariamente svolta dalla calsequestrina (Gorza and Del Monte, 2005).

4. Problematiche aperte

4.1 Studio della risposta allo stress in modelli sperimentali che replicano condizioni umane protettive o patologiche

Il muscolo scheletrico è un tessuto la cui funzione principale è quella di sviluppare forza e velocità per eseguire un lavoro fisico. In seguito ad esercizio

fisico la contrazione muscolare produce energia termica, sottoforma di ipertermia, e stress ossidativo in seguito sia all'aumentata attività mitocondriale, a causa della maggior richiesta di energia, che a temporanei e ripetuti episodi di ischemia-riperfusion (Liu, Gampert et al. 2006). Situazioni patologiche come l'atrofia muscolare possono invece alterare l'omeostasi intracellulare del calcio generando o aumentando sia la suscettibilità all'apoptosi che lo stress ossidativo nel miocita (Hunter et al. 2001; Powers et al. 2007; Muller et al. 2007).

La risposta allo stress è stata studiata in modelli sperimentali animali che replicano condizioni fisiologiche e alterazioni patologiche di frequente riscontro nell'uomo. In particolare, riguardo al muscolo scheletrico rivestono grande interesse quelle associate alla comparsa di uno stato citoprotettivo (allenamento) o patologico (atrofia muscolare).

L'esercizio fisico, noto essere un fattore di prevenzione nello sviluppo e nella progressione di patologie cardiovascolari, è considerato un evento preconditionante in quanto è in grado di aumentare la resistenza delle cellule miocardiche al danno ischemico (Bolli 2000).

L'esercizio muscolare induce ipertrofia e/o transizione dei tipi di fibre. L'espressione di Hsp70 potrebbe incrementare per supportare il corretto ripiegamento e la compartimentalizzazione delle proteine nascenti delle fibre muscolari, come si suppone avvenga in corso di ipertrofia e di transizione di tipo di fibra indotte da stimolazione elettrica o da sovraccarico (Neufer et al. 1996; Kelly, Tiidus et al. 1996; Liu Y. Et al. 2003). E' noto che il contenuto in Hsp70 presente nel muscolo sembra correlare con la quantità di miosina di tipo 1 nell'animale sedentario, mentre in seguito ad esercizio fisico muscoli costituiti prevalentemente da fibre rapide incrementano i livelli di Hsp70, raggiungendo valori simili a quelli riscontrati nei muscoli lenti. Resta tuttavia da chiarire se l'aumento dell'espressione di Hsp70 coinvolga solo le fibre lente o si estenda a tutte le fibre muscolari. Nel primo caso l'espressione di Hsp70 risulterebbe fibro-specifica, cioè associata ad eventi legati alla sintesi e al ripiegamento delle molecole di miosina lenta, come già suggerito in letteratura; nel secondo caso, la sua presenza in tutte o in una popolazione più ampia di fibre, sarebbe interpretabile come indice della presenza di una risposta allo stress.

L'intensità e la durata dell'esercizio fisico rappresentano variabili importanti nel determinare la risposta allo stress nel muscolo scheletrico e nel cardiaco, Si deve pertanto distinguere tra esercizio acuto (sforzo muscolare in breve tempo) ed allenamento (sforzo ripetuto per diverse settimane) di entità moderata od elevata.

Diversi studi hanno dimostrato come nel ratto l'esercizio fisico acuto induca l'espressione di diverse proteine dello stress e di enzimi ossidativi nel muscolo scheletrico, cardiaco e nel fegato. Ratti Sprague-Dawley sono stati fatti correre su tappeto motorizzato (24 m/min) per diversi tempi (0, 20, 40 o 60 min) fino allo sfinimento (102 +/- 7 min); il lisato proteico ottenuto dal cuore è stato analizzato per valutare lo stato di attivazione del fattore di trascrizione HSF. Nei rattisottoposti ad esercizio fisico per almeno 40 minuti, si rilevò attivazione di HSF contrariamente ai ratti di controllo sedentari, dimostrando come l'esercizio acuto induca una precoce, ma transitoria, trascrizione di Hsp70 (mRNA) nel miocardio (Locke et al. 1990, 1995). Un medesimo protocollo (media corsa di 64.9 +/-8 min ad una velocità costante di 26.8 m/min, pendenza 10%) fu utilizzato per indagare gli effetti nel muscolo scheletrico e nel fegato; dopo appena 30-60 min di esercizio acuto il trascritto di Hsp70 raggiunse valori massimi, per ritornare a valori basali 6 ore dopo, nei muscoli SOL, EDL e Gastrocnemio sottoposti ad esercizio rispetto al controllo (Salo et al. 1991).

Anche l'allenamento di elevata intensità induce l'espressione di Hsp70 in modo continuativo. Ratti Fischer 344 sottoposti a corsa di resistenza (15m/min per 60 minuti; 5 giorni/settimana per 20 settimane, 10% pendenza) mostrarono aumento significativo dell'espressione proteica di Hsp70 nel SOL e nei ventricoli dei ratti allenati rispetto ai controlli. Questa tipologia di allenamento sembra essere in grado di attivare una risposta che può considerarsi una sorta di adattamento allo stress nel tempo, in quanto permane anche dopo 48 ore dal termine dell'ultima sessione di allenamento (Samelman et al. 2000).

Per atrofia muscolare si intende la perdita della massa muscolare. Questa situazione patologica può essere indotta da denervazione, dalla vecchiaia, dalla presenza di elevati livelli di miostatina (un regolatore negativo della crescita) o da protratta inattività muscolare in seguito a patologie (per es. cardiopatie, distrofia muscolare,cancro) o all'assenza di gravità (voli nello spazio). Esistono a tale

proposito modelli sperimentali animali (ratto o topo) che cercano di riprodurre e studiare il fenomeno.

L'importanza di studiare l'atrofia da disuso sta nel fatto che questo modello sperimentale riproduce una situazione patologica che induce una risposta cellulare allo stress che ha come conseguenza l'induzione di processi apoptotici.

Sono infatti molti gli studi per cercare di capire i meccanismi cellulari coinvolti nell'induzione dell'atrofia muscolare. Si ipotizza che l'aumento dei radicali liberi (ROS) nei miociti, riscontrato durante l'inattività muscolare, eventualmente potenziato da disequilibri dell'omeostasi del calcio intracellulare, possa favorire il catabolismo proteico e aumentare la suscettibilità cellulare all'apoptosi (Hunter et al. 2001; Powers et al. 2007; Muller et al. 2007). I ROS causano infatti la perossidazione dei fosfolipidi di membrana che porta per esempio al malfunzionamento delle pompe ioniche (pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$) e a sua volta all'alterazione dell'omeostasi cellulare del Ca^{2+} . L'aumento intracellulare di quest'ultimo importante secondo messaggero, attiva le proteasi cellulari (per es. Calpaina) e determina la disorganizzazione diretta del citoscheletro (si ricordi che il Ca^{2+} regola l'interazione actina-miosina e la polimerizzazione α -actina-tubulina nel muscolo). Inoltre si attivano le endonucleasi, le fosfolipasi e si generano così mediatori dell'infiammazione (acido arachidonico e produzione di prostaglandine). Lawler, Song et al. (2003) hanno dimostrato che nel muscolo scheletrico SOL di ratto sottoposto ad 28 giorni di sospensione, si ha una progressiva distruzione delle difese antiossidanti in seguito alla diminuita espressione di enzimi quali SOD (Superossido dismutasi) e GSH (Glutazione Perossidasi). Dall'altra parte i ROS causano l'attivazione di vie di trasduzione del segnale che inducono l'aumento dell'espressione e dell'attività dei complessi respiratori mitocondriali e di enzimi antiossidanti (Radak, Sasvari et al. 2000; Smolka, Zoppi et al. 2000) come risposta per controbattere ad una situazione di stress. Mancano tuttavia studi più approfonditi che analizzino gli effetti del disuso muscolare su diverse proteine dello stress e su un più ampio arco temporale.

4.2 Strategie di induzione di una risposta cellulare allo stress

Lo studio di modelli animali in vivo permette di replicare condizioni umane protettive (l'allenamento fisico) o di indurre alterazioni patologiche (l'atrofia

muscolare da disuso,). La comprensione dei meccanismi molecolari, attraverso cui le proteine dello stress agiscono come effettori di citoprotezione, verrà analizzata attraverso lo studio in vitro di modelli che incrementino la sintesi possibilmente di una sola proteina dello stress.

Le strategie per indurre una risposta cellulare allo stress sono molteplici.

L'espressione selettiva di una proteina dello stress può essere ottenuta mediante manipolazione genetica o induzione farmacologica della risposta cellulare allo stress.

Nel primo caso si inserisce DNA esogeno nella cellula che si sta studiando, mediante trasfezione stabile o transiente.

Nella trasfezione stabile, il vettore contiene, oltre al promotore e alla sequenza che si vuole far esprimere, anche un gene che conferisce resistenza ad un antibiotico introdotto nel mezzo di mantenimento delle cellule. In questo modo è possibile selezionare, in modo veloce e sicuro, le cellule in cui è avvenuta l'integrazione del vettore stesso nel DNA genomico. Questo è un meccanismo molto utile che permette di isolare facilmente delle linee stabili (cloni) per il gene di interesse. Tuttavia la sovraespressione stabile di una proteina può determinare alterazioni dell'espressione genica cellulare, sia come conseguenza dell'inserimento del gene esogeno nel genoma, che come risposta adattativa a perturbazioni causate dalla sovraespressione proteica di per sé. Per escludere quindi fenomeni adattativi dei cloni in sé e per comprendere il reale meccanismo d'azione della proteina in esame si studia il fenomeno attraverso trasfezione transiente. La sequenza introdotta rimane libera nel nucleo senza inserirsi stabilmente nel DNA genomico. Le cellule così trattate devono essere osservate in tempi brevi (alcuni giorni), in quanto il DNA viene perso rapidamente. I meccanismi di trasfezione maggiormente utilizzati in vitro si basano sull'utilizzo di sistemi che alterano temporaneamente le caratteristiche della permeabilità della membrana (precipitazione con calcio fosfato o l'uso di sostanze lipofile), in modo da favorire il passaggio del vettore attraverso il doppio strato lipidico e il raggiungimento nel nucleo dove avviene l'espressione genica.

Il secondo metodo è più difficile, ma è maggiormente trasferibile a modelli in vivo. L'utilizzo di trattamenti farmacologici rispetto ai metodi di trasfezione, presenta l'elevata probabilità di indurre una risposta cellulare meno selettiva, in

quanto favorisce l'espressione anche di altre proteine cellulari e non solo di quella d'interesse di cui si vuole studiare il meccanismo citoprotettivo. Molteplici sono i derivati, quasi sempre di origine naturale, utilizzati per indurre una risposta allo stress del RE: inibitori della glicosilazione proteica (Tunicamicina), inibitori delle protein kinasi (Staurosporina) o inibitori più o meno selettivi della pompa SERCA. La risposta UPR può essere attivata in risposta a stimoli che coinvolgono l'alterazione dell'omeostasi cellulare del calcio; esistono a tale proposito vari inibitori delle pompe SERCA: oltre alla tapsigargina (Tg), che si lega alle pompe irreversibilmente e con elevata affinità, esistono il 2,5-di (terbutil)-1,4-benzoidrochinone (t-BHQ) e l'acido ciclopiazonico (CPA), i quali pur condividendo con la Tg il meccanismo d'azione, sono più idrosolubili e possono essere facilmente eliminati, rendendo quindi l'inibizione reversibile (Pizzo et al., 1997). Tra gli inibitori reversibili, con bassa affinità, della pompa Ca^{2+} di RE/Sarcoplasmatica vi è il composto naturale Curcumina (Sharma et al. 2005; Sumbilla et al. 2002; Bilmen et al. 2001). Questo polifenolo a basso peso molecolare, è tutt'oggi utilizzato nella sperimentazione clinica come farmaco antineoplastico per i suoi effetti anti-proliferativi, tessuto specifico: induce apoptosi nelle cellule tumorali, mentre proteggono le cellule sane senza avere effetti citotossici (Hanif et al. 1997). Curcumina, utilizzata a basse dosi, risulta un composto molto meno tossico di Tg o CPA, e può essere utilizzato come trattamento farmacologico senza effetti secondari che potrebbero indurre la cellula a morte. Per questo motivo un'esposizione di breve durata a Curcumina potrebbe essere utilizzata per studiarne gli effetti sull'espressione delle proteine dello stress del RE.

Per questo studio sono state utilizzate linee cellulari miogeniche (C2C12) e non (HeLa ed HEK 293), in cui l'espressione di proteine dello stress è stata indotta farmacologicamente o specificatamente mediante trasfezione stabile o transiente di cDNA. Grazie all'esperienza del laboratorio, in cui ho svolto l'attività di ricerca durante il Dottorato, sono stati privilegiati gli studi su Grp94, per la disponibilità di sonde molecolari e di cloni cellulari stabili.

4.3 Studio dei meccanismi responsabili della protezione esercitata dalle proteine dello stress, in particolare il contributo al controllo dell'omeostasi del calcio.

Obiettivo primo dello studio in vitro è stato verificare la presenza di citoprotezione in cellule sovraesprimenti Grp94 ed esposte a stimoli apoptotici .

Per indurre apoptosi è stata utilizzata Staurosporina, un alcaloide isolato dallo *Streptomyces staurosporeus*, uno dei più potenti inibitori, non selettivi, delle protein kinasi come Protein kinase C (PKC), PKA, Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK; ERK-1), Casein kinase 1 (CK1), CK2, Src (Tamaoki, Nomoto et al. 1986) (Nakano, Kobayashi et al. 1987). Staurosporina è in grado di indurre apoptosi attraverso un meccanismo misto (via mitocondriale/RE) (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003).

Il secondo obiettivo dell'analisi in vitro è stato quello di verificare la presenza di protezione antiossidante in cellule sovraesprimenti Grp94. Anche lo stress ossidativo, un disequilibrio tra la produzione di ROS e le capacità di difesa antiossidanti della cellula (Sies and Stahl 1995), riduce la sopravvivenza cellulare alterando la membrana cellulare, l'omeostasi del calcio, la funzione mitocondriale e inducendo danno al DNA. Come stimolo di stress ossidativo, verranno effettuati trattamenti delle cellule con esposizione a perossido di idrogeno (H₂O₂).

Poiché alterazioni dell'omeostasi del calcio potrebbero generare o aumentare sia la suscettibilità cellulare all'apoptosi o allo stress ossidativo, sono stati analizzati gli effetti della sovraespressione, sia stabile che transiente, di Grp94 sui livelli di calcio nel RE e sulla sua cinetica di rilascio dal RE in cellule C2C12 e in altre linee cellulari.

L'equilibrio omeostatico nella cellula è influenzato dalla concentrazione di ione Ca²⁺ sequestrato nel RE (10⁻⁴ M). La concentrazione massimale di Ca²⁺ totale nel RE è comunemente stimata pari a valori di millimolarità; tuttavia l'effettiva concentrazione di Ca²⁺ libero nel RE è molto più bassa perché questo ione è per la maggior parte legato con alta capacità, ma bassa affinità alle proteine presenti in questo compartimento cellulare. I cambiamenti nell'espressione di CRT, Grp78 e Grp94 sembrano, in vitro, influenzare la quantità e il rilascio di Ca²⁺ dal RE (Mery, Mesaeli et al. 1996; Vitadello, Ausma et al. 2001). Queste proteine sembrano esercitare un particolare ruolo nel controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ e quindi intervenire direttamente nella citoprotezione.

OBIETTIVO

Questo progetto di tesi si è focalizzato su due obiettivi principali: lo studio in vivo ed in vitro della risposta cellulare allo stress nei tessuti muscolari striati.

Lo studio in vivo ha utilizzato modelli sperimentali animali che potessero replicare condizioni umane protettive (allenamento di entità moderata) o patologiche (atrofia muscolare) per chiarire, a livello cardiaco e del muscolo scheletrico, alcune caratteristiche della risposta allo stress. In entrambi i modelli è stata valutata la presenza di modulazione delle proteine dello stress (HSP); in particolare, nonostante siano numerose le evidenze riguardanti l'espressione di Hsp70 nel muscolo scheletrico, non sono definiti in modo preciso i tipi di cellule coinvolti in questa risposta da stress nei muscoli rapidi (Liu, Gampert et al. 2006; Neuffer, Ordway et al. 1996; O'Neill, Aubrey et al. 2006). Considerate le implicazioni sulla citoprotezione che derivano dalla presenza di una risposta cellulare allo stress, questo studio si è prefissato di analizzare la distribuzione di Hsp70 nel muscolo scheletrico di ratto, sottoposto cronicamente ad allenamento di entità moderata.

Il modello sperimentale dell'atrofia muscolare da disuso è noto essere associato ad aumentata produzione di ROS. L'obiettivo è stato quello di analizzare la risposta cellulare allo stress in presenza di ossidazione delle proteine muscolari.

Lo studio degli effetti citoprotettivi delle proteine dello stress e dei meccanismi coinvolti è stato effettuato in modelli sperimentali in vitro. Sono state utilizzate linee cellulari miogeniche (C2C12) e non (Hela, HEK293), in cui l'espressione di proteine dello stress è stata indotta farmacologicamente o specificatamente mediante trasfezione stabile o transiente di cDNA. Grazie all'esperienza del laboratorio, in cui ho svolto l'attività di ricerca durante il Dottorato, sono stati privilegiati gli studi su Grp94, per la disponibilità di sonde molecolari e di cloni cellulari stabili.

Obiettivo primo dello studio in vitro è stato verificare la presenza di citoprotezione in cellule sovraesprimenti Grp94 ed esposte a stimoli apoptotici.

Il secondo obiettivo dell'analisi in vitro è stato quello di verificare la presenza di protezione antiossidante in cellule sovraesprimenti Grp94.

Poiché alterazioni dell'omeostasi del calcio potrebbero generare o aumentare sia la suscettibilità cellulare all'apoptosi o allo stress ossidativo, sono stati analizzati gli effetti della sovraespressione, sia stabile che transiente, di Grp94 sui livelli di calcio nel RE e sulla sua cinetica di rilascio dal RE in cellule C2C12 e in altre linee cellulari.

Il raggiungimento di questi obiettivi potrà fornire indicazioni preziose per comprendere meglio le funzioni svolte da alcune proteine dello stress nelle cellule muscolari, in particolare da Grp94. In caso di risultati che mostrino la presenza di protezione anti-apoptotica e anti-ossidante, questo rappresenterà la base per studi volti ad incrementarne l'espressione e per limitare lo stress ossidativo che accompagna l'insorgenza e la progressione dell'atrofia muscolare.

RISULTATI IN VIVO

1. Modulazione dell'espressione delle proteine dello stress nelle cellule muscolari striate.

L'entità della risposta è stata studiata nel miocardio e nel muscolo scheletrico.

1.1 Effetti dell'allenamento di entità moderata.

Questa prima parte del progetto ha avuto lo scopo di studiare in vivo gli effetti dell'esercizio fisico, di entità moderata, sulla modulazione dell'espressione delle proteine dello stress nelle cellule muscolari striate di ratto.

Gli animali sono stati sottoposti cronicamente ad allenamento che consisteva in una corsa su treadmill di durata breve, esattamente di 1 ora al giorno, per un totale di 14 settimane (cfr Materiali e metodi) .

L'entità della risposta è stata studiata nel miocardio e nel muscolo scheletrico.

1.1.1 Risposta nel miocardio

Il pannello 1 mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo cardiaco (cfr Materiali e metodi), evidenziando la reattività specifica per ciascuna proteina dello stress analizzata. L'espressione proteica di Hsp70 ed HO-1 risulta più elevata nei campioni ottenuti dagli animali allenati rispetto a quelli provenienti dai ratti sedentari, mentre Grp75 sembra essere meno espressa. Nessuna differenza invece è stata rilevata per Grp94 e Grp78 (Bip).

L'analisi densitometrica (cfr Materiali e metodi) e la successiva normalizzazione per i livelli di espressione della proteina miofibrillare α -actinina mostrano che per Hsp70 l'incremento è significativo (media \pm ES (Errore Standard) per il controllo (C) $0,85 \pm 0,19$ con N=8 ed allenato (A) $8,4 \pm 2,59$ con N=4; t-test $p \leq 0,01$) e corrisponde a circa nove volte i livelli presenti negli animali di controllo.

Per HO-1 l'aumento, pure significativo, (media \pm ES per C $1,11 \pm 0,06$ con N=10 e per A $1,94 \pm 0,3$ con N=7; t-test $p \leq 0,01$) è circa quasi due volte superiore rispetto ai livelli di controllo. Per Grp75 si evidenzia una lieve diminuzione del 25%, ma tuttavia significativa (media \pm ES per C $1,04 \pm 0,08$ con N=5 e per A $0,76 \pm 0,05$ con N=4; t-test $p \leq 0,05$) rispetto ai livelli di espressione degli animali di controllo (fig 1). N indica il numero degli animali studiato in ogni gruppo.

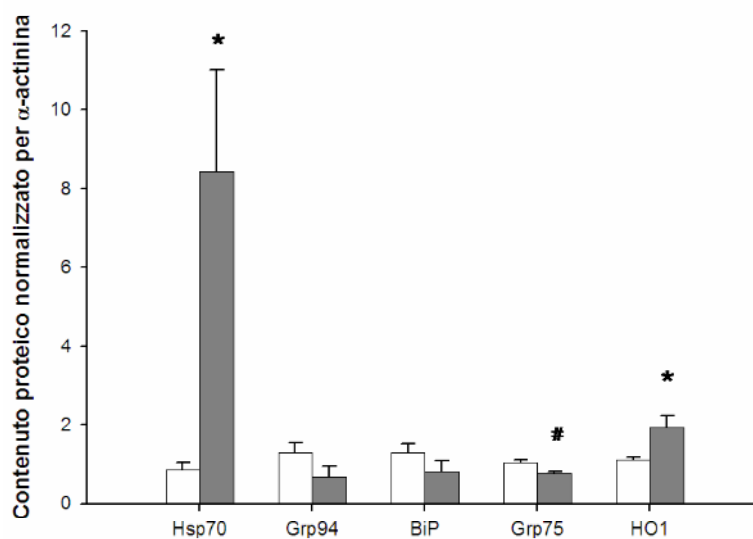
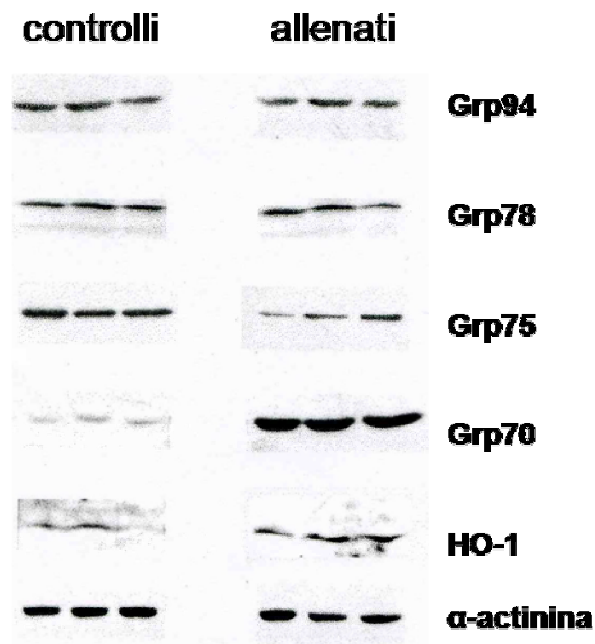


Figura 1. L'esercizio fisico di entità moderata induce un aumento dell'espressione di Hsp70 e HO-1 ed una diminuzione di Grp75 nel miocardio di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di cuore, prelevati da ratti sedentari (C) ed allenati (A). E' evidenziata la reattività con anticorpi per Hsp70, Grp94, Grp78 (Bip) Grp75 ed HO-1. La reattività per α -actinina è stata utilizzata per la normalizzazione. L'istogramma (in basso) rappresenta la valutazione semiquantitativa effettuata dopo densitometria della reattività per Hsp70, Grp94, Grp78, Grp75, ed HO-1 osservata nel gruppo sperimentale utilizzato. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio gli allenati. Il valore del T-test con * $p \leq 0,01$ e # $p \leq 0,05$ si riferisce, per ciascun gruppo, al valore del controllo sedentario corrispondente. I valori dell'istogramma sono espressi come Media \pm ES.

1.1.2 Risposta nel muscolo scheletrico

La stessa analisi è stata estesa al muscolo scheletrico. In seguito sono stati prelevati ed analizzati i muscoli soleo (SOL), tibiale anteriore (TA) e plantare (PL), di ciascun ratto sottoposto ad allenamento e dei rispettivi controlli sedentari. Questo tipo di esercizio moderato non ha portato allo sviluppo di ipertrofia muscolare scheletrica, calcolata come rapporto MW/BW (dove MW è il peso in grammi del muscolo prelevato e BW è il peso in grammi del corrispettivo ratto al momento del sacrificio), come evidenziato in tabella 1.

| Muscolo | Media \pm DS del MW/BW (10⁻³ gr) Ratti Sedentari (n=7) | Media \pm DS del MW/BW (10⁻³ gr) Ratti Allenati (n=7) |
|--------------------------|--|---|
| Soleo | 0,45 \pm 0,07 | 0,45 \pm 0,04 |
| Plantare | 0,98 \pm 0,20 | 0,98 \pm 0,28 |
| Tibiale Anteriore | 1,31 \pm 0,02 | 1,49 \pm 0,15 |

Tabella 1. Rapporto MW/BW dei muscoli posteriori di ratti sedentari ed allenati. In tabella sono mostrati i valori per l'indice di ipertrofia muscolare calcolata come rapporto MW/BW, dove MW è il peso in grammi del muscolo prelevato e BW è il peso in grammi del corrispettivo ratto al momento del sacrificio. I valori sono espressi come Media \pm Deviazione Standard (DS).

Il pannello 2 mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo soleo (cfr Materiali e metodi), evidenziando la reattività specifica per ciascuna proteina dello stress analizzata. Come si può notare l'espressione proteica per Hsp70 e Calsequestrina (Cs) varia nei campioni ottenuti dagli animali allenati rispetto a quelli provenienti dai ratti sedentari.

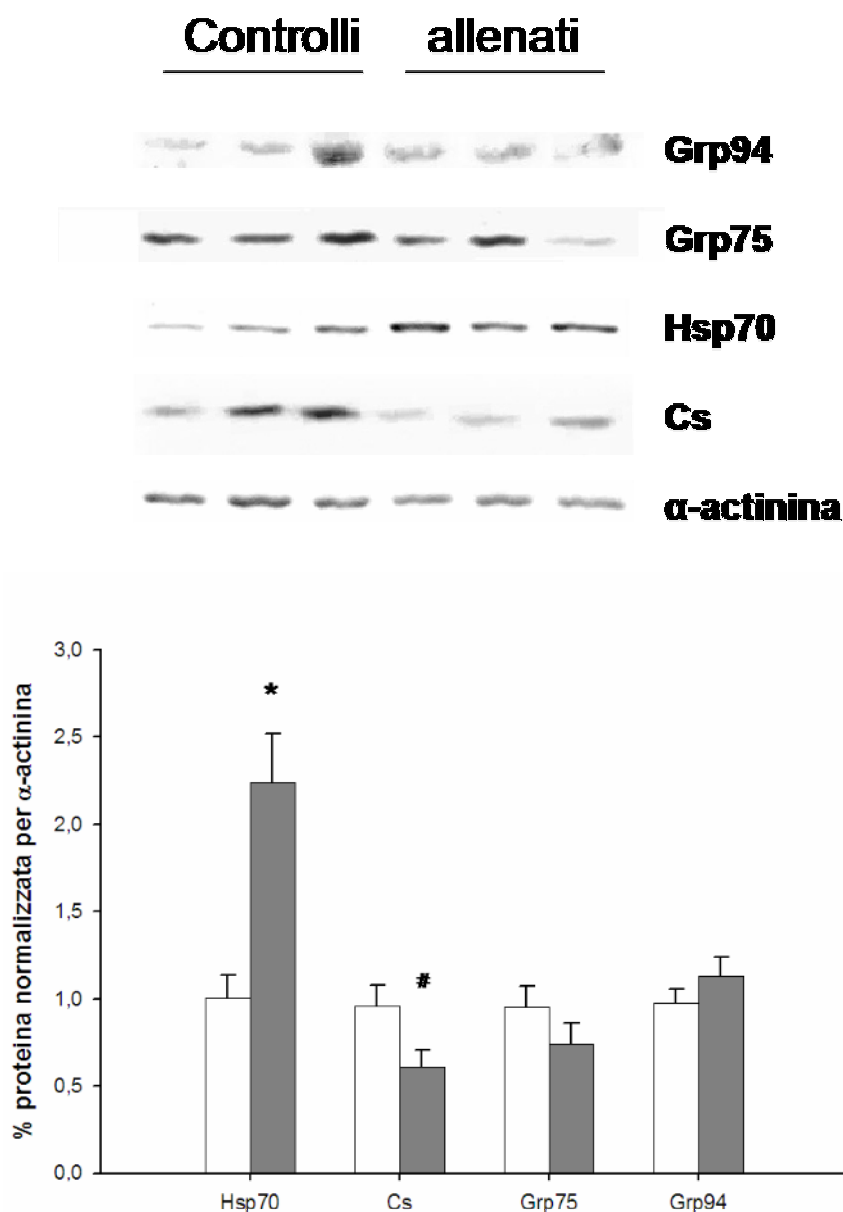


Figura 2. L'esercizio fisico di entità moderata induce un aumento dell'espressione di Hsp70 ed una diminuzione di Cs nel muscolo soleo di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di soleo, prelevati da ratti sedentari (C) ed allenati (A). E' evidenziata la reattività con anticorpi per Hsp70, Cs, Grp75, Grp94. La reattività per α -actinina è stata utilizzata per la normalizzazione. L'istogramma (in basso) rappresenta la valutazione semiquantitativa effettuata dopo densitometria della reattività per Hsp70, Cs, Grp75, Grp94 osservata nel gruppo sperimentale utilizzato. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio gli allenati. Il valore del T-test con * $p \leq 0,01$ e # $p \leq 0,05$ si riferisce, per ciascun gruppo, al valore del controllo sedentario corrispondente. I valori dell'istogramma sono espressi come Media \pm ES.

Nessuna differenza si può osservare per Grp94 e Grp75. L'analisi densitometrica e la successiva normalizzazione per i livelli di espressione della proteina miofibrillare α -actinina mostrano che per Hsp70 l'incremento è significativo (media \pm ES per il controllo (C) $1,00 \pm 0,13$ con N=7 ed allenato (A) $2,24 \pm 0,28$

con N=7; t-test $p \leq 0,01$) e corrisponde a circa due volte i livelli presenti negli animali di controllo (fig 2). Per Cs invece vi è una diminuzione significativa di circa il 40% (media \pm ES per C $0,96 \pm 0,12$ con N=7 e per A $0,60 \pm 0,10$ con N=7; t-test $p \leq 0,05$) rispetto ai livelli proteici di controllo.

Poiché l'esercizio fisico, come inoltre già dimostrato da Naito et al. (2001), induce una risposta allo stress che coinvolge la sovraespressione dell'isoforma inducibile di Hsp70 (72kDa) nei muscoli scheletrici costituiti da fibre di tipo lento (metabolismo ossidativo) come ad esempio il SOL, si è voluto studiare se tale risposta era evidenziabile anche nei muscoli scheletrici costituiti prevalentemente da fibre di tipo veloce, come plantare (PL) e tibiale anteriore (TA).

Nessuna differenza significativa dell'espressione di Hsp70 è stata riscontrata nel muscolo TA (fig 3).

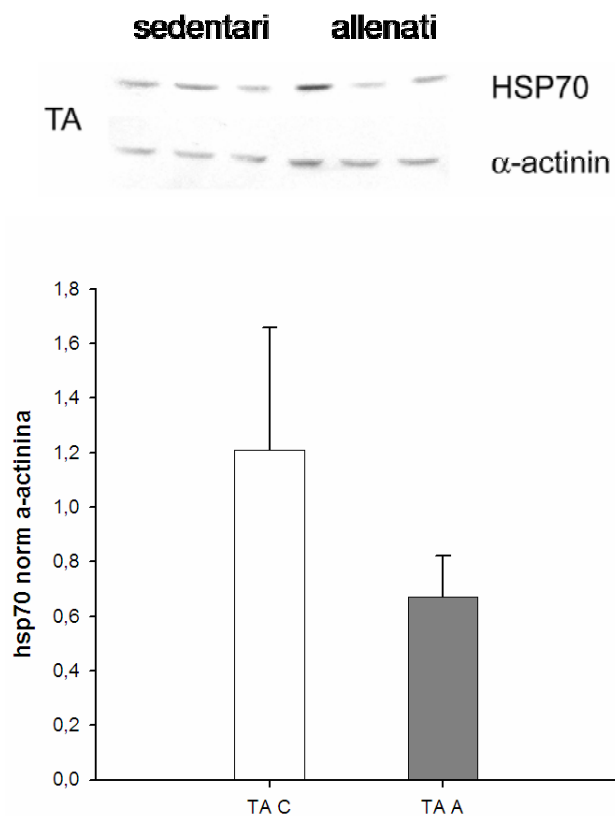


Figura 3. L'esercizio fisico di entità moderata non induce modificazioni dell'espressione di Hsp70 nel muscolo tibiale anteriore di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo TA, prelevati da ratti sedentari (C) ed allenati (A). E' evidenziata la reattività con anticorpi per Hsp70, mentre la reattività per α -actinina è stata utilizzata per la normalizzazione. L'istogramma (in basso) rappresenta la valutazione semiquantitativa effettuata dopo densitometria della reattività per Hsp70 osservata nel gruppo sperimentale utilizzato. I valori dell'istogramma sono espressi come Media \pm ES.

Il pannello 4 mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo PL, evidenziando la reattività specifica per Hsp70. L'espressione proteica è aumentata nei campioni ottenuti dagli animali allenati (PLA) rispetto a quelli provenienti dai ratti sedentari (PLC) (figura 4).

L'analisi densitometrica e la successiva normalizzazione per i livelli di espressione della proteina miofibrillare α -actinina mostrano che per Hsp70 l'incremento è significativo (media \pm ES per il controllo (C) $1,00 \pm 0,11$ con $N=8$ ed allenato (A) $5,24 \pm 1,24$ con $N=5$; t-test $p \leq 0,01$) e corrisponde a cinque volte i livelli presenti negli animali di controllo (fig 4).

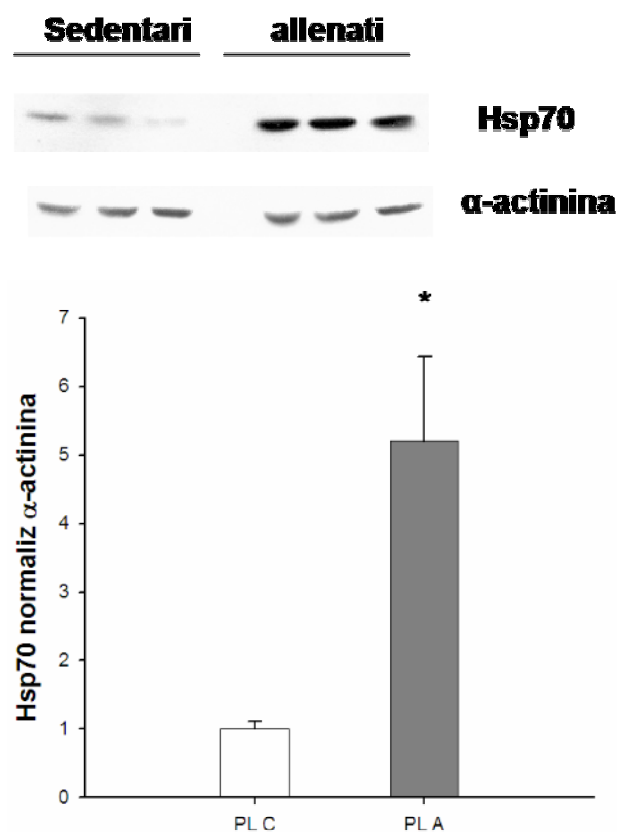


Figura 4. L'esercizio fisico di entità moderata induce un aumento dell'espressione di Hsp70 nel muscolo plantare di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo PL, prelevati da ratti sedentari (C) ed allenati (A). E' evidenziata la reattività con anticorpi per Hsp70, mentre la reattività per α -actinina è stata utilizzata per la normalizzazione. L'istogramma (in basso) rappresenta la valutazione semiquantitativa effettuata dopo densitometria della reattività per Hsp70 osservata nel gruppo sperimentale utilizzato. I valori dell'istogramma sono espressi come Media \pm ES.

Sebbene l'effettiva funzione di Hsp70 non sia ancora del tutto nota, la sua induzione nel miocardio e nel muscolo scheletrico SOL e PL, in seguito ad esercizio fisico di tipo moderato, potrebbe chiarire ulteriormente il ruolo che questa proteina chaperone ha nella risposta allo stress. Si può concludere quindi che l'allenamento di entità moderata ha un'effetto sulla modulazione dell'espressione delle proteine dello stress nelle cellule muscolari striate. Infatti nonostante il muscolo scheletrico lento di ratto esprima costitutivamente la forma inducibile della Hsp70, apparentemente in proporzione al contenuto di miosina lenta, numerosi studi indicano che i livelli di questa proteina aumentano proporzionalmente all'intensità dell'esercizio fisico svolto (Liu et al. 2006).

Lo studio pertanto ha cercato di chiarire, attraverso immunolocalizzazione (cfr Materiali e metodi), l'espressione in vivo di Hsp70 nei medesimi muscoli dei ratti sottoposti cronicamente ad esercizio fisico di entità moderata rispetto ai controlli. Le analisi immunohistochimiche condotte su sezioni criostatiche di muscolo soleo proveniente da ratti allenati e sedentari ha rivelato numerose differenze nella distribuzione della reattività (fig. 5).

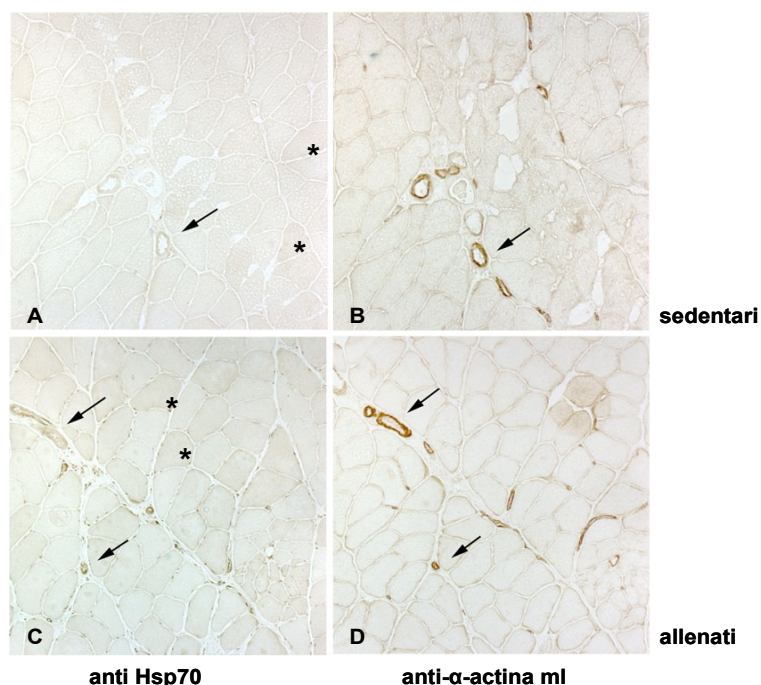


Figura 5. Immunoperossidasi indiretta di sezioni contigue di muscolo soleo. La reattività (colore marrone) per Hsp70 è debole o praticamente assente nella parete dei vasi presenti nel soleo dei ratti sedentari, mentre è presente anche nei vasi di piccolo calibro nel soleo di ratti allenati. Le frecce indicano le medesime strutture vascolari marcate sia per Hsp70, che per l'isoforma di α -actina del muscolo liscio. Gli asterischi invece indicano una debole reattività per Hsp70 in alcune fibre sia nel campione sedentario che allenato (Ingrandimento 100X).

Il muscolo soleo è composto da circa il 90% di fibre lente. Reattività debole per Hsp70 è riscontrabile in un numero variabile di queste fibre sia nell'animale sedentario che in quello allenato; viceversa reattività più intensa è riscontrabile nei vasi, in corrispondenza delle cellule muscolari lisce e dei miofibroblasti, come indicato dalla colorazione di sezioni adiacenti con anticorpi specifici per l'isoforma di α -actina del muscolo liscio (fig. 5).

Poiché precedentemente è stata dimostrata la sovraespressione di Hsp70 nel muscolo PL sottoposto ad allenamento moderato, lo studio di immunolocalizzazione in vivo è stata estesa anche a questo muscolo per determinare se la popolazione di cellule muscolari (miociti scheletrici o vascolari) fosse responsabile dell'incremento della reattività al WB, poiché l'entità della popolazione di fibre lente nel PL è decisamente piccola. La figura 6 mostra le analisi immunostochimiche condotte su sezioni criostatiche di muscolo PL, proveniente da ratti allenati e sedentari di controllo, evidenziando alcune differenze nella distribuzione della reattività.

Nei muscoli sedentari, le fibre di tipo 1 e 2A, identificate attraverso immunolocalizzazione con anticorpi specifici anti-catena pesante della miosina (MHC), rappresentano circa un terzo delle fibre del muscolo (media percentuale e errore standar (ES) delle fibre di tipo 1: $4,18 \pm 20,17$ e tipo 2A: $20,17 \pm 2,87$ con numero di muscoli considerati $N=5$ e come numero medio delle fibre valutate in campi rappresentativi per ciascun muscolo $n= 1500$). L'immunoreattività per Hsp70 risulta debole e coinvolge circa il 10% delle fibre ($9,98 \pm 1,61$, $N=5$ e $n= 1500$ come numero medio delle fibre valutate in campi rappresentativi per ciascun muscolo) che sono principalmente distribuite all'interno delle fibre di tipo 2A, benchè diverse fibre reattive sono state identificate anche nella popolazione di fibre di tipo 1 (fig 6 e 7).

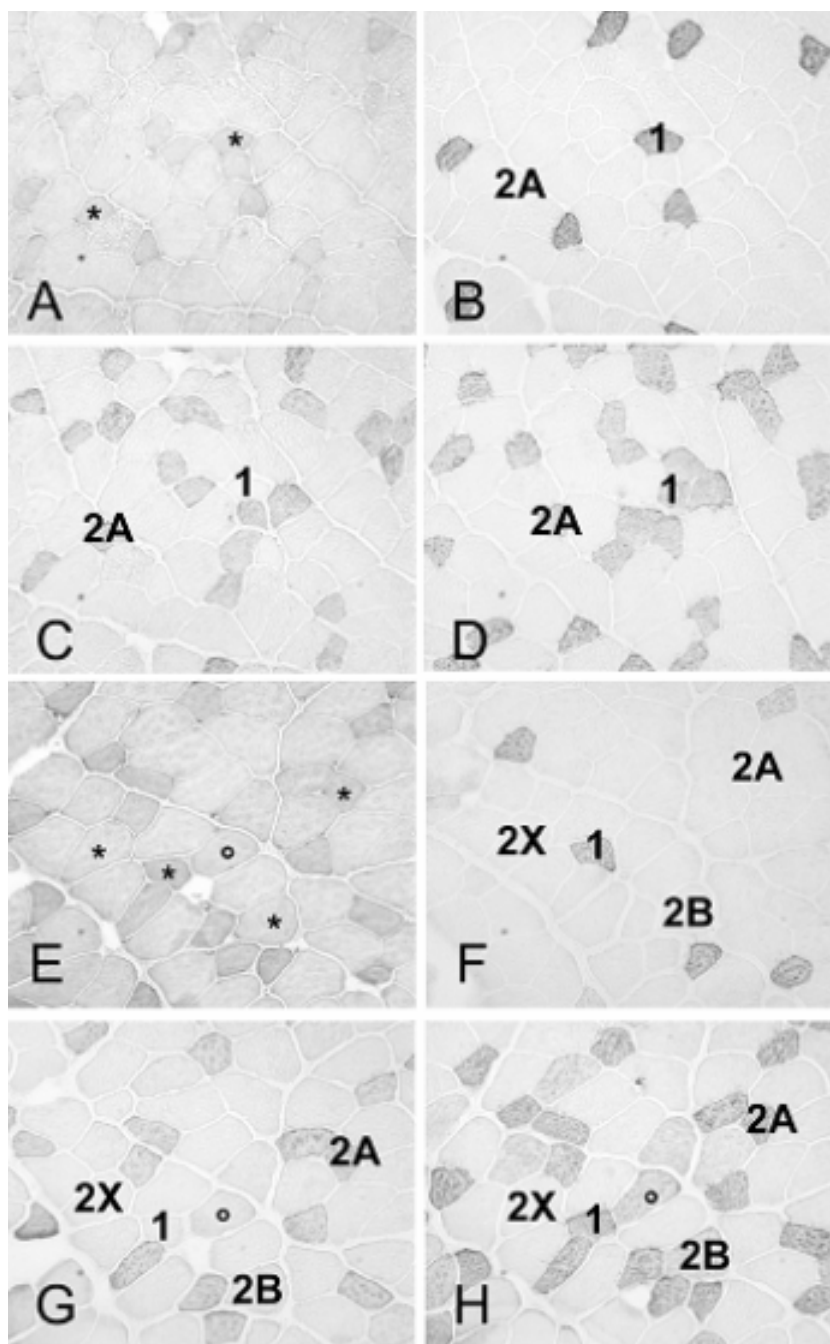


Figura 6. Immunoperossidasi indiretta di sezioni seriali di muscolo plantare allenato. Il pannello evidenzia le reattività per l'anticorpo anti-Hsp70 (A,E), BAD5 per la catena pesante della miosina lenta (MHC1) (B,F), SC-71 per la catena pesante della miosina veloce 2A (MHC2A) (B,F) e BF-35 per MHC1-2A-2B e visualizzazione negativa della catena pesante della miosina veloce 2X (D,H) in sezioni di muscolo PL di ratti sedentari (A,D) ed allenati (E,H). L'immunoreattività per Hsp70 è rilevata sia nelle fibre di tipo 1 che di tipo 2A nel muscolo sedentario e anche in una sottopopolazione di fibre 2X e 2B nel muscolo allenato (asterischi nei pannelli A ed E). Il pallino ° nei pannelli E,G ed H indica una delle diverse fibre intermedie 2A/X che sono anche marcate per Hsp70.

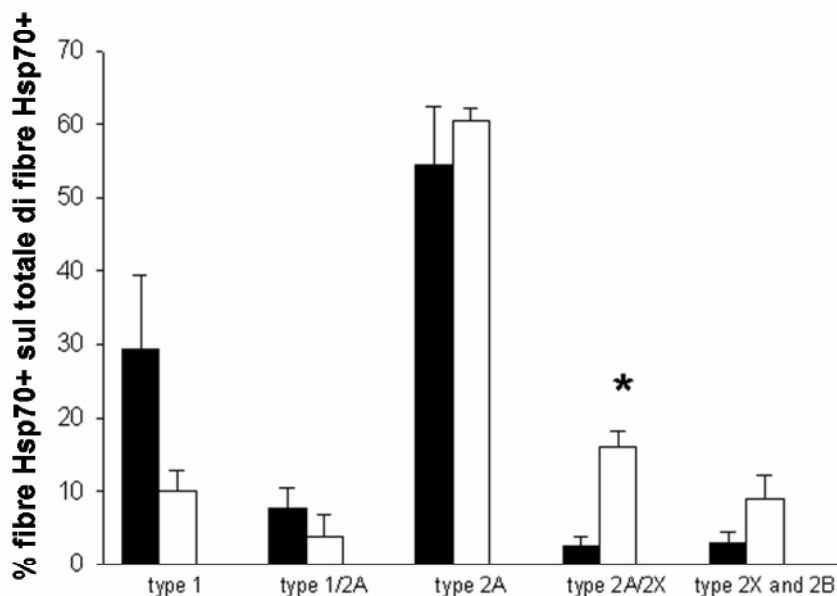


Figura 7. Percentuale di fibre Hsp70 positive rispetto al numero totale di fibre positive per Hsp70. L'istogramma mostra la distribuzione relativa delle fibre Hsp70 positive tra le diverse tipologie di fibra dei muscoli plantari sedentari (colonna bianca) e allenati (colonna nera). I valori corrispondono alla media e al ES della percentuale di fibre Hsp70 positive calcolate sul numero totale di fibre positive Hsp70. Valore t-test, * $p \leq 0,01$.

In accordo con i dati di letteratura (Abdelmalki et al., 1996; Desplanches et al., 2004), i muscoli allenati mostrano un significativo aumento nella percentuale di fibre 2A (media percentuale e errore standar (ES) delle fibre di tipo 1: $4,78 \pm 0,67$ e tipo 2A: $33,06 \pm 1,95$ con numero di muscoli considerati $N=6$ e come numero medio delle fibre valutate in campi rappresentativi per ciascun muscolo $n= 1500$. valore di t-test $p \leq 0,01$ per la percentuale di fibre di tipo 2 A nei muscoli allenati rispetto ai valori rilevati nei sedentari). L'allenamento aumenta di circa tre volte la percentuale delle fibre che mostrano immunoreattività per Hsp70 ($33,06\% \pm 1,61$ con numero di muscoli considerati $N=6$ e media del numero delle fibre contate in campi rappresentativi per ciascun muscolo $n= 1000$. Valore di t-test $p \leq 0,01$ confrontato al valore dei muscoli di controllo sedentari).

Come per i ratti sedentari la reattività è stata principalmente individuata all'interno di quelle fibre che reagiscono con variabile intensità all'anticorpo contro MHC2A e non sono reattive per MHC1 (fig 6 e 7). Tuttavia la distribuzione della reattività per Hsp70 è significativamente aumentata all'interno della popolazione di fibre intermedie 2A /2X (fig 6, vedi pallino vuoto, e 7. Valore t-test, $p \leq 0,01$). Reattività per Hsp70 è stata osservata anche in una

sottopopolazione di fibre fast non marcate con l'anti-MHC2A, corrispondente alle fibre sia 2X che 2B, benchè la percentuale di fibre positive per Hsp70 non è statisticamente diversa da quella osservata nei muscoli sedentari (fig 7). Inoltre la percentuale relativa di fibre Hsp70 positive, all'interno delle fibre di tipo 1, risulta essere inferiore nei muscoli allenati rispetto a quella rilevata nei muscoli sedentari di controllo, anche se non c'è significatività statistica ($p=0,07$).

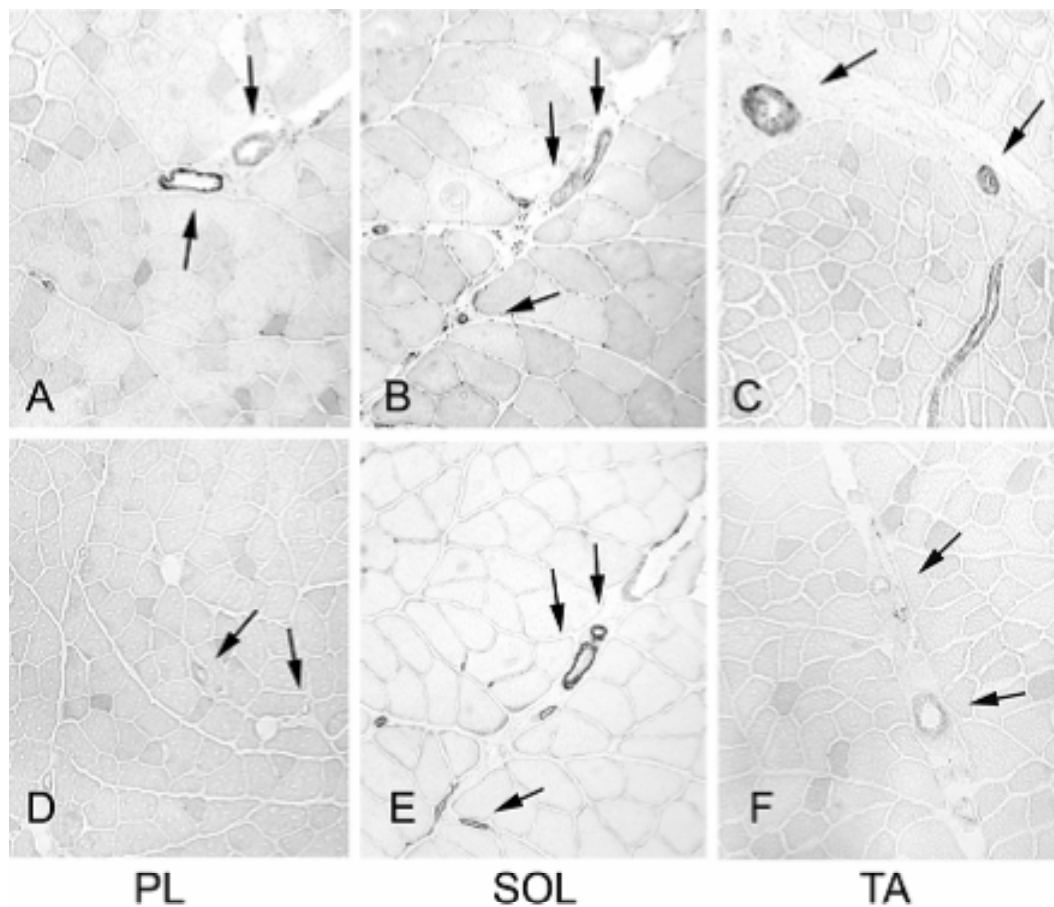


Figura 8. Immunoperossidasi indiretta di sezioni di muscolo plantare, soleo e tibiale anteriore allenato. Il pannello evidenzia le reattività per l'anticorpo anti-Hsp70 in sezioni di muscoli sedentari (D e F) ed allenati (A-C). I pannelli A e D illustrano sezioni di muscolo PL allenato e sedentario rispettivamente. I pannelli C e F illustrano sezioni di muscolo TA allenato e sedentario rispettivamente. I pannelli B ed E corrispondono a sezioni seriali adiacenti di muscolo SOL allenato, dove il pannello E evidenzia la reattività per anti α -actina liscia. Le Frecce indicano i vasi dei muscoli scheletrici.

Nel PL allenato, è stato riscontrata la presenza di un'intensa reattività per Hsp70 nella parete dei vasi (fig 8, pannello A), in corrispondenza delle cellule muscolari lisce (non è mostrata la colorazione di sezioni adiacenti con anticorpi specifici per l'isoforma di α -actina) rispetto al muscolo sedentario di controllo (fig 8, pannello D).

Come per il muscolo PL, l'entità della popolazione di fibre lente nel TA è decisamente piccola. Sebbene nel muscolo TA allenato, contrariamente a quanto rilevato nel PL, l'analisi WB non ha mostrato nessuna rilevanza né significatività circa l'aumento d'espressione di Hsp70 nel lisato cellulare totale (fig 3), piuttosto inaspettata è stata invece l'immunoreattività, per questa proteina dello stress, a livello delle pareti dei microvasi nei muscoli TA allenati rispetto ai controlli sedentari.

1.2 Effetti della riduzione del carico sul muscolo scheletrico

1.2.1 Riduzione del carico e atrofia muscolare

Il seguente studio si è focalizzato sull'analisi dell'espressione delle proteine dello stress, indotta da riduzione del carico, sul muscolo scheletrico di ratto.

Gli animali sono stati sottoposti, tramite la sospensione della coda, alla riduzione del carico da parte degli arti posteriori, per 4, 7, 14 o 21 giorni consecutivi, con lo scopo di indurre atrofia nei muscoli degli arti interessati (cfr Materiali e metodi).

In seguito sono stati prelevati i muscoli SOL, PL, EDL (Flexor Digitorum Brevis) e TA di entrambi gli arti posteriori di ciascun ratto sospeso o del rispettivo controllo sedentario ed è stata verificata la presenza o meno di atrofia muscolare.

La figure 9 e 10 riportano la percentuale di atrofia calcolata come rapporto MW/BW dei muscoli PL e SOL; solo in questi due muscoli infatti è stata riscontrata una significativa perdita della massa muscolare, mentre per EDL e TA non si evidenzia presenza di atrofia (tabella 2 pannelli A e B rispettivamente).

La percentuale di atrofia evidenzia come nel muscolo SOL (figura 9), già dopo soli 4 giorni di sospensione, vi sia una lieve, ma significativa percentuale di atrofia del 14,6% (media \pm DS per il controllo sedentario $0,45 \pm 0,03$ con N=6 e sospeso $0,38 \pm 0,045$ con N=6; t-test $p \leq 0,05$) rispetto al controllo sedentario. La percentuale di atrofia incrementa con l'aumento dei giorni di riduzione del carico: a 7 giorni si raggiunge un 27,9 % (controllo sedentario $0,45 \pm 0,07$ con N=6 e sospeso $0,32 \pm 0,03$ con N=6; t-test $p \leq 0,01$), a 15 giorni un 40,1% (controllo sedentario $0,45 \pm 0,05$ con N=6 e sospeso $0,27 \pm 0,03$ con N=6; t-test $p \leq 0,01$) e a 21 giorni la percentuale di atrofia si stabilizza e tocca il 34% (controllo sedentario $0,37 \pm 0,06$ con N=4 e sospeso $0,24 \pm 0,017$ con N=4; t-test $p \leq 0,01$) (figura 9).

| A) Muscolo EDL | Media \pm DS del MW/BW (10 ⁻³ gr) Ratti Sedentari | Media \pm DS del MW/BW (10 ⁻³ gr) Ratti sospesi |
|-------------------------|--|--|
| 7 giorni di sospensione | 0,36 \pm 0,03 | 0,38 \pm 0,09 |
| 15 gg | 0,41 \pm 0,02 | 0,42 \pm 0,03 |
| 21 gg | 0,41 \pm 0,07 | 0,33 \pm 0,1 |

| B) Muscolo TA | Media \pm DS del MW/BW (10 ⁻³ gr) Ratti Sedentari | Media \pm DS del MW/BW (10 ⁻³ gr) Ratti sospesi |
|-------------------------|--|--|
| 7 giorni di sospensione | 1,61 \pm 0,06 | 1,72 \pm 0,17 |
| 15 gg | 1,69 \pm 0,17 | 1,80 \pm 0,19 |
| 21 gg | 1,92 \pm 0,07 | 1,64 \pm 0,2 |

Tabella 2. Rapporto MW/BW dei muscoli posteriori EDL e TA di ratti sedentari e sospesi. In tabella A e B sono mostrati i valori per l'indice di atrofia muscolare per i muscoli EDL e TA rispettivamente, a 7, 15 e 21 giorni (gg) di sospensione, calcolata come rapporto MW/BW, dove MW è il peso in grammi del muscolo prelevato e BW è il peso in grammi del corrispettivo ratto al momento del sacrificio. I valori sono espressi come Media \pm Deviazione Standard (DS).

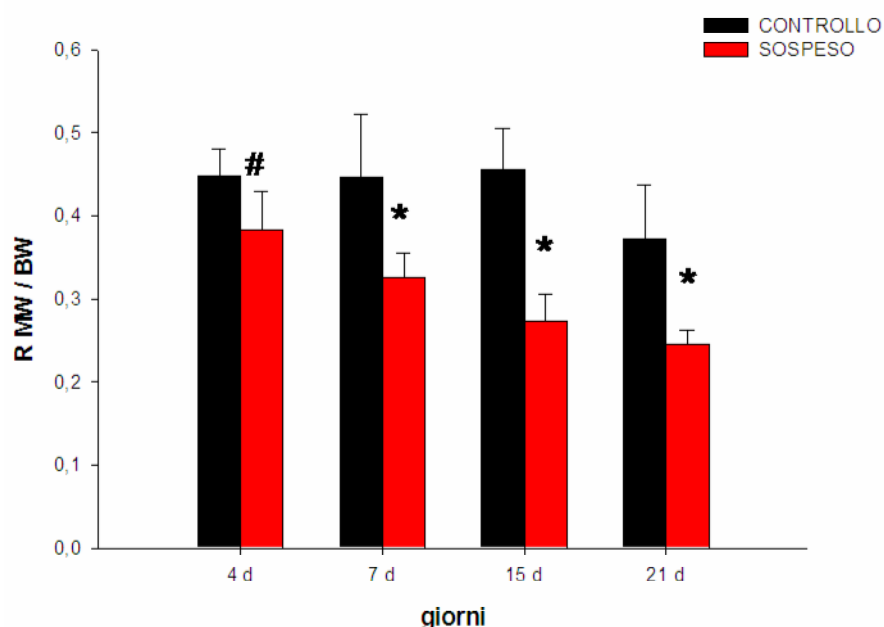


Figura 9. Percentuale di atrofia nel muscolo soleo di ratto dopo riduzione del carico. Il pannello mostra l'analisi statistica (media \pm DS) la percentuale di atrofia, come rapporto MW/BW (MW peso del muscolo prelevato e BW peso del ratto alla morte), nel muscolo soleo dopo rispettivamente 4, 7, 15 e 21 giorni (d) di sospensione (colonne in rosso) degli arti inferiori dell'animale rispetto a quelli degli animali sedentari di controllo (colonne in nero) (t-test * $p \leq 0,01$ e # $p \leq 0,05$)

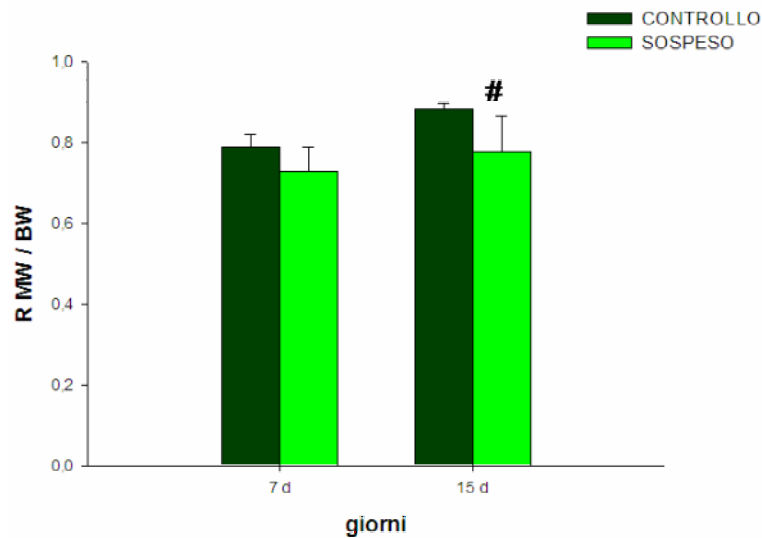


Figura 10. Percentuale di atrofia nel muscolo plantare di ratto dopo riduzione del carico. Il pannello mostra l'analisi statistica (media \pm DS) della percentuale di atrofia, come rapporto MW/BW (MW peso del muscolo prelevato e BW peso del ratto alla morte), nel muscolo plantare dopo rispettivamente 7 e 15 giorni (d) di sospensione (colonne in verde brillante) degli arti inferiori dell'animale rispetto a quelli degli animali sedentari di controllo (colonne in verde scuro). Solo a 15 giorni vi è lieve atrofia significativa (t-test # $p \leq 0,05$).

Nel muscolo PL invece una lieve atrofia è visualizzabile solo al 15 giorno di sospensione e corrisponde ad un 12% (controllo sedentario $0,88 \pm 0,014$ con $N=6$ e sospeso $0,77 \pm 0,09$ con $N=6$; t-test $p \leq 0,05$) (Figura 10).

1.2.2 Effetti sull'espressione delle proteine dello stress

L'analisi dell'entità dell'espressione delle proteine dello stress, in risposta alla riduzione del carico e in presenza di una significativa percentuale di atrofia, è stata quindi studiata nel muscolo SOL.

La figura 11 mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo SOL a 4 giorni di sospensione, evidenziando la reattività specifica per alcune proteina dello stress. Una percentuale di atrofia di circa il 14% non determina alterazione nell'espressione proteica sia di Hsp70 che di α -actinina negli animali sospesi rispetto ai controlli sedentari, sebbene ci sia una tendenza non significativa all'aumento dei livelli di Hsp70.

La figura 12 mostra invece i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo SOL a 7 giorni di sospensione. Sebbene vi sia una percentuale significativa di atrofia circa del 28%, questo non influisce

sull'espressione proteica di quasi tutte le proteine dello stress analizzate, come Hsp70, α -actinina, Bip, Grp94, Grp75, negli animali sospesi rispetto ai controlli sedentari.

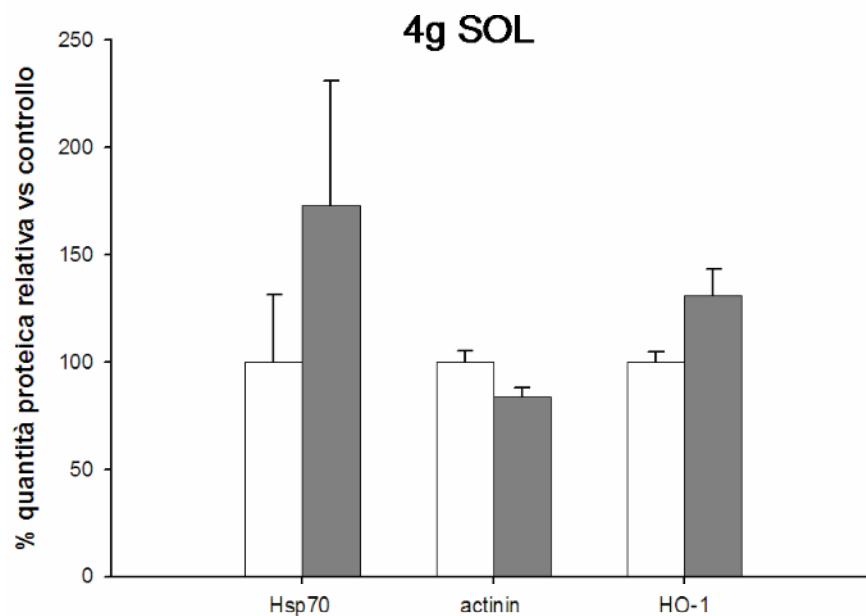
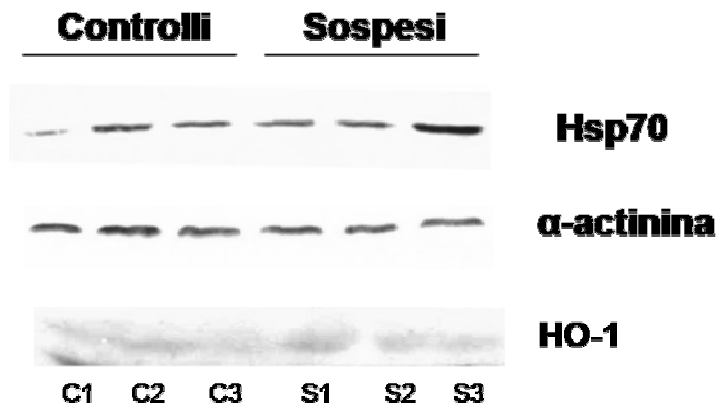


Figura 11. L'espressione di Hsp70 e α -actinina non viene alterata dopo 4 giorni di sospensione nel muscolo soleo di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo ($n = 3$) SOL, dopo 4 giorni di sospensione, prelevati da ratti sedentari (C) e sospesi (S). E' evidenziata la reattività con anticorpi per Hsp70, per α -actinina e per HO-1. L'istogramma (in basso) rappresenta l'analisi statistica (media \pm ES) della valutazione semiquantitativa effettuata attraverso densitometria per Hsp70, per α -actinina e per HO-1. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio i sospesi.

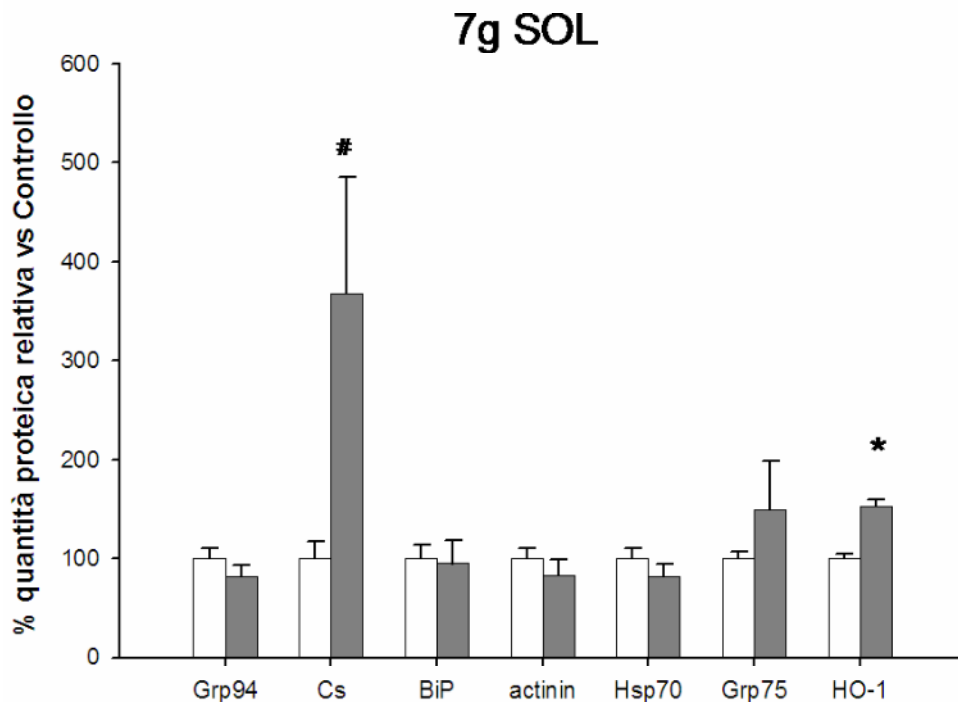
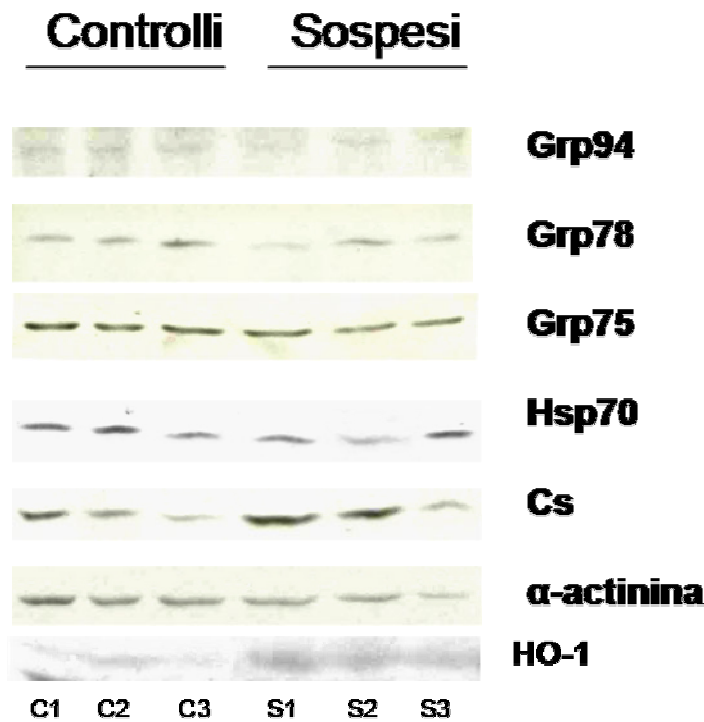


Figura 12. Modulazione dell'espressione delle proteine dello stress dopo 7 giorni di sospensione nel muscolo soleo di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo SOL dopo 7 giorni di sospensione, prelevati da ratti sedentari (C) e sospesi (S). L'istogramma (in basso) rappresenta l'analisi statistica (media \pm ES) della valutazione semiquantitativa effettuata attraverso densitometria per Grp94, calsequestrina (Cs), Grp78 (BiP), Hsp70, α -actinina, per Grp75 e per HO-1. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio i sospesi. Si noti la significatività con valore T-test * $p \leq 0,01$ e # $p \leq 0,05$.

Per HO-1 vi è un incremento significativo di circa il 50% (i valori sono espressi come media percentuale \pm ES: controllo sedentario 100 ± 9 e sospeso 153 ± 6 ; t-test $p \leq 0,01$) e anche per Cs si evidenzia un aumento significativo (controllo sedentario $100 \pm 16,6$ con $N=7$ e sospeso $367,17 \pm 118,2$ con $N=7$; t-test $p \leq 0,05$) sebbene i valori siano molto dispersi rispetto al valore dei controlli sedentari. Sembrerebbe pertanto esserci un aumento anche se non significativo dell'espressione di Hsp70, in presenza di atrofia, nel muscolo SOL dopo 7 giorni di riduzione del carico (fig 12). La figura 13 mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo SOL a 15 giorni di sospensione. Una percentuale di atrofia di circa il 40% evidenzia una modulazione della reattività specifica per alcune proteina dello stress. Si noti una diminuzione significativa dei livelli di espressione proteica relativa per Grp94 (i valori sono espressi come media percentuale \pm ES, per il controllo (C) $100 \pm 8,5$ con $N=5$ e sospeso (S) $44,7 \pm 6,3$ con $N=6$; t-test $p \leq 0,01$) di circa il 50%, per Bip (C $100 \pm 8,5$ con $N=5$ e S $68,9 \pm 12,4$ con $N=6$; t-test $p \leq 0,01$) di circa il 30% e per α -actinina (C $100 \pm 4,2$ con $N=6$ e S $40,2 \pm 3,5$ con $N=6$; t-test $p \leq 0,01$) di circa 60% nei ratti sottoposti a riduzione di carico rispetto ai controlli sedentari. Si evidenzia invece un aumento significativo della quantità proteica relativa per Cs (C $100 \pm 18,2$ con $N=6$ e S $288,8 \pm 60,3$ con $N=6$; t-test $p \leq 0,01$) quasi tre volte nei ratti sospesi rispetto ai sedentari. Mentre per Hsp70 vi è una tendenza all'aumento ma non significativa, così come per Grp75 vi è un lieve decremento nell'espressione ma senza essere significativo, tra animali sospesi e i controlli sedentari. La figura 14 invece mostra i risultati dell'analisi Western blot, effettuate su omogenato totale di muscolo SOL a 21 giorni di sospensione. Come si può notare una percentuale di atrofia di circa il 34% evidenzia alcune variazioni nell'espressione di alcune proteina dello stress. Si evidenzia un aumento significativo della quantità proteica relativa per Cs (i valori sono espressi come media percentuale C $100 \pm 9,9$ con $N=3$ e S $194,4 \pm 8,9$ con $N=4$; t-test $p \leq 0,01$) di circa due nei ratti sospesi rispetto ai sedentari. Vi è invece un decremento nell'espressione di HO-1 (C $100 \pm 4,5$ e S 42 ± 3 ; t-test $p \leq 0,01$) pari al 60% rispetto al valore di controllo. Sembra esserci una tendenza all'incremento per Grp94, Hsp70 e Bip, ma senza essere significativa, mentre proteine come α -actinina e Grp75 non presentano variazioni significative dell'espressione tra animali sospesi e controlli sedentari.

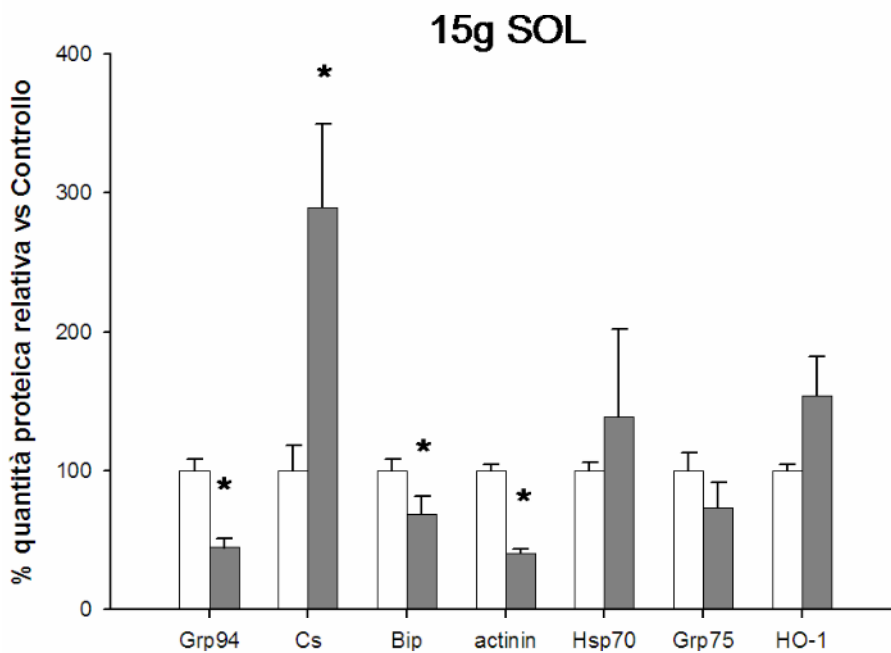
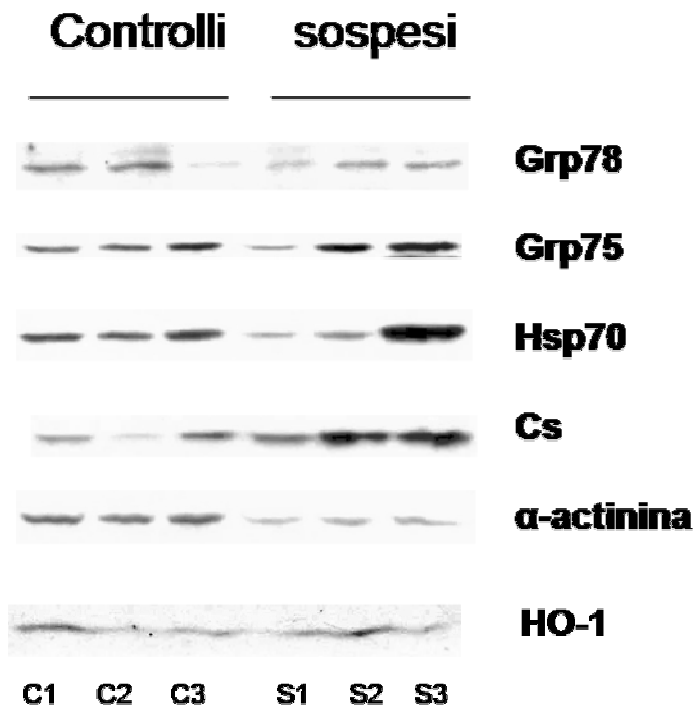


Figura 13. Modulazione dell'espressione delle proteine dello stress dopo 15 giorni di sospensione nel muscolo soleo di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo SOL dopo 15 giorni di sospensione, prelevati da ratti sedentari (C) e sospesi (S). L'istogramma (in basso) rappresenta l'analisi statistica (media \pm ES) della valutazione semiquantitativa effettuata attraverso densitometria per Grp94, calsequestrina (Cs), Grp78 (Bip), Hsp70, α -actinina, per Grp75 e per HO-1. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio i sospesi. Si noti la significatività con valore T-test $*p < 0,01$.

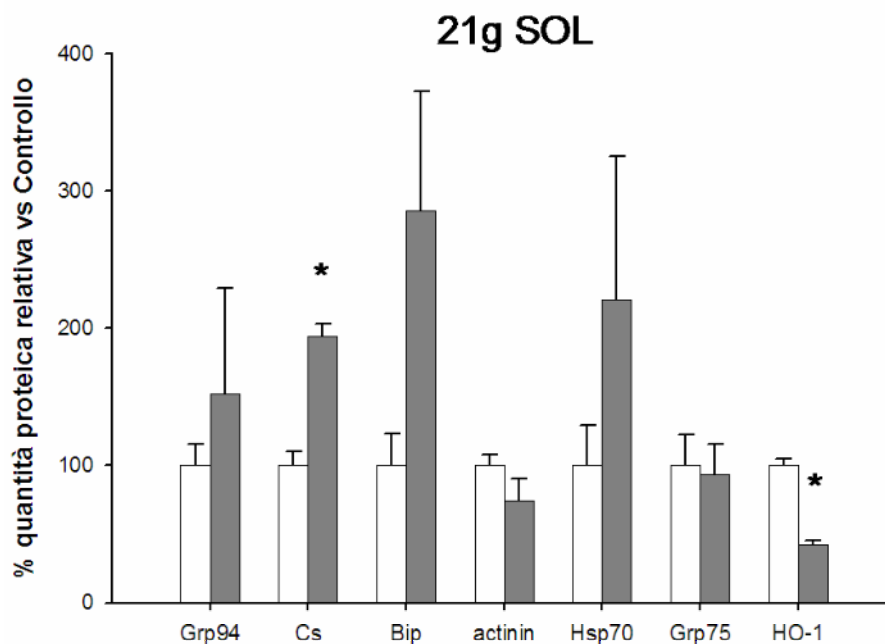
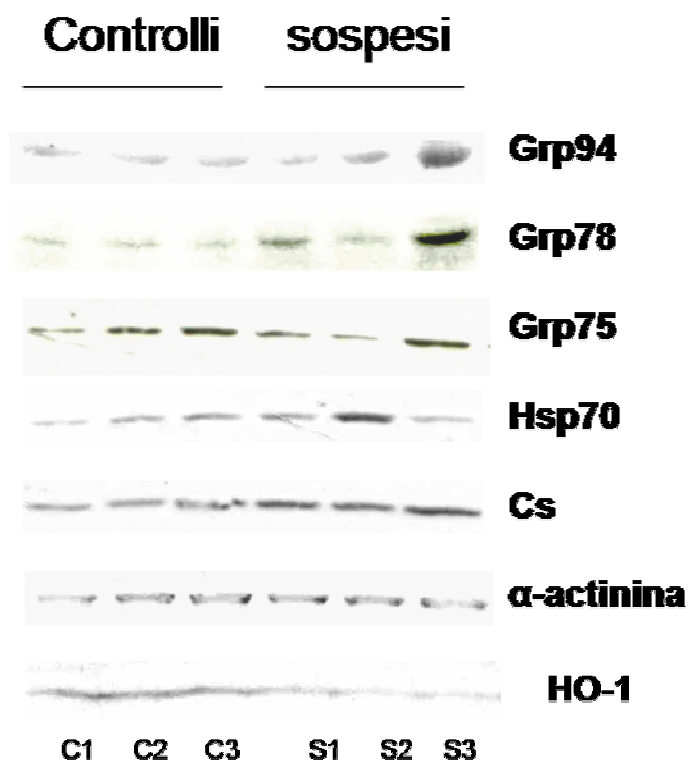


Figura 14. Modulazione dell'espressione delle proteine dello stress dopo 21 giorni di sospensione nel muscolo soleo di ratto. Western Blot (foto in alto) rappresentativo di diversi campioni di muscolo SOL, dopo 21 giorni di sospensione, prelevati da ratti sedentari (C) e sospesi (S). L'istogramma (in basso) rappresenta l'analisi statistica (media \pm ES) della valutazione semiquantitativa effettuata attraverso densitometria per Grp94, calsequestrina (Cs), Grp78 (Bip), Hsp70, α -actinina, Grp75 e per HO-1. Le colonne in bianco rappresentano i controlli sedentari mentre le colonne in grigio i sospesi. Si noti la significatività con valore T-test $*p \leq 0,01$.

In figura 15, è stato riassunta graficamente la variazione dell'espressione delle diverse proteine dello stress studiate dopo 1, 4, 7, 15 e 21 giorni di sospensione del muscolo SOL. In modo particolare si noti un transiente, ma significativo aumento dei livelli di espressione HO-1 dopo 7 giorni di sospensione in presenza di atrofia muscolare, che si mantiene costante a 15 giorni, per poi subire un brusco decremento a 21 giorni di sospensione rispetto ai controlli sedentari.

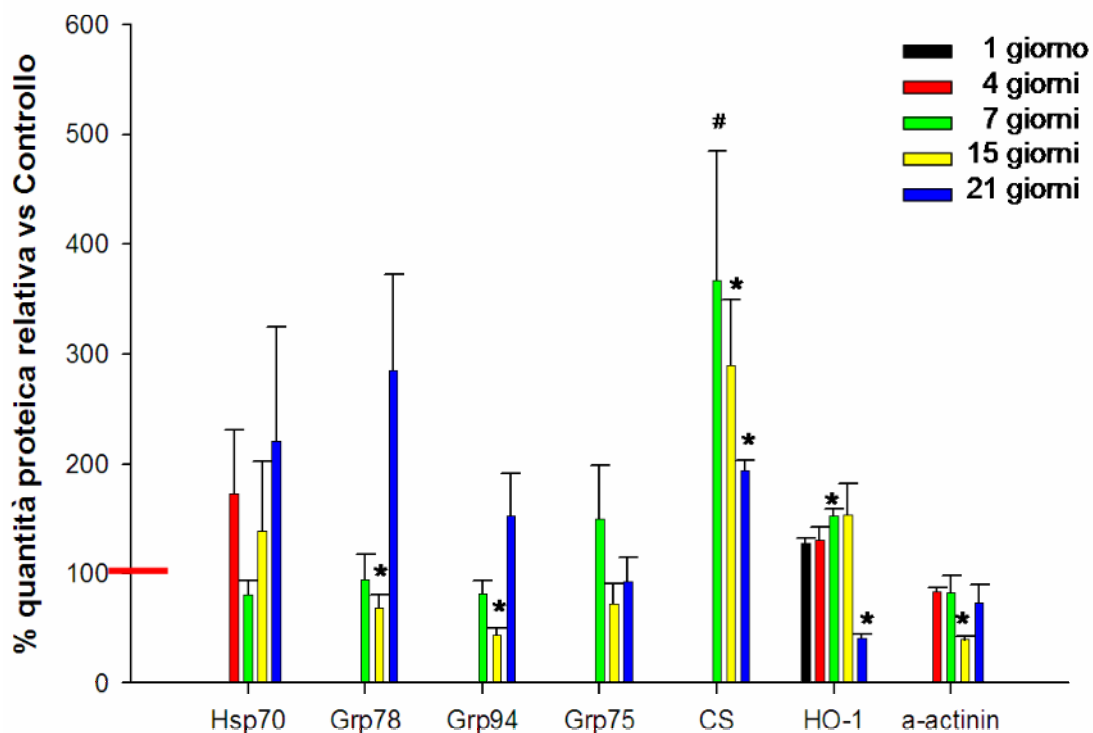


Figura 15. Confronto dell'espressione proteica tra le diverse proteine dello stress dopo diversi giorni di sospensione nel muscolo soleo di ratto. L'istogramma rappresenta l'analisi statistica (media \pm DS) della valutazione semiquantitativa, effettuata attraverso densitometria, della reattività per le diverse proteine dello stress (Hsp70, Grp78, Grp94, Grp75, Cs, HO-1 e α -actinina) dopo 1,4,7,15 e 21 giorni di sospensione. I valori normalizzati rispetto al valore di controllo (100%). Si noti la significatività con valore T-test * $p \leq 0,01$ e # $p \leq 0,05$.

1.2.3 Effetti sull'ossidazione delle proteine muscolari

Si ipotizza che l'alterazione dell'omeostasi del calcio porti all'aumento dei radicali liberi (ROS) nella cellula e che questo evento possa essere una delle cause di uno stato patologico come l'atrofia muscolare (Hunter et al. 2001; Powers et al. 2007; Muller et al. 2007).

È noto che la riduzione del carico muscolare induce nella cellula una diminuzione della sintesi proteica a livello trasduzionale e che si riflette anche, come precedentemente dimostrato in questo studio, in una transitoria sottoregolazione dell'espressione di alcune proteine dello stress, come Grp94 e Grp78, che solitamente esercitano il loro ruolo citoprotettivo come proteine chaperone. Tuttavia l'ipotesi di questo studio propone che una iniziale risposta cellulare allo stress ossidativo, secondario al disuso del muscolo scheletrico, possa contrapporsi e ritardare la progressione dell'atrofia. Questa precoce risposta sembra essere caratterizzata dalla sovraregolazione di geni legati alla difesa antiossidante nella cellula. A tale proposito l'enzima HO-1 sembrerebbe avere questa funzione; inoltre un aumento significativo dell'espressione di questa proteina si manifesta a 7 giorni di sospensione nel muscolo atrofico ed è noto in letteratura che l'isoforma inducibile HO-1 viene indotta in risposta a stress come lo stress ossidativo o l'ipossia (Keyse and Tyrrell 1987).

È stato quindi valutato lo stato di ossidazione generale delle proteine dei medesimi muscoli SOL sottoposti a 1, 4 e 7 giorni di riduzione del carico (U) e muscoli di controllo (C) attraverso analisi Oxiblot (cfr Materiali e metodi).

La figura 16 mostra i risultati di tale analisi, rivelando un significativo incremento nell'ossidazione delle proteine totali nel muscolo sospeso, già rilevabile dopo solo 1 giorno di sospensione, e che tende ad aumentare a 4 e, in seguito, a 7 giorni rispetto ai muscoli dei ratti sedentari di controllo.

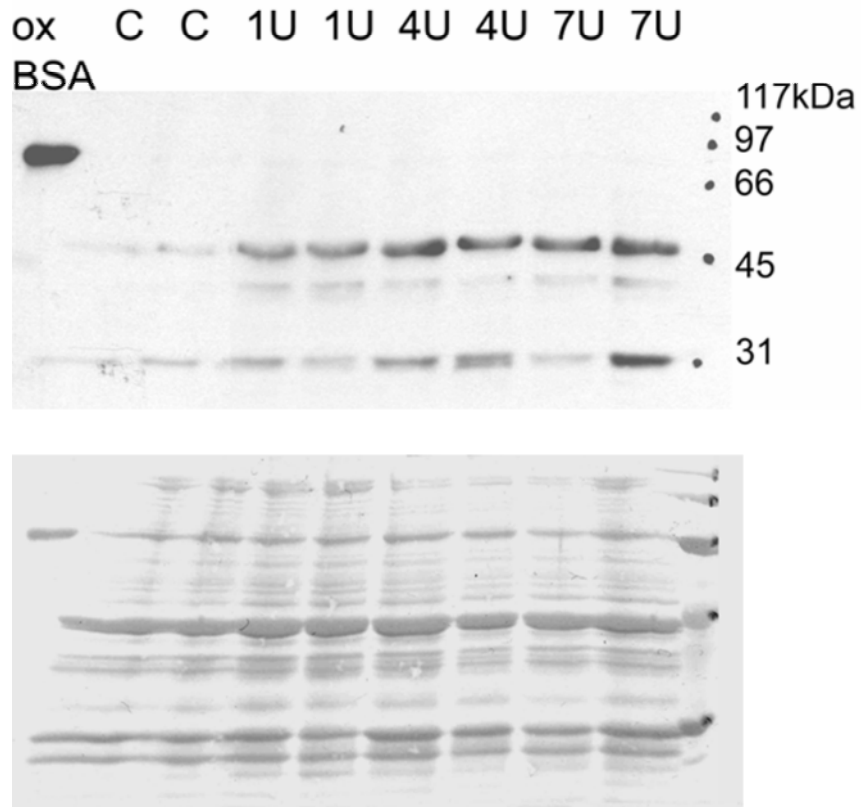


Figura 16. L'induzione di atrofia nel muscolo soleo mostra un'aumentata ossidazione proteica totale attraverso analisi Oxyblot. Il blot in alto ed il corrispondente ponceau red in basso mostrano un tipico esempio di analisi oxyblot. I campioni di muscolo soleo sottoposti a 1, 4 e 7 giorni di sospensione (U) mostrano un aumento nei livelli di ossidazione delle proteine totali rispetto al controllo (C). Come controllo positivo, indice dell'avvenuta reazione di ossidazione, è stata usata della BSA ossidata (primo pozzetto a sinistra del blot).

DISCUSSIONE

In questo progetto di tesi è stata studiata la risposta cellulare allo stress nei tessuti muscolari striati utilizzando modelli sperimentali, *in vivo* ed *in vitro*, allo scopo di comprendere meglio i meccanismi molecolari coinvolti.

La risposta allo stress è stata indotta e studiata in modelli animali (il ratto) replicando condizioni umane con effetto protettivo (allenamento aerobico) o patologico (atrofia muscolare). Lo studio degli effetti citoprotettivi e dei meccanismi coinvolti è stato effettuato utilizzando modelli *in vitro*, che consentono di modulare, in modo più controllato e specifico, i livelli di espressione delle proteine dello stress nella cellula. La valutazione del loro contributo alla protezione anti-apoptotica, anti-ossidante e al controllo dell'omeostasi del calcio potrà fornire indicazioni utili per chiarire le funzioni svolte da alcune di queste proteine nelle cellule muscolari, in particolare da parte di Grp94. Questo approccio ha rappresentato la base per studi volti ad incrementarne l'espressione proteica e per limitare lo stress ossidativo che accompagna l'insorgenza e la progressione dell'atrofia muscolare.

Nel modello *in vivo* è stata evidenziata una variazione di espressione di alcune proteine dello stress, mentre nel modello *in vitro* tale variazione è stata indotta farmacologicamente, sottolineando come l'espressione di queste proteine dipenda dalla tipologia di stress a cui le cellule sono sottoposte.

L'esercizio fisico è un evento preconditionante perché, in seguito a pre-esposizione a stimoli stressanti di durata ed entità moderata, è in grado di indurre una resistenza cellulare transitoria nei confronti di un insulto secondario più grave (Bolli 2000). L'intensità e la durata dell'esercizio fisico sembrano essere fattori chiave per indurre una risposta protettiva allo stress. L'esercizio di elevata intensità, che può essere di tipo acuto (di breve durata, minuti) o cronico (allenamento di lunga durata, diverse settimane), induce l'espressione di diverse proteine dello stress e di enzimi ossidativi nel muscolo scheletrico, cardiaco e nel fegato (Salo et al. 1991).

L'esercizio acuto induce nel miocardio una rapida (dopo 40 minuti di esercizio) attivazione di HSF rispetto ai controlli sedentari (Locke et al. 1990, 1995). Anche

nel muscolo scheletrico (SOL, EDL) e nel fegato, dopo appena 30-60 min di esercizio, si rilevano, rispetto ai muscoli di controllo, livelli massimali, ma transitori del trascritto per Hsp70 (mRNA) che ritornano a valori basali solo dopo 6 ore dal termine dell'esercizio fisico (Salo et al. 1991).

Se l'esercizio acuto è indice di una iniziale ed immediata risposta allo stress, gli effetti dell'allenamento cronico ad elevata intensità inducono invece una risposta protettiva che, rispetto all'esercizio acuto, non è transitoria, ma si mantiene nel tempo, indicando un prolungato adattamento cellulare allo stress: un aumento dell'espressione di Hsp70, in modo significativo nel SOL e nei ventricoli dei ratti allenati rispetto ai controlli, viene rilevata anche dopo 48 ore dal termine dell'ultima sessione di esercizio (Samelman et al. 2000).

Solo recentemente in letteratura sono stati indagati gli effetti dell'esercizio cronico di entità moderata. Il protocollo sperimentale utilizzato in questa tesi ha previsto che gli animali venissero sottoposti ad esercizio cronico di lieve intensità: non è infatti stata rilevata ipertrofia sia a livello del muscolo scheletrico sia di quello cardiaco. L'ipertrofia muscolare o il danno tissutale, in termini di apoptosi o infiammazione localizzata (Marini, Lapalombella et al. 2007) che normalmente sono indotti da un esercizio troppo intenso, propongono invece l'allenamento di lieve intensità un modello per indurre ugualmente una risposta protettiva allo stress, ma senza tali effetti secondari.

L'esercizio fisico, come è stato ampiamente documentato, induce pertanto un aumento di espressione di Hsp70 nelle cellule cardiache (Lennon, Quindry et al. 2004; Moran, Delgado et al. 2004), risultato da noi confermato anche in condizioni di esercizio moderato con un aumento di circa 8 volte i livelli di Hsp70 nel cuore.

La risposta protettiva allo stress si riflette in termini di cardioprotezione nei confronti dell'evento ischemico. Alcuni degli stessi animali sottoposti al protocollo di allenamento di entità moderata sono stati successivamente sottoposti ad ischemia/riperfusione in cui è stata riscontrata una riduzione del 12% dell'area infartuata nei cuori degli animali allenati rispetto ai controlli sedentari (Marini, Lapalombella et al. 2007; Bolli 2000; Lennon et al. 2004; Moran et al. 2004). Tali effetti sono paragonabili a quanto si verifica in condizioni di attività fisica di

maggior intensità (Powers, Lennon et al. 2002; Freimann, Scheinowitz et al. 2005; Strom, Aplin et al. 2005).

L'allenamento di entità moderata induce anche nel muscolo scheletrico, SOL di ratto, un incremento significativo, di circa 2,5 volte, dell'espressione di Hsp70 (isoforma inducibile) rispetto al controllo sedentario coerentemente a quanto già presentato in letteratura (Noble, Ho et al. 2006).

La risposta allo stress *in vivo* in seguito ad allenamento fisico, anche di entità moderata, colloca Hsp70 come una delle proteine chiave e principali ad essere coinvolte in questa risposta protettiva.

L'importanza delle proteine dello stress nella prevenzione dei disagi cardiovascolari sembra coinvolgere l'inibizione all'apoptosi (Siu, Bryner et al. 2004) e la modulazione dell'omeostasi del calcio (Liu, Gampert et al. 2006), tuttavia la protezione conferita da Hsp70 potrebbe non essere sufficiente per spiegare l'aumento alla tolleranza nei confronti del danno cardiaco (Ronchi, Marano et al. 2004) e potrebbe richiedere invece lo studio di attività enzimatiche.

Lo stress ossidativo nella cellula può generare una risposta allo stress, a causa dell'accumulo, nel lume del RE, di proteine non correttamente ripiegate, che può attivare la risposta UPR con il conseguente aumento dell'espressione delle proteine chaperone di RE.

A tale proposito è stata studiata la modulazione dell'espressione di alcune proteine direttamente implicate nella risposta antiossidante come per esempio HO-1 (Yet, Tian et al. 2001), una proteina indotta da stress ossidativo e membro della famiglia delle HSP (Morita, Perrella et al. 1995; Ryter, Alam et al. 2006) (Borger and Essig 1998). Durante l'attività fisica si verifica un aumento del consumo di ossigeno che può essere causa dell'incremento di specie reattive (ROS) nella cellula (Ji 2002). L'aumento dei livelli di HO-1, nei lisati di cuore dei ratti sottoposti ad esercizio di entità moderata, indica come la cellula risponda allo stress mediante l'aumento delle difese antiossidanti. La presenza di un'alta concentrazione di MDA, un marcatore indice di stress ossidativo, nel sangue dei ratti allenati conferma questa ipotesi (Marini, Lapalombella et al. (2007). In letteratura inoltre è stato infatti dimostrato come la sovraespressione di HO-1 abbia un effetto citoprotettivo a livello cardiaco in seguito ad ischemia

/riperfusion (Pachori, Smith et al. 2007) o durante l'atrofia muscolare (Hunter, Mitchell-Felton et al. 2001).

Il modello sperimentale dell'atrofia muscolare è noto essere associato ad aumentata produzione di ROS. Esistono evidenze che associano a questa patologia un aumento del danno ossidativo nei miociti (Kondo, Nishino et al. 1994). L'evidenza effettiva che associa all'atrofia muscolare il progressivo instaurarsi dello stress ossidativo è stata dimostrata utilizzando l'Oxiblot che consente di valutare lo stato di ossidazione generale delle proteine. Il significativo aumento dell'ossidazione proteica totale nei muscoli SOL, sottoposti a 1, 4 e 7 giorni di riduzione del carico, conferma ulteriormente i dati presenti in letteratura. Lo stress ossidativo quindi sembra essere uno degli eventi chiave, scatenanti la patologia, che si manifesta già dal primo giorno di induzione dell'atrofia e che gradualmente aumenta con l'aggravarsi dello stato patologico.

Nel nostro modello sperimentale di atrofia muscolare da disuso si evidenzia una progressiva, ma transitoria sovraregolazione dell'isoforma inducibile HO-1, che è noto essere indotta in risposta a stimoli di stress ossidativo o in seguito ad ipossia (Keyse and Tyrrell 1987). L'espressione di HO-1 raggiunge valori massimi significativi a 7 giorni di riduzione del carico muscolare nel SOL, in cui si rileva una percentuale di atrofia del 28%, mantenendosi costante nel tempo, per poi subire un brusco decremento in tarda fase atrofica (21 giorni di sospensione degli arti). L'incremento del danno ossidativo potrebbe accelerare la degradazione proteica, infatti le proteine soggette ad ossidazione sono più suscettibili alla proteolisi; nel muscolo SOL, inoltre, una protratta inattività muscolare, determina una progressiva distruzione delle difese antiossidanti inibendo l'espressione di enzimi quali SOD e GSH (Lawler, Song et al. 2003).

Tuttavia la precoce e transitoria induzione di HO-1 induce a ipotizzare che una tale risposta cellulare possa contrapporsi e ritardare la progressione dell'atrofia con effetti citoprotettivi nei confronti dello stress ossidativo. Già in letteratura sono presenti evidenze di sovraregolazione di geni legati alla difesa antiossidante nell'evento atrofico (Stevenson, Giresi et al. 2003): i ROS possono attivare molteplici vie di trasduzione del segnale, inducendo l'espressione di enzimi antiossidanti e modulando l'attività dei complessi respiratori mitocondriali (Radak, Sasvari et al. 2000; Smolka, Zoppi et al. 2000).

Risposta protettiva allo stress ossidativo è stata dimostrata anche *in vitro*. Come riportato in letteratura, in cellule epiteliali di rene, dopo una prima esposizione ad agenti ossidanti o riducenti (DTT), ad inofori del calcio (A23187) o ad inibitori della pompa SERCA (tapsigargina), è stato rilevato un aumento di espressione di alcune proteine dello stress di RE, quali Grp78, Grp94 e crt, che hanno reso le cellule resistenti all'apoptosi in seguito a seconde esposizioni di maggior intensità ai medesimi agenti (Liu, Bowes et al. 1997; Liu, Miller et al. 1998).

Gli effetti citoprotettivi e i meccanismi coinvolti nella risposta allo stress di RE possono essere studiati inducendo l'espressione delle proteine dello stress farmacologicamente, ne è un esempio Curcumina. Questo polifenolo (Sharma et al., 2005) è infatti un inibitore reversibile, con bassa affinità, della pompa Ca^{2+} di RE/ Sarcoplasmatica SERCA (Sumbilla et al. 2002; Bilmen et al. 2001) e sembra inibire l'attivazione di Nf-kb e la conseguente trasduzione del segnale che porta alla degradazione proteica via proteosoma/ubiquitina (Wyke et al. 2006; Jin and Lin 2007). L'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} così come l'accumulo di proteine nella cellula sembrano determinare una specifica risposta cellulare allo stress di RE (Bakhshi J, et al. 2008). Tuttavia il pretrattamento con curcumina sembra non indurre una risposta allo stress citosolica: l'espressione di Hsp70 non viene influenzata, ma se somministrata contemporaneamente in condizioni di shock termico, ne potenzia l'espressione (Kato et al. 1998).

Nonostante siano numerose le evidenze riguardanti l'espressione di Hsp70 nel muscolo scheletrico, non sono stati mai definiti in modo preciso i tipi di cellule coinvolti in questa risposta da stress nei muscoli rapidi (Liu, Gampert et al. 2006; Neuffer, Ordway et al. 1996; O'Neill, Aubrey et al. 2006). Considerate le implicazioni sulla citoprotezione che derivano dalla presenza di una risposta cellulare allo stress, questo studio si è prefissato di analizzare la distribuzione di Hsp70 nel muscolo scheletrico di ratto, sottoposto cronicamente ad allenamento di entità moderata.

L'analisi dell'espressione delle proteine dello stress evidenzia un aumento significativo dei livelli di Hsp70 nei muscoli scheletrici costituiti da fibre di tipo lento (metabolismo ossidativo) come il SOL (Naito, Powers et al. 2001), coerentemente a quanto riportato in letteratura (Kelly et al. 1996; Samelman, 2000;

Desplanches et al. 2004; Noble et al. 2006; Liu et al. 2006). Nonostante il muscolo scheletrico lento di ratto, come il SOL (composto da circa il 90% di fibre lente), esprima costitutivamente la forma inducibile di Hsp70, apparentemente in proporzione al contenuto di miosina lenta (Locke, Noble et al. 1991); Kelly et al. 1996), numerosi studi indicano che i livelli di questa proteina aumentano proporzionalmente all'intensità dell'esercizio fisico svolto (Liu et al. 2006).

Per verificare l'ipotesi che mette in relazione l'espressione di Hsp70 alla transizione fenotipica delle fibre muscolari, è stata esaminata una condizione di stress che influisce sul fenotipo delle fibre muscolari. Poiché già diverse evidenze dimostrano come l'immunoreattività per Hsp70 sia associata alla transizione delle miofibre da veloci a lente, questo studio invece ha preso in considerazione come modello sperimentale l'allenamento, che coinvolge transizioni della composizione in fibre verso il fenotipo rapido (Kelly et al., 1996; Abdelmalki et al., 1996; Desplanches et al., 2004).

L'analisi è stata estesa in quei muscoli costituiti prevalentemente da fibre di tipo rapido, come il PL e TA, evidenziando sovraespressione dell'isoforma inducibile di Hsp70 (72kDa). I dati dimostrano che la risposta allo stress si verifica prevalentemente nei muscoli che possiedono un ruolo dinamico durante la corsa, SOL e PL, mentre è apparentemente assente nei muscoli, come il TA, che esibiscono principalmente un'attività muscolare di tipo tonico (Jasmin and Gisiger 1990). Sebbene l'effettiva funzione di Hsp70 non sia ancora del tutto nota, la sua induzione nel miocardio e nel muscolo scheletrico, in seguito ad esercizio fisico moderato, potrebbe chiarire ulteriormente il ruolo citoprotettivo che questa proteina chaperone ha nella risposta allo stress.

Nei muscoli allenati, l'immunoreattività per Hsp70 è stata rilevata nelle cellule muscolari lisce dei vasi e in una più ampia popolazione di miofibre di tipo veloce rispetto ai muscoli dei controlli sedentari.

Per capire il possibile meccanismo responsabile della distribuzione di Hsp70 nelle miofibre del muscolo scheletrico, la transizione fenotipica delle fibre potrebbe quindi avere un ruolo importante. Coerentemente ai dati di letteratura (Abdelmalki et al. 1996), l'esercizio fisico moderato induce un significativo aumento nella popolazione di fibre di tipo 2A, indicando che una transizione delle fibre si verifica all'interno della popolazione delle fibre veloci. Diversamente da quanto è

stato descritto per la transizione delle fibre, da veloci a lente, nel PL di ratto sottoposto a sovracarico (O'Neill et al. 2006), la percentuale di miofibre positive per Hsp70 significativamente aumenta dopo allenamento fisico e si distribuisce all'interno di distinte sottopopolazioni di miofibre. In particolare è stato osservato che la percentuale di fibre Hsp70-positive in relazione al numero totale di fibre positive per Hsp70, rilevate all'interno della popolazione 2A, o in quella intermedia 2A/2X o nella sottopopolazione di tipo 2X e 2B, significativamente aumenta nei muscoli allenati, rispetto ai muscoli sedentari. Una simile distribuzione è stata osservata anche nel muscolo TA di coniglio dopo stimolazione cronica a bassa frequenza (Neufer et al., 1996), suggerendo che l'espressione delle proteine dello stress potrebbe essere legata all'aumento della richiesta di sintesi proteica nelle miofibre interessate alla transizione fenotipica. Le miosine miofibrillari nascenti infatti richiedono la presenza del complesso costitutivo di chaperoni Hsc70-Hsp90 per l'assemblaggio e la maturazione delle miofibrille nei mioalsti e nei miotubi del muscolo scheletrico (Srikakulam and Winkelmann 2004); inoltre non è da escludere che l'isoforma Hsp70 indotta dallo stress potrebbe essere direttamente coinvolta in questo processo.

Sebbene la transizione delle fibre, da veloci a lente, nel PL di ratto sottoposto a sovracarico, dimostri che l'inibizione della trascrizione del gene codificante per la miosina di tipo 1 (MHC1), attraverso esposizione ad elevata concentrazione dell'ormone della tiroide, impedisce la sovraregolazione di Hsp70 (O'Neill et al., 2006); questo risultato, che associa l'espressione di Hsp70 con quella di MHC1, può essere messo in dubbio in base all'evidenza che, per il medesimo modello di sovracarico, nel PL i livelli di Hsp70 aumentano rispetto all'inibizione di calcineurina, un regolatore positivo del fenotipo delle fibre di tipo 1 (Oishi et al., 2005). I nostri risultati, ottenuti studiando un modello di transizione delle fibre che coinvolge la popolazione di tipo veloce, confermano quindi l'osservazione appena citata.

L'aumento dell'espressione di Hsp70 nelle cellule muscolari dei vasi è stato descritto nei cuori di ratto esposti con l'intero corpo a shock di calore (Leger 2000). Tuttavia mentre l'aumento della temperatura corporea sembra essere associata all'intenso allenamento, l'esercizio fisico induce ugualmente un incremento dell'espressione di Hsp70 indipendentemente dalle variazioni nella

temperatura corporea stessa (Noble et al., 2006) e, apparentemente, il livello di temperatura muscolare che viene raggiunta, paragonabile a quella che si verifica durante l'esercizio fisico, induce nell'uomo un significativo aumento nei livelli di Hsp70 (Morton, Maclaren et al. 2007). Nel nostro studio è stato osservato un aumento di immunoreattività per Hsp70 in particolar modo nei vasi, e questa evidenza è stata sempre riscontrata anche in quei muscoli che apparentemente non presentano un aumento dei livelli totali di proteina, come il TA dei ratti allenati.

Il protocollo di allenamento è stato paragonato ad un altro protocollo sperimentale che induce stress cellulare nel muscolo striato, come l'ipossia cronica (Tarricone et al. 2008; Benjamin, Kroger et al. 1990), ma che sembra non influenzare la composizione delle fibre (Abdelmalki et al., 1996) inducendo ugualmente la sovraespressione di Hsp70.

Diversamente a quanto si verifica nell'esercizio fisico, l'evento ipossico determina un'aumento della percentuale di fibre Hsp70 positive in modo significativo all'interno della tipologia lenta ed una riduzione all'interno delle fibre di tipo rapido 2A. Così mentre l'esercizio fisico induce una transizione fenotipica nel numero delle fibre rapide, l'ipossia invece non modifica la relativa proporzione della tipologia delle fibre (Abdelmaki et al. 1996), nè aumenta la percentuale assoluta di miofibre positive per Hsp70 (Tarricone et.al 2008).

C'è inoltre una differenza per l'espressione di questa proteina dello stress rispetto all'immunoreattività dei vasi nel muscolo scheletrico: mentre si evidenzia positività sia delle arterie che delle vene nei muscoli dei ratti allenati, tale reattività è limitata alle pareti delle vene nei muscoli dei ratti ipossici. La drammatica diminuzione di tensione di ossigeno, e quindi uno stato di stress ossidativo, nel sangue venoso potrebbe spiegare questo risultato.

Questi dati dimostrano come l'espressione di Hsp70, nei muscoli scheletrici costituiti prevalentemente da fibre veloci, dipenda dallo specifico tipo di stress subito.

Si può concludere che gli effetti di un allenamento di entità moderata si riflettano, con l'aumento delle difese nel miocardio e nel muscolo scheletrico, attraverso una risposta allo stress che induce la sovraregolazione di enzimi e proteine con ruolo cardioprotettivo e antiossidante, senza per giunta indurre ipertrofia cardiaca. Tale tipologia di allenamento infatti, può essere paragonata ad un esercizio fisico di

maggior intensità e sforzo, ma si candida ugualmente come un'efficiente terapia per prevenire i disagi cardiovascolari nell'uomo.

Tuttavia non tutte le risposte allo stress si accompagnano ad un incremento di espressione delle proteine dello stress. La diminuzione significativa dei livelli di Calsequestrina (Cs) nel muscolo scheletrico, in seguito ad allenamento moderato, potrebbe influenzare la regolazione dell'omeostasi cellulare; si ricordi infatti che Cs è una proteina legante Ca^{2+} , che nelle cellule muscolari striate adulte si sostituisce a crt, fungendo da proteina tampone per questo ione nel RE. Quindi Cs potrebbe avere un comportamento simile a crt; infatti la sovraespressione di quest'ultima proteina chaperone si accompagna ad un incremento della suscettibilità all'apoptosi, in quanto si osserva un aumento del Ca^{2+} totale nel RE e del rilascio di questo ione dai depositi (Nakamura, Robertson et al. 2001). Una diminuzione dell'espressione di Cs si potrebbe ipotizzare avere un ruolo citoprotettivo. Una lieve diminuzione significativa è stata evidenziata anche per Grp75 indicando aumento dello stress mitocondriale.

Anche nel modello di atrofia muscolare è stata riscontrata una diminuzione significativa nei livelli proteici di alcune proteine dello stress. Esistono evidenze in letteratura che associano alla riduzione del carico muscolare una riduzione dei livelli dell'isoforma inducibile di Hsp70 (Ku, Yang et al. 1995), proteina che gioca un ruolo fondamentale durante il processo di nascita e corretto ripiegamento dei polipeptidi nascenti a livello ribosomiale; una ridotta espressione di Hsp70 potrebbe spiegare l'inibizione della traduzione durante la sintesi proteica durante l'evento atrofico. È noto infatti che l'iniziale perdita della massa muscolare è dovuta ad una diminuzione della sintesi proteica e all'aumento del processo di degradazione delle proteine nel miocita. La modulazione dell'espressione di Hsp70 è stata osservata in seguito a denervazione nel SOL di ratto (Oishi, Ishihara et al. 2001). Solo un successivo periodo di recupero del carico muscolare dopo la sospensione, sembra ripristinare l'espressione di Hsp70 nel muscolo scheletrico a livelli paragonabili a quelli dei ratti sedentari di controllo (Oishi, Taniguchi et al. 2003).

Il nostro modello sperimentale di atrofia muscolare non evidenzia alterazioni significative nei livelli d'espressione di Hsp70, ma mostra una riduzione

significativa dei livelli proteici di Grp94 e Grp78 nel muscolo SOL. Come Hsp70, una delle funzioni principali di queste proteine chaperone è quella di assicurare il corretto ripiegamento e funzionalità delle proteine neosintetizzate, esercitando un ruolo citoprotettivo mediante l'inibizione dello stress di RE. Grp78 infatti svolge un ruolo chiave nell'attivazione della risposta UPR, al fine di ripristinare la corretta omeostasi cellulare e prevenire l'apoptosi in seguito all'esposizione prolungata a stimoli stressanti (Rao RV et al. 2002).

I cambiamenti nell'espressione di calreticulina (crt), Grp78 e Grp94 sembrano, *in vitro*, influenzare la quantità e il rilascio di Ca^{2+} dal RE (Mery, Mesaeli et al. 1996; Vitadello, Ausma et al. 2001).

Tutti questi motivi inducono a pensare che la riduzione dei livelli proteici delle proteine dello stress di RE potrebbe determinare nella cellula una maggiore suscettibilità all'apoptosi. Al contrario la modulazione della loro espressione, in termini di sovraregolazione, potrebbe invece avere effetti citoprotettivi.

Se stimoli di stress ossidativo inducono la perossidazione delle membrane e l'aumento di calcio libero rilasciato dai depositi intracellulari (un aumento dell'influsso di Ca^{2+} nei mitocondri altera il potenziale di membrana e porta alla morte cellulare, Duchon et al. 2004), non si può escludere che alterazioni dell'omeostasi del calcio potrebbero generare o aumentare lo stress ossidativo nella cellula (Capel, Demaison et al. 2005). Considerare una condizione patologica, quale l'atrofia muscolare, una conseguenza dell'alterazione dell'omeostasi cellulare del calcio, che a sua volta potrebbe influenzare l'incremento dei ROS nei miociti, è una delle ipotesi di questo studio. Riuscire quindi a modulare l'espressione di alcune proteine dello stress in grado di modulare la quantità di Ca^{2+} libero citosolico nelle linee cellulari miogeniche quale Grp94 (Vitadello et al. 2003), potrebbe ridurre lo stress ossidativo e ritardare così la progressione dell'atrofia muscolare.

RISULTATI IN VITRO

L'utilizzo sperimentale di modelli in vitro permette di modulare l'espressione cellulare di una specifica proteina in modo più controllato e selettivo.

Lo stress del RE indotto dall'esposizione ad agenti ossidanti, come ter-Butil-idroperossido (TBHP), riducenti (DTT), inofori del calcio o inibitori della pompa SERCA, inducono l'espressione di diverse proteine dello stress del RE, come Grp94, Grp78 e crt, che sensitizzano la cellula e la rendono resistente alla morte cellulare ad esposizioni seguenti (Liu, Bowes et al. 1997; Liu, Miller et al. 1998).

L'interesse perciò di indurre una risposta allo stress del RE mediante trattamenti farmacologici con sostanze di origine naturale, quali Curcumina con effetto inibitorio sulla pompa del calcio di RE, presenta il vantaggio di offrire indicazioni utili a possibili applicazioni terapeutiche in campo umano. Il meccanismo attraverso cui agiscono gli effettori della citoprotezione indotta da stress del RE verrà studiato in vitro anche mediante manipolazione genetica con trasfezione transiente e/ o stabile che presenta l'elevata probabilità di indurre una risposta cellulare ancor più selettiva.

1. Modelli per la sovraespressione di Grp94

1.1 Effetti di una singola esposizione a Curcumina.

Curcumina, un composto derivato dalla spezia indiana Curcuma Longa, è un polifenolo a basso peso molecolare, insolubile in acqua, ma solubile in di-metil-sulfossido (DMSO) (Sharma et al., 2005). Nel ratto la somministrazione di Curcumina a livello orale mostra, in vivo, una bassa biodisponibilità, mentre a livello intravenoso o intraperitoneale una rapida metabolizzazione a livello epatico (Holder et al., 1978). Attualmente Curcumina viene utilizzata nella sperimentazione clinica come farmaco antineoplastico: i suoi effetti anti-proliferativi, tessuto specifico, inducono apoptosi nelle cellule tumorali, mentre proteggono le cellule sane senza avere effetti citotossici (Hanif et al. 1997).

Curcumina ha un'azione antiossidante inibendo la perossidazione lipidica, il Citocromo P450 (Ciolino et al. 1998) e il danno ossidativo al livello del DNA (Piper 1998), ma in modo particolare induce fortemente l'enzima HO-1 (Ryter,

Alam et al. 2006). Curcumina è un inibitore reversibile, con bassa affinità, della pompa Ca^{2+} di RE/ Sarcoplasmatica SERCA (Sumbilla et al. 2002; Bilmen et al. 2001).

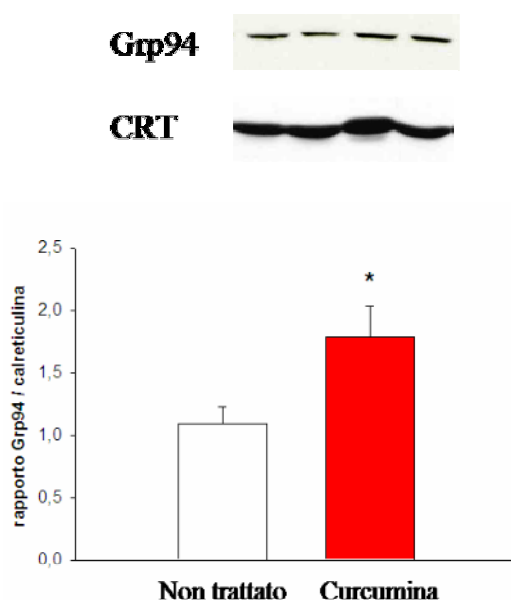


Figura 17. Cellule C2C12 esposte a breve trattamento con curcumina mostrano livelli di espressione di Grp94 aumentati. L'istogramma in basso mostra l'aumento significativo (* $p < 0,05$) dell'espressione proteica di Grp94 24 ore dopo un breve trattamento di 3 ore con curcumina rispetto alle cellule non trattate. I livelli proteici sono stati valutati attraverso analisi western blot (foto in alto) dopo 24 h dal trattamento e normalizzati rispetto ai livelli di caricamento del gel con la proteina crt.

Pertanto, è stata studiata la capacità di una singola somministrazione di Curcumina per indurre una risposta allo stress del RE, in particolar modo di incrementare i livelli cellulari di Grp94. La quantificazione dell'espressione di Grp94 è stata fatta attraverso analisi Western blot 24 ore dopo l'esposizione a 3 ore con curcumina 5mM (Fig. 17). Nonostante curcumina sia un forte induttore di HO-1, i livelli di questa proteina non appaiono modificati (fig 18). Dopo 24 ore di un breve pre-trattamento con Curcumina, in cellule C2C12, si ha un aumento significativo e selettivo dei livelli di Grp94, senza tuttavia influenzare l'espressione delle altre proteine di RE come HO-1 e crt. Pertanto una singola pre-esposizione con Curcumina, in cellule miogeniche C2C12, induce una risposta allo stress di RE, aumentando, apparentemente in modo selettivo, i livelli di Grp94

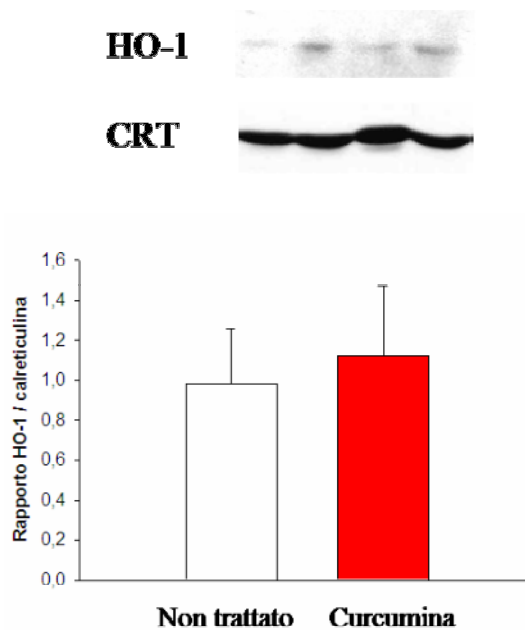


Figura 18. Cellule C2C12 esposte a breve trattamento con curcumina non mostrano livelli di espressione di HO-1 alterati. L'istogramma in basso mostra come dopo 24 ore da un breve trattamento di 3 ore con curcumina l'espressione proteica di HO-1 non venga modificata rispetto alle cellule non trattate. I livelli proteici sono stati valutati attraverso analisi western blot (foto in alto) dopo 24 h dal trattamento e normalizzati rispetto ai livelli di caricamento del gel con la proteina crt.

1.2 Sovraespressione stabile e transiente di Grp94.

L'obiettivo di questa parte di studio è stato quello di determinare l'entità della sovraespressione della proteina Grp94 dopo trasfezione stabile e transiente in mioblasti C2C12 di ratto.

La figura 19 mostra, attraverso analisi Western Blot, l'aumentata sovraespressione di Grp94 nei cloni esaminati. I dati dell'incremento semiquantitativo sono riportati in tabella 3.

Si è indagato quali possibili effetti potesse indurre la sovraespressione stabile di Grp94 sui livelli cellulari di altre proteine chaperone del RE, come BiP e calreticulina (crt).

Dai dati densitometrici elencati in tabella 3 si deduce che i livelli di crt sono significativamente aumentati nei cloni 8/1F8, 8/5D1 e 8/2E3, così come per Grp78 (BiP) nel clone 8/2E3, mentre i livelli di crt e BiP non differiscono nel clone 8/2A11 rispetto al clone di controllo S/1C8.

| | Clone controllo | Cloni sovraesprimenti | | | |
|--------------|-----------------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|
| | S/1C8 | 8/2A11 | 8/1F8 | 8/5D1 | 8/2E3 |
| GRP94 | 1,00±0,18 | 2,53±1,13* | 1,97±0,52** | 2,17±0,30** | 3,67±1,62** |
| GRP78 | 1,10±0,20 | 1,15±0,40 | 2,59±1,55 | 1,92±0,87 | 7,63±3,68* |
| CRT | 1,00±0,22 | 1,82±1,03 | 5,12±2,19** | 1,75±0,75* | 16,04±8,50** |

Tabella 3. Caratterizzazione dei diversi livelli di espressione di alcune proteine del RE in cloni di C2C12 ottenuti dopo trasfezione stabile con cDNA di Grp94. La tabella mostra i risultati dell'analisi semiquantitativa di Grp94, Grp78 e Crt in diversi cloni sovraesprimenti Grp94 rispetto al clone di controllo S1C8. L'analisi semiquantitativa è stata fatta normalizzando i valori dei livelli proteici rispetto alla proteina pkc- α . I dati sono espressi come media \pm ES (n=3) con * $p \leq 0,01$ e ** $p \leq 0,03$ rispetto al valore del clone di controllo S1C8

Le cellule C2C12 originarie sono state in seguito trasfettate transientemente per escludere fenomeni adattativi dei cloni in sé e/o conseguenti alla sovraespressione stabile di Grp94.

Prima di procedere è stata valutata l'efficienza di trasfezione della linea cellulare miogenica presa in esame. Le cellule C2C12 sono state trasfettate transientemente con costrutti bicistronici codificanti per Grp94 (plasmide pT94 contenente cDNA di Grp94) o con il costrutto di controllo (vettore vuoto pT) che co-esprimono la proteina verde fluorescente GFP (cfr Materiali e metodi). L'utilizzo di costrutti con GFP ha permesso di identificare in modo inequivocabile le cellule trasfettate con i costrutti d'interesse. Buoni risultati sono stati ottenuti con la tecnica del calcio fosfato (cfr Materiali e metodi) attraverso cui si è raggiunta un'efficienza di trasfezione pari al 50% .

Quindi è stata valutata, attraverso analisi Western Blot, la presenza di sovraespressione di Grp94; le cellule sono state trasfettate transientemente con il costrutto codificante per Grp94 (plasmide PBKrsv8A contenente cDNA di Grp94) o con il costrutto di controllo (vettore vuoto PBKrsv). La figura 19 mostra il relativo incremento semiquantitativo di Grp94 nelle C2C12 (Media ed ES per 8A: $0,9 \pm 0,12$ e per controllo VV: $3 \pm 0,7$; t-test $p \leq 0,05$) pari a circa 3 volte rispetto al controllo.

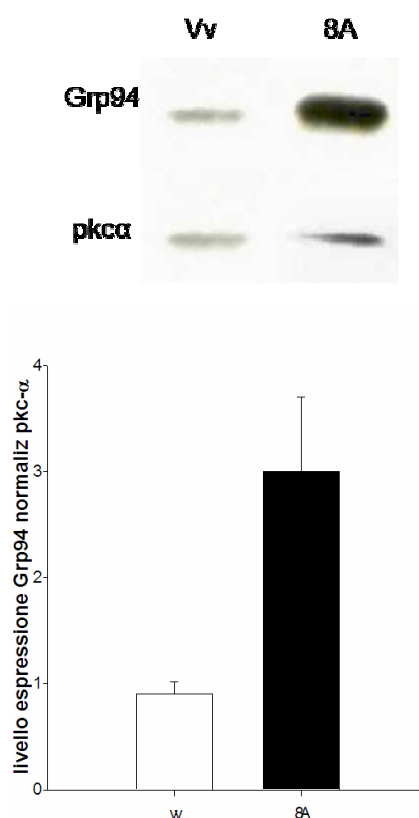


Figura 19. Cellule C2C12 trasfettate transientemente con il cDNA Grp94 mostrano livelli di espressione aumentati rispetto al controllo. L'istogramma mostra l'efficienza di trasfezione in cellule C2C12 esprimenti transientemente la proteina Grp94 rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto. Media ed ES dei livelli proteici, normalizzati con la proteina pKc- α , sono stati valutati attraverso Western blotting 24 h dopo la trasfezione.

2. Ruolo biologico del chaperone/proteina dello stress Grp94

Grp94 (glucose-regulated-protein-94), una proteina dello stress presente nel RE, svolge funzioni di chaperone ed è in grado di legare Ca^{2+} (Nigam, Goldberg et al. 1994) contribuendo a modulare l'omeostasi intracellulare di questo importante secondo messaggero (Vitadello et al. 2003). Gli studi in vitro sono stati condotti dopo modulazione dell'espressione di questa proteina, sia con manipolazione genetica (trasfezioni stabili e transienti) che dopo induzione farmacologica selettiva, con esposizione a curcumina. La linea cellulare utilizzata prevalentemente è stata la linea miogenica scheletrica di topo C2C12. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare il contributo della sovraespressione di Grp94 nella protezione anti-apoptotica e anti-ossidante e di analizzare quale contributo offre questa proteina al controllo dell'omeostasi del calcio.

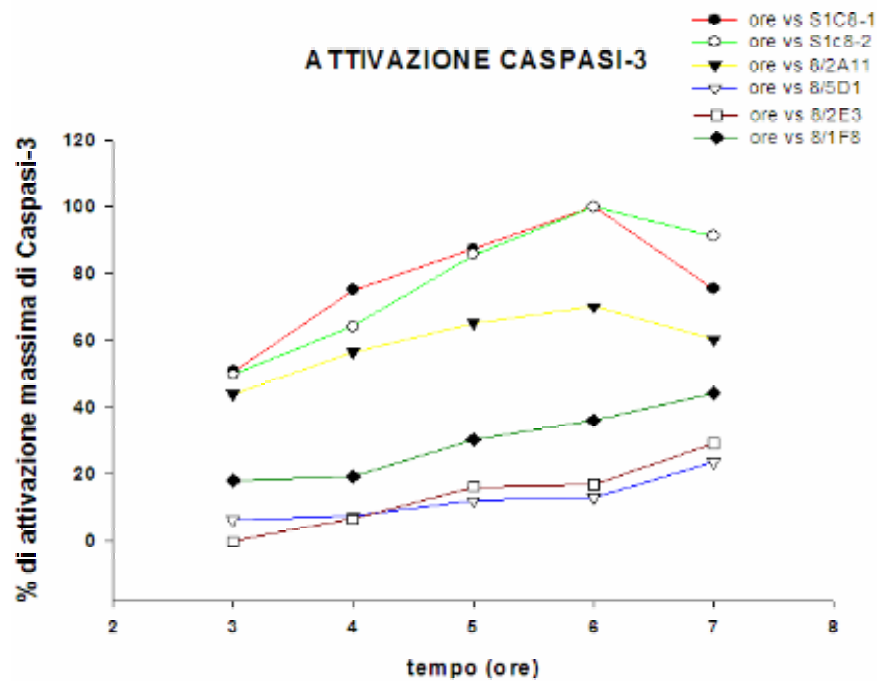
2.1 Sovraespressione di Grp94 e protezione anti-apoptotica

La protezione all'apoptosi nei cloni sovraesprimenti Grp94 è stata studiata utilizzando come agente promotore dell'apoptosi la Staurosporina, un inibitore, non selettivo, delle protein kinasi (Tamaoki et al., 1986; Nakano et al., 1987). Il meccanismo attraverso cui Staurosporina è in grado di indurre apoptosi è dovuto sia all'attivazione della Caspasi 9 (via classica mitocondriale), sia attraverso l'attivazione di Caspasi 12 (via apoptotica innescata da stress del RE). Lo stress cellulare, indotto da inibizione delle kinasi, può determinare l'attivazione di fattori trascrizionali che potenziano l'apoptosi ed indurre un rilascio massiccio di calcio dai depositi cellulari con la seguente attivazione della proteina calcio dipendente Calpaina. Quest'ultima è in grado di attivare la Caspasi 12 che induce a sua volta l'attivazione della Caspasi 9 e di conseguenza la Caspasi 3. Questo spiega come il trattamento con Staurosporina inneschi la Cascata Caspasica e quindi l'apoptosi cellulare attraverso un meccanismo misto (via mitocondriale/RE) (Kaufman 2002; Szegezdi et al., 2003).

La fig 20 mostra la cinetica di attivazione della Caspasi-3 determinata mediante uno specifico Saggio microenzimatico (Materiali e Metodi), nei cloni di C2C12 trasfettati stabilmente con il cDNA di Grp94 o con il vettore di controllo (clone S1C8) dopo esposizione a Staurosporina 1 μ M a 37°C per tempi diversi. L'analisi cinetica mostra che la massima attivazione della Caspasi-3 avviene nel clone di controllo, dopo 6 ore di esposizione a staurosporina, mentre in tre cloni sovraesprimenti questo valore non viene raggiunto neppure quando si prolunga l'incubazione di un'ora. Il tempo di esposizione di 6h è stato quindi scelto per paragonare l'entità dell'apoptosi tra più cloni sovraesprimenti Grp94 e cloni di controllo.

I cloni 8/2A11, 8/5D1, 8/2E3 e 8/1F8 sovraesprimenti Grp94 mostrano una riduzione statisticamente significativa dell'attivazione della caspasi-3 rispetto al controllo S1C8. Nei cloni l'attività della caspasi-3 a 6 ore raggiunge circa il 15% - 40% dei valori presenti nei cloni di controllo suggerendo che la sovraespressione di Grp94 determina una riduzione nell'insorgenza dell'evento apoptotico.

E' stato quindi valutato il coinvolgimento della via apoptotica attivata dallo stress del RE, cioè l'attivazione della caspasi-12.



ISTOGRAMMA TEST CASPASI-3 CLONI C₂C₁₂, 6h staurosporina 1 μ M

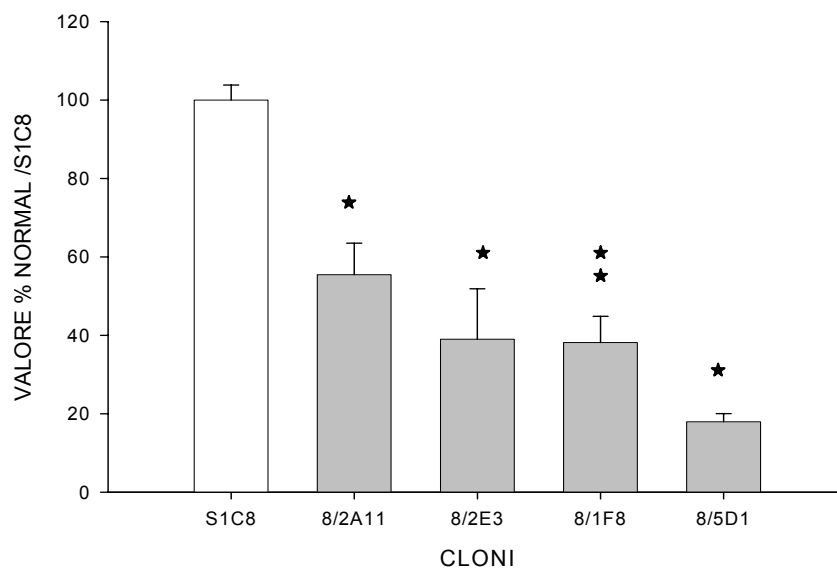


Figura 20. La sovraespressione stabile di Grp94 in cloni C2C12 diminuisce l'attivazione di Caspase-3 dopo trattamento con staurosporina. Il pannello in alto mostra la cinetica di attivazione della Caspasi-3 in diversi cloni di C2C12 (vedi legenda in alto a destra del pannello), stabilmente trasfettati con il cDNA di Grp94 o con il vettore di controllo (clone S1C8) ed esposte a Staurosporina 1 μ M. La massima attivazione di Caspasi-3 si ottiene a 6h di trattamento, mentre nei cloni sovraesprimenti risulta essere ritardata. L'istogramma in basso mostra che l'attivazione di Caspasi-3 è significativamente ridotta (*p<0.05; **p<0.01) nei cloni sovraesprimenti Grp94 (8/2A11, 8/2E3, 8/1F8 e 8/5D1, colonne grigie) rispetto al clone di controllo (S1C8, colonna bianca) dopo 6 ore di trattamento con Staurosporina.

Il trattamento di 6 ore con staurosporina 1 μ M induce l'attivazione della pro-Caspasi 12 dimostrabile con la comparsa del frammento proteolitico di 41 kDa corrispondente alla Caspasi 12 attivata nel clone di controllo S1C8 rispetto allo stesso clone non trattato (Figura 21). Si noti inoltre come nel clone trattato inizia già la degradazione proteica del frammento attivato indice di un avanzato stadio apoptotico. Questo dato dimostra come effettivamente Staurosporina induca apoptosi attraverso la via di RE inducendo attivazione della Pro-caspasi.

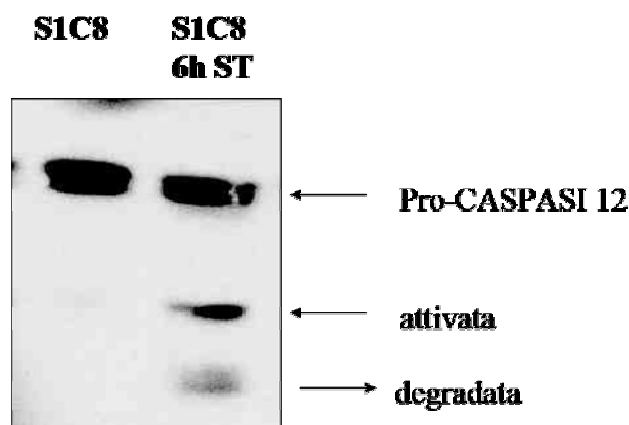


Figura 21. Staurosporina induce l'attivazione di Pro-Caspasi 12. La foto mostra come nel clone di controllo S1C8, dopo 6 ore di trattamento con Staurosporina 1 μ M, vi sia attivazione della Pro-Caspasi-12 (50 kDa) Caspasi 12 Attiva (41 kDa), rispetto al medesimo clone non trattato dove l'attivazione è assente.

Il medesimo esperimento è stato poi esteso ai cloni C2C12 sovraespressanti per valutare il grado di protezione apoptotica, nei confronti dell'attivazione di Pro-Caspasi 12, rispetto al clone di controllo S1C8.

In figura 22, 6 ore di trattamento con Staurosporina inducono l'attivazione della Pro-Caspasi 12 in tutti i cloni, sovraespressanti e controllo. Valutando, nei singoli cloni, il rapporto tra intensità della banda della pro-Caspasi 12 rispetto all'intensità della banda che individua la Caspasi-12 attivata, questo rapporto è circa 3 volte maggiore nel clone 8/2E3, mentre nei cloni 8/1F8 e 8/5D1 il rapporto è circa il 50% superiore se paragonato al valore del clone di controllo S/1C8. Il clone sovraesprimente 8/2A11 invece presenta attivazione della Pro-caspasi 12 paragonabile al clone di controllo (dato non mostrato in figura). Questi risultati suggeriscono che in quasi tutti i cloni sovraespressanti Grp94 c'è una diminuita

attivazione della Pro-caspasi 12, indice di una riduzione all'apoptosi, che quindi coinvolge direttamente anche l'attivazione a monte della via apoptotica di RE.

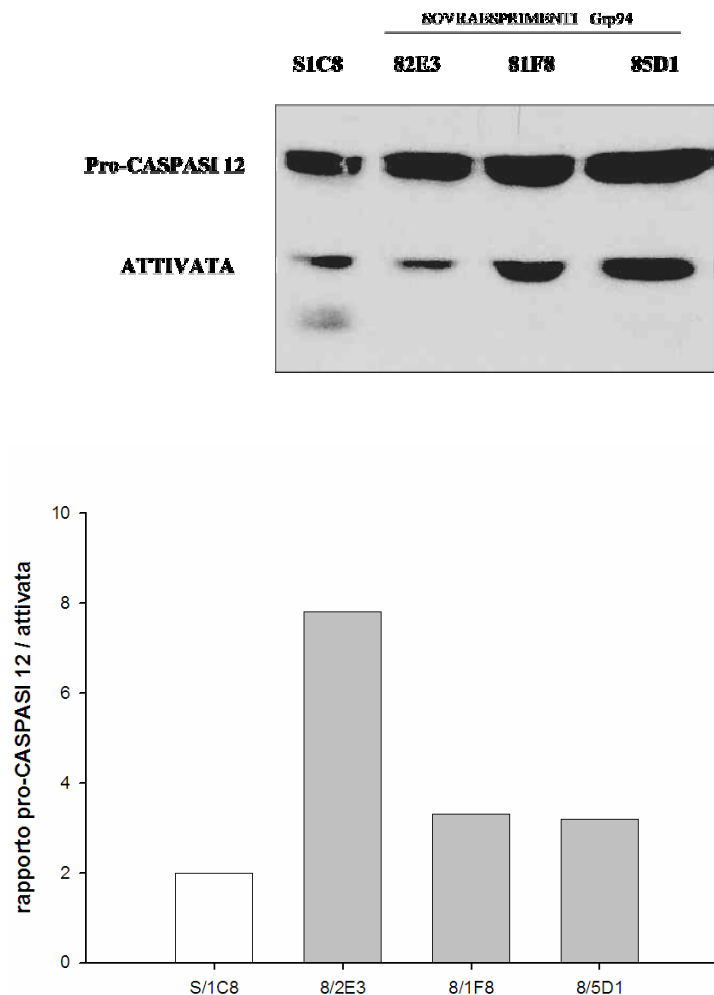


Figura 22. Nei cloni sovraesprimenti Grp94 c'è una ridotta attivazione della Pro-caspasi 12. La foto in alto mostra come dopo 6 ore di trattamento con Staurosporina vi sia in tutti cloni sovraesprimenti Grp94 (8/2E3, 8/1F8 e 8/5D1) e nel clone di controllo (S1C8) attivazione della Pro-caspasi 12 a Caspasi 12 attiva. In particolare l'istogramma in basso mostra come nei cloni sovraesprimenti (colonne grigie) l'attivazione sia ridotta rispetto al controllo (colonna bianca).

Per confermare i risultati ottenuti sui cloni sovraesprimenti Grp94 e per escludere fenomeni adattativi responsabili di una riduzione dell'apoptosi, cellule C2C12 sono state trasfettate transientemente con i costrutti GFP-pt di controllo o GFP-pt94 codificante per Grp94. Le cellule sono state in seguito trattate con Staurosporina e analizzate, mediante analisi TUNEL, per la presenza di degradazione nucleosomale del DNA, un marcatore tardivo di apoptosi. Al fine di

determinare le migliori condizioni per attuare l'esperimento, le C2C12 sono state trattate con Staurosporina a vari tempi d'esposizione, in quanto i tempi necessari per visualizzare l'apoptosi con il metodo TUNEL sono più lunghi di quelli utilizzati per l'analisi dell'attivazione della caspasi 3 o 12. Tuttavia, l'esposizione prolungata a Staurosporina, come a qualsiasi altro agente apoptogeno, aumenta anche il numero di cellule che vanno incontro a necrosi secondaria; una buona percentuale di cellule apoptotiche in presenza di un numero ridotto di cellule necrotiche, è stata ottenuta dopo esposizione a 8 ore di Staurosporina. Come mostrato in tabella 4, la comparsa di positività alla reazione TUNEL corrisponde a circa il 30% delle cellule totali, mentre la necrosi, visualizzabile dalla comparsa di presenza di colorazione nucleare con una sostanza impermeabile alla membrana cellulare, come il propidio ioduro, è limitata a circa il 12%.

La figura 23 mostra l'espressione della GFP e la presenza di apoptosi evidenziata tramite l'incorporazione di nucleotidi marcati nel DNA (reazione TUNEL). La conta dei nuclei positivi per TUNEL (figura 24), effettuata solo nelle cellule positive per GFP, mostra che la percentuale di apoptosi è ridotta di circa il 50% nelle colture trasfettate con il costrutto pT94 rispetto a quelle trasfettate con il costrutto di controllo pT (* $p \leq 0,01$).

| Tempo esposizione alla staurosporina | N.cellule contate | % TUNEL positive | N. cellule contate | % PI |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------|
| 0 | 553 | 0,58±0,19 | nd | nd |
| 2 | 775 | 0,76±0,21 | 742 | 0,53±0,18 |
| 4 | 735 | 1,89±0,35 | 768 | 0,64±0,19 |
| 6 | 2277 | 1,214±2,14 | 1495 | 4,40±0,10 |
| 8 | 1502 | 30,33±3,93 | 3244 | 12,00±1,86 |

Tabella 4. Apoptosi e necrosi dopo esposizione a staurosporina di cellule C2C12 evidenziate rispettivamente mediante reazione TUNEL e colorazione nucleare per propidio ioduro (PI). I dati sono espressi come media ± SE di almeno due esperimenti distinti.

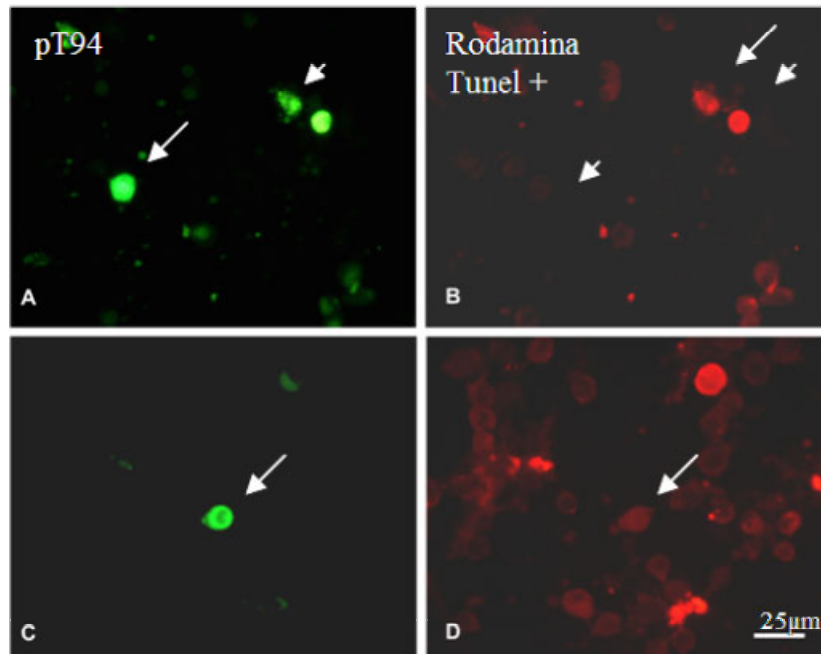


Figura 23. Analisi TUNEL dopo trasfezione transiente con cDNA Grp94 in cellule C2C12. Visualizzazione dell'immunofluorescenza della GFP nelle cellule C2C12 trasfettate transientemente con il plasmide pT94 (panello A e C) ed esposte a staurosporina 8 ore. I pannelli B e D illustrano la presenza di fluorescenza per la rodamina corrispondente alla positività per la reazione TUNEL nei nuclei di alcune C2C12. Solo parte delle cellule trasfettate mostra positività per la TUNEL (freccia) mentre le cellule trasfettate negative per TUNEL sono evidenziate dalla punta della freccia.

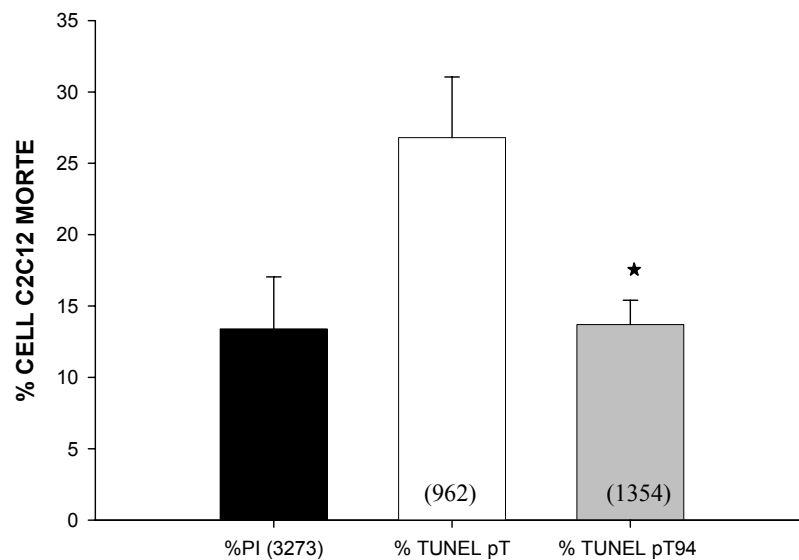


Figura 24. La sovraespressione transiente di Grp94 riduce significativamente la percentuale di cellule apoptotiche. L'istogramma mostra la media dei valori percentuali di morte per necrosi (PI) e per apoptosi (TUNEL) osservati in C2C12 esposte a staurosporina per 8 ore. I valori percentuali riguardanti l'apoptosi si riferiscono a cellule trasfettate con il plasmide GFP-pt94 o con il vettore di controllo GFP-pT. Tra parentesi è indicato il numero di cellule contate per ogni condizione sperimentale. (* $p < 0.01$).

Le cellule C2C12 sovraesprimenti Grp94, sia stabilmente che transientemente, evidenziano una significativa riduzione alla morte cellulare programmata rispetto alle cellule di controllo. La sovraespressione di Grp94 quindi sembra avere un ruolo citoprotettivo in questa linea cellulare miogenica.

2.2 Sovraespressione di Grp94 e protezione anti-ossidante

L'aumentata espressione di proteine, quali Grp94, Grp78 e crt, come effetto della risposta allo stress del RE, si accompagna ad aumentata resistenza alla morte cellulare indotta da stress ossidativo (Liu, Bowes et al. 1997; Liu, Miller et al. 1998). Si ipotizza che tali proteine intervengano nella regolazione dell'omeostasi del calcio (Mery, Mesaeli et al. 1996; Vitadello, Ausma et al. 2001) le cui alterazioni contribuiscono ad innescare e ad aggravare lo stress ossidativo (Capel, Demaison et al. 2005). In particolare, abbiamo indagato gli effetti sulla protezione antiossidante indotti da Grp94, un regolatore dell'omeostasi del Ca^{2+} nelle linee cellulari miogeniche (Vitadello et al. 2003).

Lo scopo di questa indagine è stato quello di studiare l'effetto della sovraespressione di Grp94 nella linea cellulare C2C12. Lo studio è stato condotto in cloni stabili sovraesprimenti Grp94 ed in cellule C2C12 esposte a curcumina, allo scopo di indurre l'aumento selettivo dei livelli di Grp94.

L'entità dello stato ossidativo generale delle proteine cellulari è stata misurata utilizzando il saggio Oxyblot che permette di introdurre un addotto nei gruppi carbonilici derivati dall'esposizione delle proteine ad agenti ossidanti e di rilevarne la presenza, attraverso analisi WB, utilizzando specifici anticorpi (cfr Materiali e metodi). Le cellule venivano esposte per tempi brevi ad perossido di idrogeno (H_2O_2), un ROS permeabile alle membrane cellulari, che induce stress ossidativo attraverso la produzione di lipoperossidi e radicali derivati da questi.

La perossidazione delle membrane può provocare il rilascio e quindi l'aumento di calcio libero nel citosol.

2.2.1 Effetti dell'esposizione a perossido di idrogeno sull'ossidazione delle proteine di cellule C2C12 di controllo e sovraesprimenti Grp94

Gli effetti della sovraespressione di Grp94 sul grado di ossidazione delle proteine cellulari di C2C12 sono stati valutati in cellule trasfettate stabilmente con il cDNA

di Grp94, come il clone 8/2A11, che mostra un incremento di espressione pari a circa 2 volte di Grp94 e assenza di modificazioni significative dei livelli proteici di Grp78 e calreticulina, rispetto al clone di controllo S1C8, ottenuto trasfettando il vettore vuoto (tabella 3 par. 6.2).

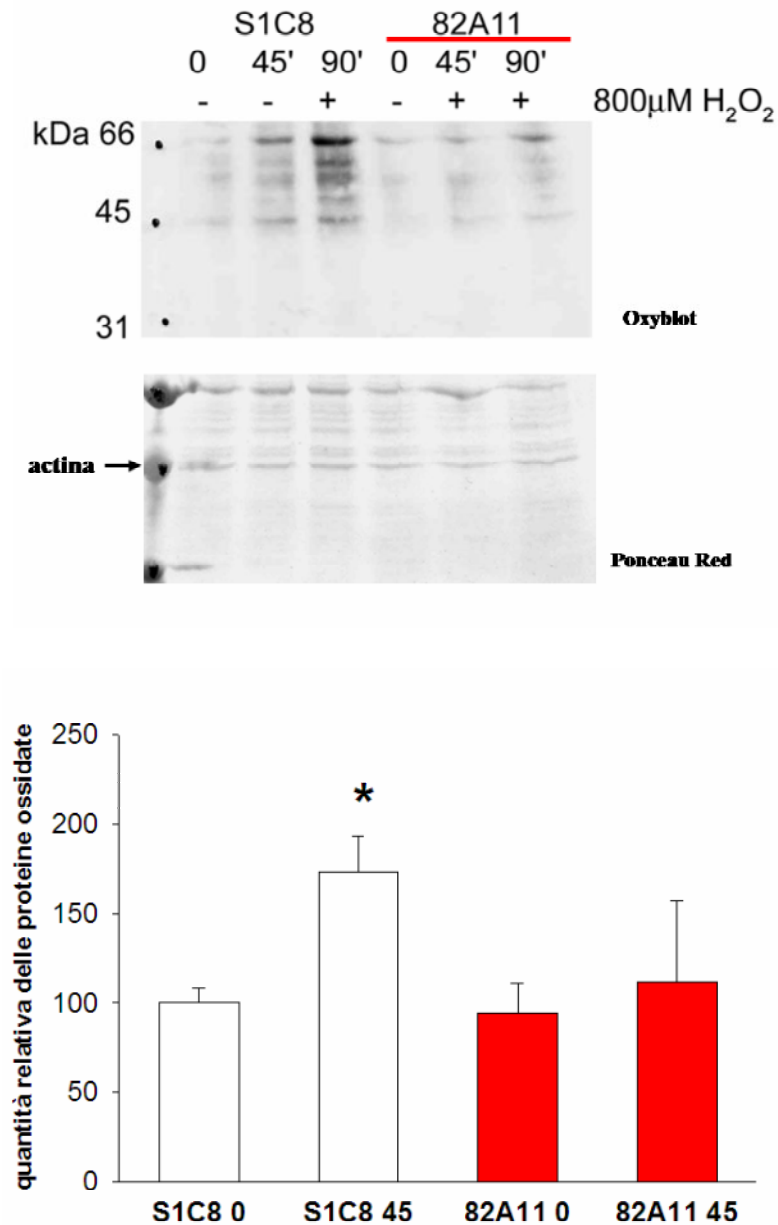


Figura 25. Il trattamento con H₂O₂ del clone sovraesprime Grp94 mostra una diminuita ossidazione proteica totale attraverso analisi Oxyblot. La foto in alto mostra un tipico esempio di analisi oxyblot. Le cellule sono state trattate con 800 μ M H₂O₂ per 45 e 90 minuti. Nell'istogramma in basso è rappresentata l'analisi statistica degli esperimenti effettuati (n=3): si noti un aumento significativo nei livelli di ossidazione delle proteine totali nel clone di controllo S1C8 a 45 min, mentre non si evidenzia ossidazione in seguito al medesimo trattamento nel clone sovraesprime 8/2A11. I valori sono stati normalizzati rispetto alla banda dell'actina (freccia) del ponceau red. (* p \leq 0,01)

Le cellule sono state esposte a 800 mM H₂O₂ per 15-90 minuti; l'analisi del lisato mediante analisi Oxyblot (cfr Materiali e Metodi) ha evidenziato un significativo aumento dei livelli di ossidazione proteica totale nelle cellule del clone di controllo S/1C8 dopo il trattamento con perossido di idrogeno, rispetto alle cellule non trattate; contrariamente, nessun aumento nell'ossidazione proteica totale è stato riscontrato nelle cellule del clone sovraesprimente Grp94 trattate con H₂O₂ (Fig.25). Quindi, a sovraespressione stabile di Grp94 limita significativamente gli effetti del perossido di idrogeno sull'ossidazione proteica.

2.2.2 Effetti di una singola esposizione a curcumina sulla protezione anti-ossidante.

Dato che l'esposizione di breve durata a curcumina sembra indurre l'aumento selettivo dei livelli di Grp94 in cellule C2C12 proliferanti, abbiamo valutato l'entità dell'ossidazione delle proteine indotta da perossido di idrogeno in questo modello in vitro.

Le cellule sono state esposte a 5mM curcumina per 3h e mantenute per le seguenti 24 ore in terreno di coltura. Alcune colture sono state esposte a curcumina 20 mM un'ora prima dell'aggiunta di perossido di idrogeno al mezzo di coltura, come controllo positivo dell'effetto diretto del potere antiossidante di curcumina. Le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni di perossido di idrogeno (400-800 mM) per tempi variabili (da 15 a 90 minuti).

Sono stati quindi analizzati i livelli di ossidazione delle proteine totali attraverso analisi Oxyblot (Figura 26). L'esposizione a 400-800 mM H₂O₂ incrementa in modo significativo i livelli di ossidazione delle proteine totali di cellule C2C12 non trattate con curcumina, a partire da 45 min. Il trattamento con curcumina effettuato 24 ore prima dell'esposizione a perossido di idrogeno sembra limitare gli eventi ossidativi a carico delle proteine cellulari. L'entità dell'ossidazione proteica rimane pressochè analoga a quella osservata nelle cellule prima dell'esposizione al perossido di idrogeno.

Come prevedibile, in presenza di curcumina l'entità dell'ossidazione proteica totale non incrementa, anzi sembra significativamente ridotta. (Figura 26).

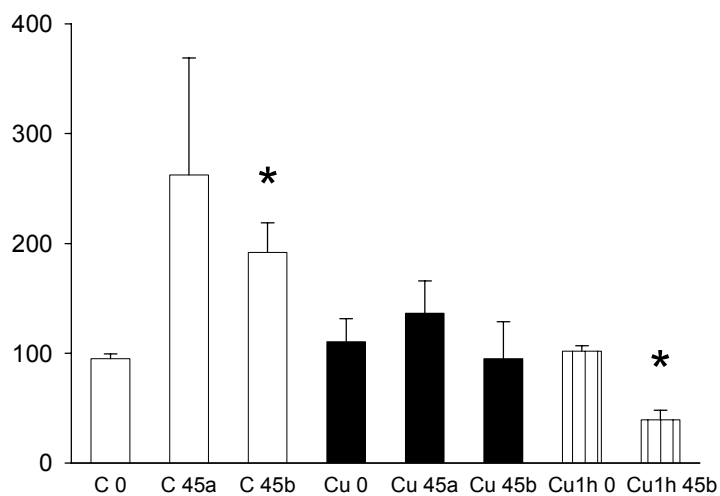
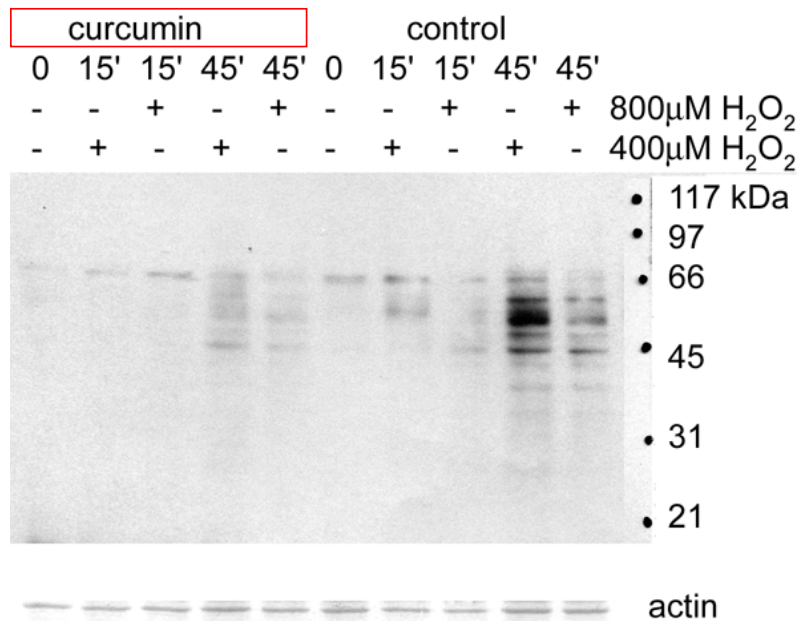


Figura 26. Cellule C2C12 pretrattate con curcumina mostrano una diminuita ossidazione proteica totale attraverso analisi Oxyblot. La figura in alto mostra un tipico esempio di analisi oxyblot. Le cellule sono state trattate con 400-800 μ M H₂O₂ dai 15 a 45 minuti. Nell'istogramma in basso mostra l'analisi statistica degli esperimenti effettuati (n=3): si noti un aumento significativo nei livelli di ossidazione delle proteine totali in cellule di controllo non trattate a 45 min, mentre si evidenzia una lieve ossidazione in seguito a trattamento 24 ore prima con curcumina. Inoltre tale diminuzione risulta significativamente ridotta anche quando curcumina 20 μ M viene aggiunta al terreno di crescita 1 ora prima del trattamento con H₂O₂. (Cu 1h 45b) (* p \leq 0,01 rispetto alle cellule al tempo 0). L'intensità della banda ponceau red per la proteina actina è stata usata per la normalizzazione.

Pertanto una singola pre-esposizione di Curcumina in cellule miogeniche C2C12, induce protezione anti-ossidante, anche se di entità minore rispetto alla presenza della sostanza nel mezzo di coltura, ritardando l'ossidazione proteica totale rispetto alle cellule di controllo non trattate. Tale effetto implica meccanismi distinti da quelli attivati nelle colture esposte a stress ossidativo in presenza di una dose acuta di curcumina, in quanto avviene a distanza di 24 ore dal trattamento delle cellule con curcumina e in assenza della stessa durante l'esposizione al perossido di idrogeno e potrebbe essere attribuibile all'aumento di Grp94

2.3 Effetto della sovraespressione di Grp94 sull'omeostasi intracellulare del calcio

E' stato suggerito che Grp94 svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare modulando la regolazione dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} (Vitadello, Penzo et al. 2003) (Bando, Katayama et al. 2004). Poiché in questo progetto di dottorato, è stato dimostrato che la sovraespressione di Grp94, sia stabile che transiente, ha effetti protettivi sia verso l'apoptosi che lo stress ossidativo, si è cercato di capire come questa proteina possa influenzare l'omeostasi del Ca^{2+} e di conseguenza ipotizzare possibili meccanismi d'azione.

2.3.1 Determinazione del contenuto di calcio intracellulare in cloni C2C12 sovraesprimenti stabilmente Grp94.

In questo studio sono stati analizzati 4 cloni di C2C12 (8/2A11, 8/3D2, 8/5D1, 8/2E3) esprimenti stabilmente il cDNA per Grp94 e il relativo clone di controllo S/1C8. I cloni sono stati caratterizzati per la sovraespressione di Grp94 e per altre proteine del reticolo (Grp78 e Crt) come precedentemente riportato in tabella 3.

Il protocollo sperimentale (figura 27) mira ad isolare il segnale derivante dal Ca^{2+} citosolico, rilasciato dai depositi intracellulari, utilizzando come indicatore fluorescente per Ca^{2+} il fura-2 (cfr Materiali e Metodi) in presenza di acido ciclopiazonico (CPA), un inibitore reversibile della pompa SERCA. La traccia del segnale che ne consegue mostra un rilascio lento e passivo del Ca^{2+} contenuto nei depositi intracellulari che si traduce in un progressivo e costante aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

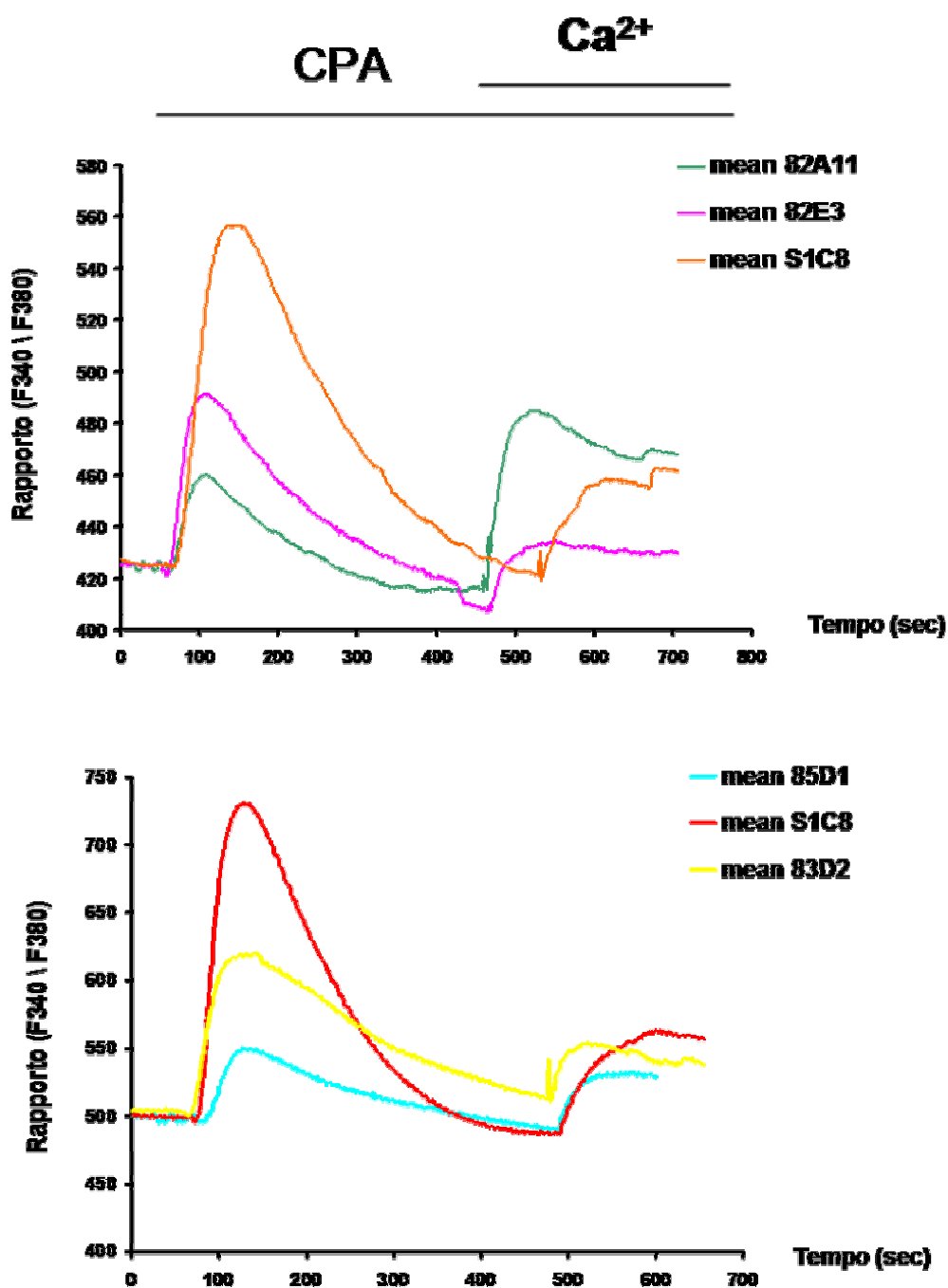


Figura 27. Protocollo utilizzato per l'analisi del contenuto di Ca^{2+} dei depositi intracellulari. La figura rappresenta un tipico esperimento eseguito per misurare le variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cloni di C2C12 sovraespressanti Grp94 (traccia verde clone 8/2A11, traccia viola clone 8/2E3, traccia azzurra clone 8/5D1, traccia gialla clone 8/3D2) e per il controllo (traccia rossa S1C8). Le cellule sono state perfuse con una salina priva di Ca^{2+} (vedi Materiali e Metodi) e quindi stimulate con CPA (20mM). Il segnale rappresenta la differenza tra il valore del rapporto di fluorescenza (F340/F380).

La figura 27 mostra le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ in un esperimento rappresentativo con cellule del clone di controllo S1C8 (traccia rossa) e dei cloni di C2C12 sovraesprimenti Grp94 (traccia verde clone 8/2A11, traccia viola clone 8/2E3, traccia azzurra clone 8/5D1, traccia gialla clone 8/3D2).

La figura 27 mostra che nelle cellule dei cloni sovraesprimenti Grp94, il la quantità di Ca^{2+} rilasciato dai depositi intracellulari, in presenza di inibizione della SERCA da parte del CPA, è inferiore rispetto a quella rilasciata dalle cellule di controllo. Per ciascun esperimento il segnale del rilascio di Ca^{2+} è espresso come valore medio del numero di cellule analizzate per tipologia di clone. In tabella 5 sono riportati i valori di rilascio di Ca^{2+} al picco (valore massimo del segnale) così ottenuti nei diversi cloni, espresso come differenza tra il valore del rapporto di fluorescenza (F340/F380) raggiunto al picco e quello a riposo. Si nota una significativa riduzione di tale valore nei cloni sovraesprimenti Grp94.

| | | | | | |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Clone di controllo | S1C8 | | | | |
| Cloni C2C12 sovraesprimenti Grp94 | | 8/5D1 | 8/3D2 | 8/2E3 | 8/2A11 |
| % Contenuto dei depositi di Ca^{2+} normalizzati rispetto a S1C8 | 100 | 29,7 | 80 | 40 | 17,4 |

Tabella 5. Cloni di C2C12 sovraesprimenti Grp94 mostrano un diminuito rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari. La tabella rappresenta la percentuale del rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, indotto da CPA (20mM) in cloni di C2C12 sovraesprimenti Grp94 normalizzati rispetto al valore del clone di controllo.

2.3.2 Variazioni della $[Ca^{2+}]$ intraluminare (RE) in seguito alla sovraespressione stabile e transiente di Grp94 in cellule C2C12 e dopo sovraespressione transiente di Grp94 in linee cellulari non miogeniche mediante l'uso di AEQ RE.

Le misure della $[Ca^{2+}]_i$ effettuate con il fura-2 stimano solo in modo indiretto il contenuto dei depositi intracellulari di Ca^{2+} , in quanto il segnale citosolico che si ottiene è il risultato delle cinetiche di rilascio dai depositi e di rimozione dello ione stesso dal citosol.

Per verificare l'azione della sovraespressione di Grp94 in cloni stabili di C2C12 sul contenuto di Ca^{2+} dei depositi, tale parametro è stato misurato in modo specifico all'interno del RE, utilizzando come sonda la proteina equorina direzionata al RE (AEQ RE). L'equorina è una fotoproteina Ca^{2+} sensibile che è in grado di emettere luce in seguito al legame con il Ca^{2+} : l'interazione irreversibile con tre ioni Ca^{2+} a livello di siti specifici della porzione proteica dell'Equorina determina il distacco irreversibile del gruppo prostetico sotto forma di celenteramide e l'emissione di fotoni (Montero, et al., 1995). Diversamente dall'indicatore fluorescente fura-2, che permette di prendere in considerazione l'entità del rilascio del Ca^{2+} dai depositi per singole cellule, l'analisi con equorina fornisce l'entità della variazione del calcio in una popolazione cellulare. L'equorina specificamente indirizzata al RE, un compartimento ad alto contenuto di Ca^{2+} , al momento della sua ricostituzione (vedi Materiali e Metodi) verrebbe subito consumata irreversibilmente. Per risolvere questo problema, nelle misure della concentrazione di calcio all'interno del RE ($[Ca^{2+}]_{re}$), la fotoproteina viene ricostituita in modo particolare. Innanzi tutto viene utilizzata una celenterazina che conferisce minor affinità per il Ca^{2+} all'equorina ricostituita (celenterazina N; Montero et al, 1995). Inoltre, le cellule trasfettate vengono incubate a 4°C per un'ora in una soluzione fisiologica priva di Ca^{2+} e contenente, oltre al gruppo prostetico, lo ionoforo ionomicina (5 μ M) ed EGTA (600 μ M). In questo modo il RE rimane svuotato del suo contenuto di Ca^{2+} , grazie alla costante presenza di ionomicina, in un mezzo privo di Ca^{2+} esterno, e la fotoproteina, durante il periodo di ricostituzione, non viene consumata. Le cellule vengono, quindi, lavate ripetutamente con una soluzione contenente albumina sierica bovina (BSA) al 2%,

al fine di eliminare la ionomicina e quindi perfuse per alcuni minuti con una soluzione fisiologica priva di Ca^{2+} . All'aggiunta di una soluzione contenente CaCl_2 (1mM), si osserva un rapido aumento del segnale fino al raggiungimento di una fase di plateau (livello a, fig. 28), corrispondente alla concentrazione intraluminare di Ca^{2+} . Successivamente, le cellule vengono perfuse con CPA (20 μM): il segnale, in questo caso, cala molto bruscamente per raggiungere nuovamente i valori basali iniziali, ossia il compartimento in esame (RE) si svuota completamente.

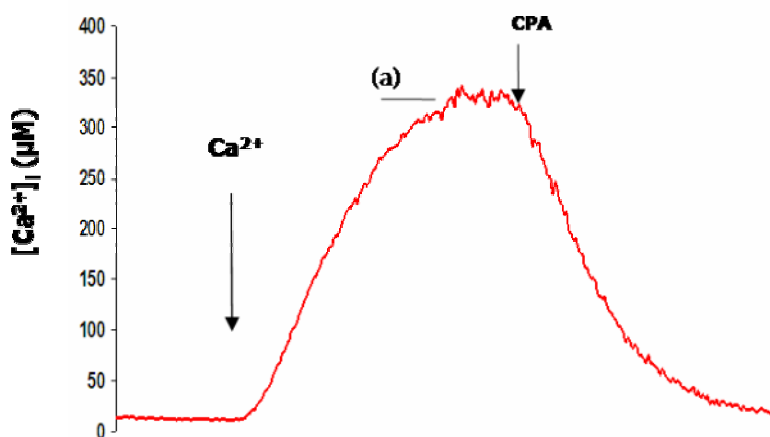


Figura 28. Analisi della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ in cloni C2C12 con equorina di reticolo. La traccia rappresenta il protocollo utilizzato per l'analisi della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$, effettuata in cloni 8/2A11. Dopo ricostituzione dell'equorina in un mezzo privo di Ca^{2+} e contenente ionomicina, le cellule vengono perfuse con un mezzo contenente Ca^{2+} (1mM) per misurare il riempimento dei depositi (livello a). Viene successivamente aggiunto CPA (20mM) per determinare lo svuotamento dell'organello e misurare la percentuale di Ca^{2+} rilasciata.

Sono state studiate cellule C2C12 sovraesprimenti Grp94 dopo trasfezione stabile o transiente. In particolare, la verifica dei risultati, ottenuti in precedenza con il fura-2, è stata effettuata solo nel clone 8/2A11 sovraesprimente Grp94: solo questo clone, infatti, rispetto agli altri cloni esaminati, sovraesprime significativamente Grp94 e non presenta variazioni significative di espressione per le altre proteine del RE come Grp78 e Calreticulina (CRT) (Tabella 3). La sovraespressione di quest'ultime, note come proteine leganti calcio ed espresse nel RE, potrebbe influenzare ed alterare eventuali correlazioni tra la variazione dell'omeostasi del calcio e la sovraespressione di Grp94 nella cellula.

Quindi, cellule C2C12 sono state trasfettate transientemente con il costrutto codificante per Grp94 (plasmide PBKrsv8A contenente cDNA di Grp94) o con il costrutto di controllo (vettore vuoto PBKrsv). Attraverso analisi Western Blot è stata valutata, la presenza di sovraespressione di Grp94 pari a circa 3 volte i valori di controllo (figura 19). Ottenuta una discreta efficienza di trasfezione delle cellule, è stato possibile valutare la concentrazione di Ca^{2+} a livello dei depositi intracellulari trasfettando transientemente i cloni C2C12, esprimenti stabilmente Grp94 e relativo clone di controllo, con il cDNA per AEQ RE (cfr Materiali e metodi).

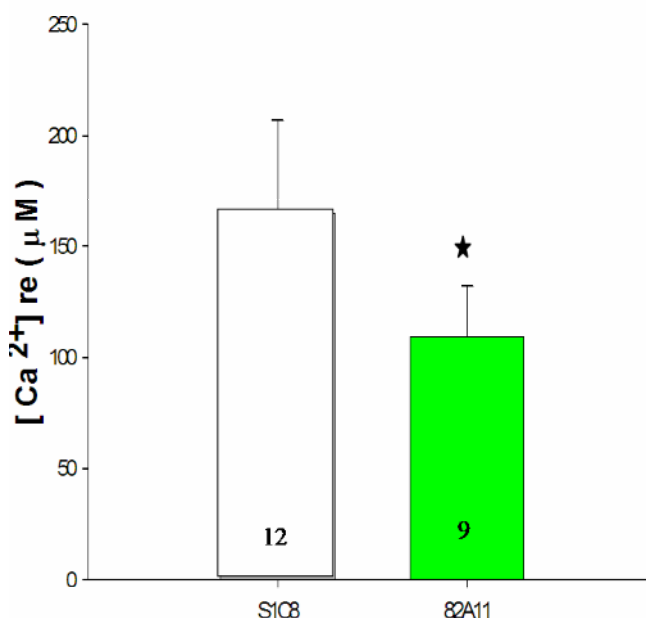


Figura 29. Effetto della sovraespressione di Grp94 in cloni C2C12 sul contenuto di Ca^{2+} all'interno del RE determinati con equorina direzionata al reticolo (ER AEQ). Il pannello riporta i valori dell'analisi statistica di $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ del clone 8/2A11 sovraesprimente stabilmente la Grp94 rispetto al controllo S1C8 (livello a della figura 28). I numeri scritti all'interno della colonna indicano il numero di esperimenti effettuati. (t-test, * $p \leq 0,01$)

Il razionale di questo approccio è stato quello di verificare se la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ viene influenzata dalla sovraespressione di Grp94. La figura 29 riporta i risultati statistici (media \pm DS) di quest'analisi relativa al clone 8/2A11 ($109,4 \mu\text{M} \pm 12,7$) e al rispettivo clone di controllo ($164,7 \mu\text{M} \pm 42,3$). In questo esperimento le cellule sono state stimulate con una soluzione CaCl_2 1mM. Nelle cellule trasfettate stabilmente con Grp94, è stata riscontrata una diminuzione significativa

di circa il 34% (t-test, $p < 0,01$) nei valori di $[Ca^{2+}]_{re}$; questo dato conferma ulteriormente il risultato ottenuto, nel medesimo modello cellulare, con l'indicatore fluorescente fura-2. Si può concludere che la sovraespressione di Grp94 nel clone 8/2A11 influenzi direttamente il contenuto di Ca^{2+} nei depositi intracellulari.

Per confermare l'effetto sull'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} riscontrato nel clone sovraesprimente stabilmente Grp94, la stessa proteina è stata espressa in cellule C2C12 attraverso una co-trasfezione transiente con il cDNA per AEQ ER. Questo tipo di approccio sperimentale permette di escludere eventuali fenomeni adattativi degli stessi, che potrebbero essere erroneamente interpretati come proprietà intrinseche della proteina in l'utilizzo dell'AEQ ER è stato scelto per il vantaggio di misurare direttamente il contenuto di Ca^{2+} in popolazione cellulare; inoltre, è stato dimostrato che due proteine ricombinanti, co-trasfettate transientemente, sono efficacemente espresse nel medesimo tipo cellulare (Brini et al.,1995).

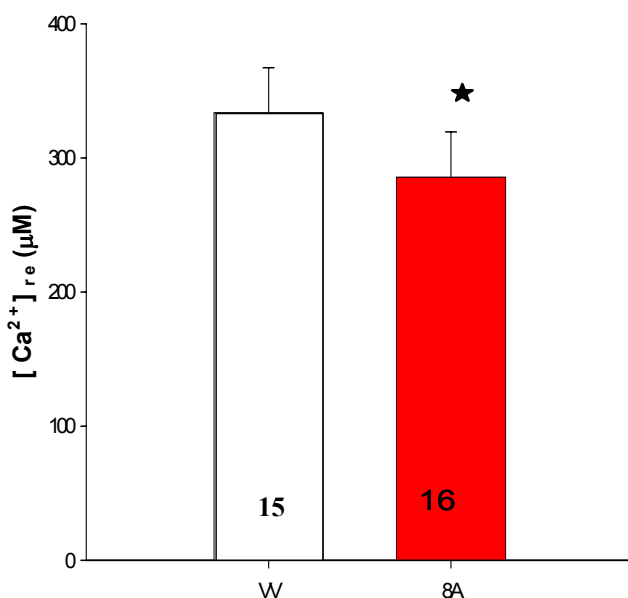


Figura 30. Effetto della sovraespressione transiente di Grp94 nelle cellule C2C12 con equorina direzionata al reticolo (ER AEQ). Il pannello riporta i valori dell'analisi statistica relativi alla $[Ca^{2+}]_{re}$ delle C2C12 sovraesprimenti transientemente Grp94 (8A) rispetto al controllo (vettore vuoto VV) (livello a della figura 28) co-trasfettate con AEQ ER. Le cellule sono state perfuse con una soluzione $CaCl_2$ 1mM. I numeri scritti all'interno della colonna indicano il numero di esperimenti effettuati. Valore t-test, $*p \leq 0,01$

Per verificare l'effetto della sovraespressione di Grp94 sul contenuto di Ca^{2+} dei depositi intracellulari è stato utilizzato il medesimo protocollo sperimentale, descritto in figura 28, stimolando le cellule con una soluzione CaCl_2 1 mM.

La figura 30 riporta i risultati statistici (media \pm DS) relativi alla $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ delle C2C12 in cui è stata indotta sovraespressione transiente di Grp94 (8A: $285,5 \mu\text{M} \pm 33,9$) rispetto a cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto (vv: $333,6 \mu\text{M} \pm 33,6$). nelle cellule sovraesprimenti Grp94 è stata riscontrata una diminuzione significativa di circa il 14% (t-test, $p \leq 0,05$) nei valori di $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ raggiunti in seguito al riempimento totale del RE.

In parallelo è stato effettuato lo stesso esperimento in C2C12 con la sola differenza che è stata utilizzata per la perfusione una soluzione contenente CaCl_2 allo 0,1 mM (figura 31). Questo comporta una più lenta cinetica, nell'aumento del segnale fino al raggiungimento della fase di plateau (livello a, fig. 28), permettendo di analizzare in modo più accurato l'attività della pompa SERCA, ossia valutando l'efficienza della velocità di entrata dello ione Ca^{2+} dal citosol al lume del RE, nelle cellule sovraesprimenti Grp94 rispetto al controllo.

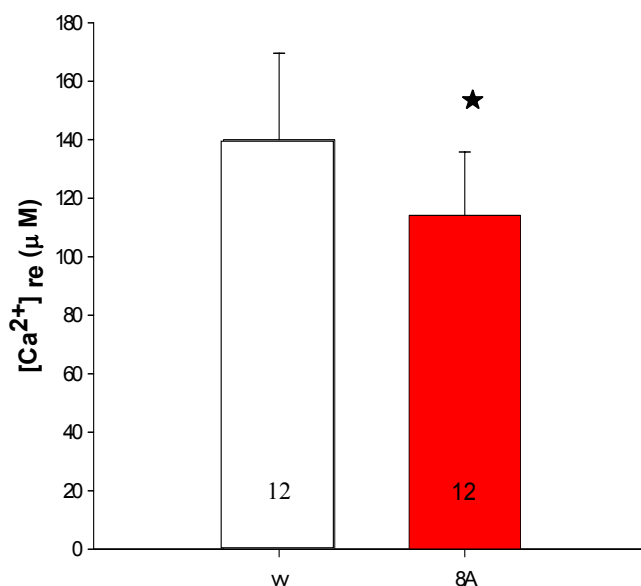


Figura 31. Effetto della sovraespressione transiente di Grp94 nelle cellule C2C12 con equorina direzionata al reticolo (ER AEQ). Il pannello riporta i valori dell'analisi statistica relativi alla $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{re}}$ delle C2C12 sovraesprimenti transientemente Grp94 (8A) rispetto al controllo (vettore vuoto VV) (livello a della figura 28) co-trasfettate con AEQ ER. Le cellule sono state perfuse con una soluzione CaCl_2 0,1 mM. I numeri scritti all'interno della colonna indicano il numero di esperimenti effettuati. Valore t-test, $*p \leq 0,05$

La figura 31 riporta i risultati statistici (media \pm DS) relativi alla sovraespressione transiente di Grp94 (8A, 114,16 μ M \pm 21,7) in cellule C2C12 rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto (vv, 140 μ M \pm 21,7). Ancora una volta nelle cellule sovraesprimenti Grp94 è stata riscontrata una diminuzione significativa di circa il 20% (t-test, $p < 0,05$) nei valori di $[Ca^{2+}]_{re}$ raggiunti in seguito al riempimento totale del RE: questo dato conferma, ulteriormente, il risultato ottenuto con l'indicatore fluorescente fura-2 e con la fotoproteina AEQ ER nei cloni di C2C12. Si può concludere che la sovraespressione transiente di Grp94 in cellule C2C12 riduce la $[Ca^{2+}]_{re}$, allo stesso modo della sovraespressione stabile della stessa proteina, escludendo così il contributo di altri eventi adattativi nei cloni di C2C12 sovraesprimenti Grp94.

Per verificare se l'effetto della sovraespressione transiente di Grp94 sull'omeostasi cellulare del Ca^{2+} sia indipendente dal tipo cellulare studiato, abbiamo utilizzato due linee cellulari umane non miogeniche come HeLa e HEK 293. Anche in questo caso il cDNA per Grp94 (e parallelamente il relativo vettore vuoto, pbkrsv) è stato co-trasfettato transiente con il cDNA per AEQ RE. Inoltre, le linee cellulari HeLa ed HEK293 si trasfettano facilmente con resa elevatissima (cfr Materiali e metodi).

La sovraespressione di Grp94 nelle due linee cellulari non miogeniche è stata verificata, dopo trasfezione transiente, attraverso analisi di Western blotting e quantificata per densitometria (figura 32). L'analisi statistica (media \pm ES) in cellule HeLa di controllo (vv: 1 \pm 0,28) e sovraesprimenti Grp94 (8A: 2,4 \pm 0,86) indica che l'espressione è circa 2,5 volte superiore al controllo (t-test $p = 0,05$); mentre in cellule HEK293 l'espressione è circa il 50% superiore ai livelli osservati nelle corrispondenti cellule di controllo.

L'analisi del contenuto di Ca^{2+} dei depositi intracellulari è stata compiuta utilizzando il medesimo protocollo sperimentale descritto in figura 28, perfondendo le cellule con una soluzione contenente $CaCl_2$ 1mM.

La figura 33 riporta i risultati statistici (media \pm DS) dell'analisi del contenuto di Ca^{2+} dei depositi intracellulari relativi alla sovraespressione transiente di Grp94 sia in cellule HeLa (500 μ M \pm 40,9 vs 508 μ M \pm 21,4 per cellule sovraesprimenti e di controllo, rispettivamente) che in cellule HEK293 (409 μ M \pm 39,7 vs 372 μ M

$\pm 57,8$ per cellule sovraesprimenti e di controllo, rispettivamente). Nelle cellule non miogeniche sovraesprimenti Grp94 non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nei valori di $[Ca^{2+}]_{re}$. Questi dati si discostano quindi dai risultati ottenuti in cellule miogeniche C2C12.

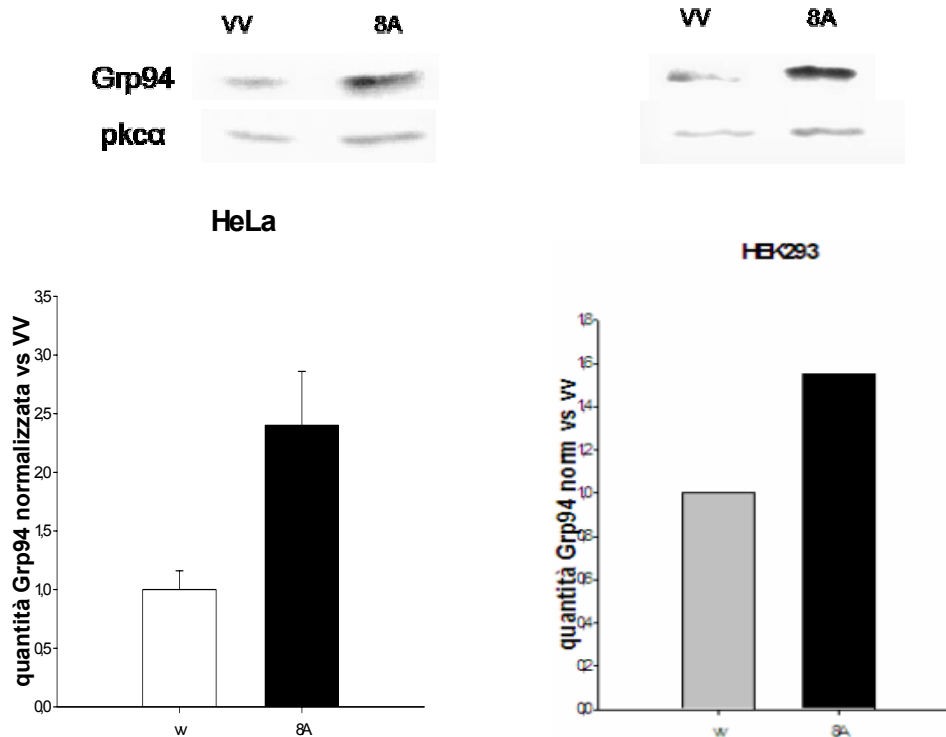


Figura 32. Cellule HeLa e HEK293 trasfettate transientemente con il cDNA Grp94 mostrano aumentati livelli di espressione della proteina rispetto al controllo. L'istogramma rappresenta i valori di densitometria della banda corrispondente a Grp94 in seguito a Wester blotting (pannelli in alto; La reattività per pKc- α è stata utilizzata per la normalizzazione) di due tipologie cellulari esprimenti transientemente la proteina Grp94 (8A, nero) rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il solo vettore vuoto (vv, grigio).

L'uso della sonda AEQ direzionata al RE permette di misurare anche la velocità di entrata di Ca^{2+} nel RE, cioè l'attività della pompa SERCA. L'analisi della tangente alla curva, ottenuta dopo perfusione delle cellule con la soluzione contenente $CaCl_2$ 0,1mM (figura 34) evidenzia l'efficienza di entrata dello ione Ca^{2+} , dal citosol al RE, da parte della pompa SERCA.

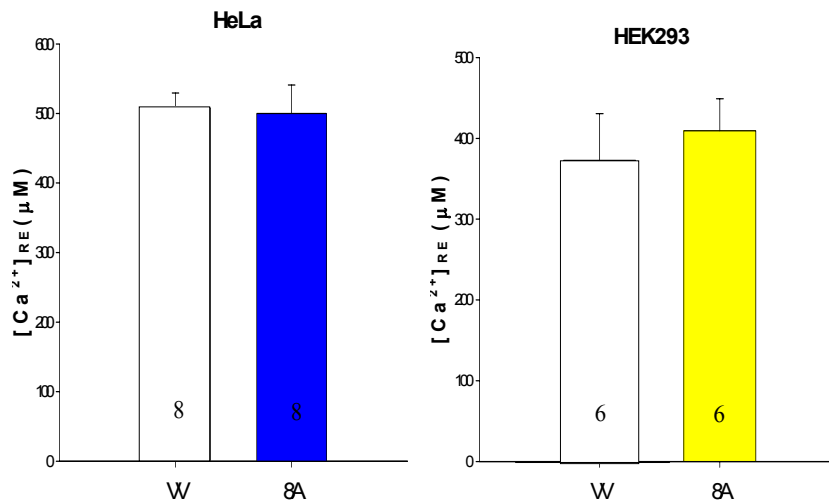


Figura 33. Effetto della sovraespressione transiente di Grp94 in cellule non miogeniche HeLa e HEK293 sui livelli intracellulari di Ca²⁺ analizzati con equorina direzionata al reticolo (ER AEQ). Il pannello riporta i valori statistici dell'analisi della [Ca²⁺]_{re} delle cellule sovraesprimenti transientemente Grp94 (8A) rispetto al controllo (vettore vuoto vv) (livello a della figura 28) co-trasfettate con AEQ ER. I numeri scritti all'interno delle colonne indicano il numero di esperimenti effettuati per ciascuna condizione.

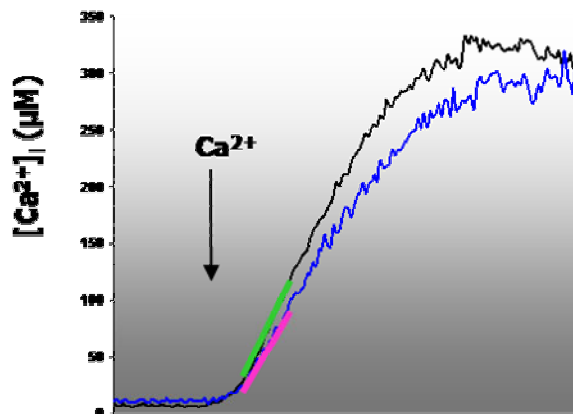


Figura 34. Metodo di analisi per la valutazione dell'uptake di calcio da parte della pompa SERCA in cellule C2C12 trasfettate transientemente con Grp94. Il pannello mostra un esperimento rappresentativo dove le cellule sovraesprimenti Grp94 (traccia blu) mostrano una pendenza inferiore della tangente alla curva (retta rosa) rispetto a quella delle cellule di controllo (retta verde) trasfettate con il solo vettore vuoto (traccia nera).

La figura 35 riporta l'analisi statistica dell'attività di SERCA nel clone 8/2A11 e relativo controllo, in precedenza analizzati, attraverso trasfezione transiente con il cDNA per AEQ RE (figura 29). Vengono mostrati i risultati statistici del coefficiente angolare m (dove il valore del parametro m nell'equazione della retta $y = mx + q$, rappresenta la tangente dell'angolo formato dalla retta con l'asse x (media \pm ES) dell'analisi cellule C2C12 sovraesprimenti stabilmente Grp94 (clone 8/2A11) ($m = 2,5 \pm 0,5$) rispetto alle cellule di controllo (clone S/1C8) ($m = 2,1 \pm 0,3$). Nelle cellule sovraesprimenti Grp94 è stata riscontrata una tendenza alla diminuzione di circa il 14,6 %, anche se non significativa, per l'attività di SERCA rispetto al clone di controllo. C'è da sottolineare che l'analisi è stata fatta in condizioni di perfusione delle cellule con soluzione CaCl_2 1mM e perciò, il dato può considerarsi meno accurato rispetto a quello ottenibile con un'analisi effettuata a concentrazioni di Ca^{2+} minore (0,1 mM).

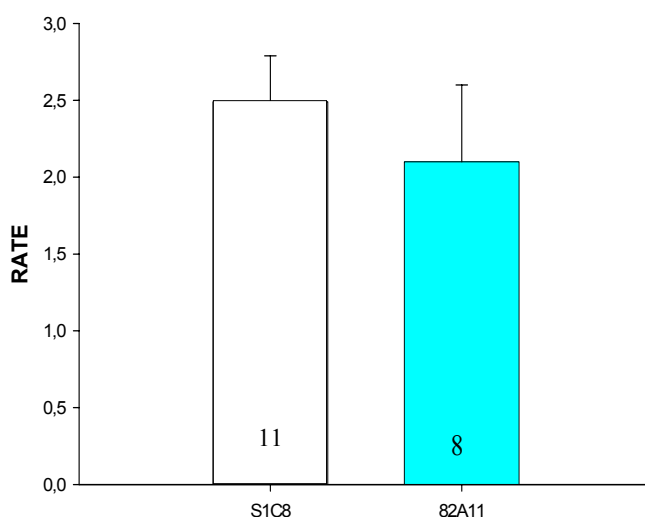


Figura 35. L'effetto della sovraespressione stabile di Grp94 nelle cellule C2C12 suggerisce una tendenza alla riduzione dell'attività di SERCA-2. L'istogramma rappresenta l'analisi statistica dello studio della pendenza (rate) della tangente iniziale alla curva in cellule C2C12 sovraesprimenti stabilmente Grp94 (clone 8/2A11) rispetto alle cellule di controllo (clone S/1C8). I numeri all'interno delle colonne indicano il numero di esperimenti presi in considerazione per l'analisi.

La figura 36 riporta i risultati statistici del coefficiente angolare m (media \pm DS) dell'analisi in cellule C2C12 sovraesprimenti transientemente Grp94 ($m = 0,60 \pm 0,12$) rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il solo vettore vuoto ($m = 0,76 \pm 0,12$).

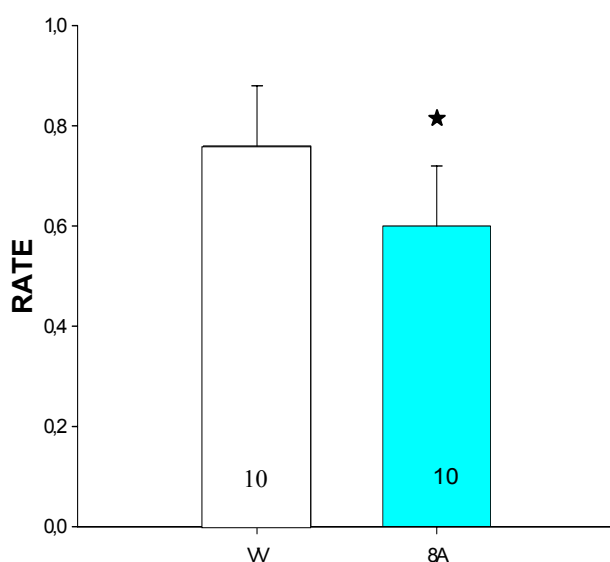


Figura 36. L'effetto della sovraespressione transiente di Grp94 nelle cellule C2C12 suggerisce una significativa riduzione dell'attività di SERCA-2. L'istogramma rappresenta l'analisi statistica dello studio della pendenza (rate) della tangente iniziale alla curva in cellule C2C12 sovraesprimenti transientemente Grp94 (8A) rispetto alle cellule di controllo (vv). I numeri all'interno delle colonne indicano il numero di esperimenti presi in considerazione per l'analisi. Valore t-test, * $p \leq 0,01$

Come si può notare nelle cellule sovraesprimenti Grp94 è stata riscontrata una diminuzione significativa di circa il 20% (t-test, $p < 0,01$) di questo parametro. Si può concludere quindi che la sovraespressione stabile e transiente di Grp94 in cellule C2C12 riduce la $[Ca^{2+}]_{re}$ probabilmente attraverso la modulazione dell'attività della pompa Serca nel RE.

L'analisi dell'attività della pompa SERCA è stata estesa anche alla linea cellulare non miogenica HeLa, condotta perfondendo le cellule con un soluzione contenente $CaCl_2$ 0,1mM.

Contrariamente a quanto si evidenzia nelle cellule miogeniche C2C12, non è stata evidenziata nessuna differenza significativa nell'attività della pompa SERCA ($m =$

1,62 ± 0,3 vs 1,68 ± 0,18 per cellule di controllo e sovraesprimenti Grp94, rispettivamente).

Si può concludere che la sovraespressione di Grp94 in linee cellulari non miogeniche, come HeLa ed HEK293, non modifica il contenuto di Ca²⁺ nel reticolo, nè modula l'attività della pompa SERCA, suggerendo che l'effetto sull'omeostasi del calcio associato alla sovraespressione di Grp94, presenta caratteristiche specifiche per la linea cellulare miogenica C2C12.

2.3.3 Effetto sull'omeostasi intracellulare di Ca²⁺ della sovraespressione transiente di forme delete di Grp94 in cellule C2C12.

La sovraespressione stabile e transiente di Grp94 in cellule C2C12 influenza la [Ca²⁺]_{re}, probabilmente attraverso la modulazione dell'attività della pompa SERCA. Allo scopo di determinare le caratteristiche permissive dell'interazione Grp94/SERCA2 e di identificare il dominio proteico di Grp94 coinvolto, sono stati condotti degli esperimenti utilizzando forme delete di Grp94 per la sovraespressione in C2C12.

In laboratorio sono stati preparati due costrutti codificanti per Grp94 (6B, 7B) che presentano delezioni progressivamente più estese della porzione N-terminale: il costrutto 6B (573-781aa) coinvolge e mantiene parte del dominio di interazione proteina-proteina KEKE, mentre il costrutto 7B (474-781aa) determina una delezione della proteina subito dopo il dominio leucin zipper in cui si trovano i siti di glicosilazione (Argon, 2001) (figure 37 e 38).

Per verificare l'effetto dell'espressione transiente dei costrutti deleti per Grp94 (pbkrsv 6B e pbkrsv 7B) sull'omeostasi cellulare del Ca²⁺ in cellule C2C12, questi ultimi, e il relativo vettore vuoto (pbkrsv), sono stati co-trasfettati transientemente con cDNA per AEQ ER in cellule C2C12 (cfr Materiali e metodi). Il protocollo sperimentale utilizzato è stato quello descritto in figura 28, perfondendo le cellule con una soluzione contenente CaCl₂ 0,1 mM (figura 40).

L'avvenuta espressione è stata verificata attraverso analisi di Western blotting utilizzando il doppio Tag VSV-G presente nella sequenza proteica come epitopo riconoscibile dagli anticorpi (Figura 39).

Delezione N-term Grp94

Restrizione Endogena

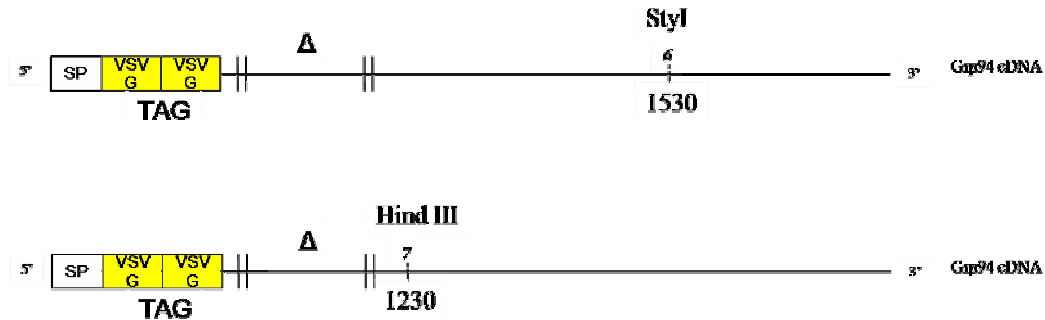


Figura 37. Schema riassuntivo dei costrutti deleti utilizzati per Grp94. La sequenza cDNA per la Grp94 di coniglio è stata sottoposta a restrizione enzimatica con delezioni progressivamente più estese comprendenti la regione N-terminale (Argon, 2001). Ciascun costrutto deleto ottenuto (pbkrsv 6B e pbkrsv 7B) contiene una sequenza per il peptide segnale di topo per Grp94 (SP 21aa) e una doppia sequenza codificante per l'epitopo VSV-G (13 aa) al N-terminale (cfr Materiali e metodi) per il riconoscimento con anticorpi anti VSV-G.

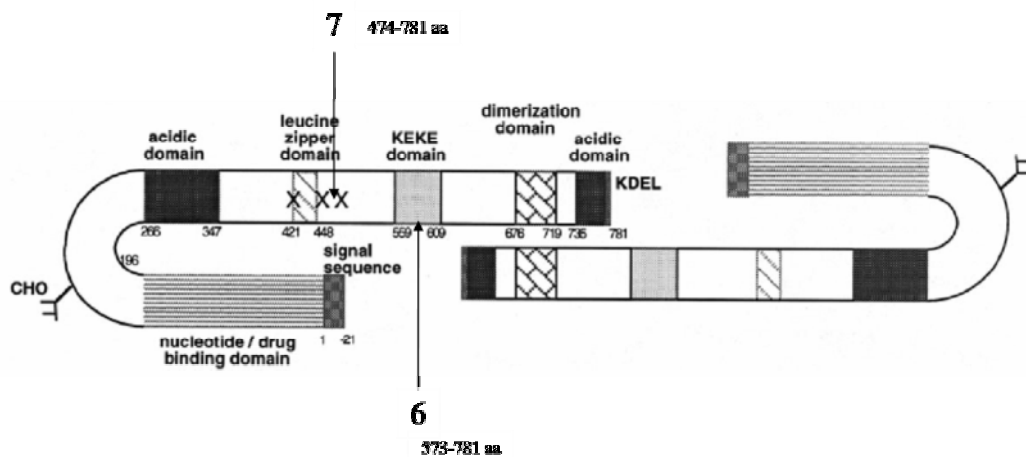


Figura 38. Modello di struttura proteica per Grp94. La proteina è raffigurata come un dimero di monomeri a forma di bastoncino ripiegato, che si associano attraverso il dominio di dimerizzazione. La sequenza segnale N-terminale e il tetrapeptide KDEL al C terminale indirizzano Grp94 al RE. Il dominio N-terminale della proteina matura contiene il sito di legame per i farmaci e il nucleotide ATP, l'oligosaccaride (CHO; aa Asp196). Il dominio (in grigio) contiene una serie di aminoacidi adiacenti con carica opposta e il motivo di interazione con i substrati proteici KEKE in cui sono evidenziate, con delle frecce, le porzioni aminoacidiche delete rispettivamente per il costrutto 6B:573-781aa e 7B:474-781aa. Il dominio leucine zipper invece contiene i tre siti di glicosilazione visualizzati con la lettera X (Argon and Simen 1999).

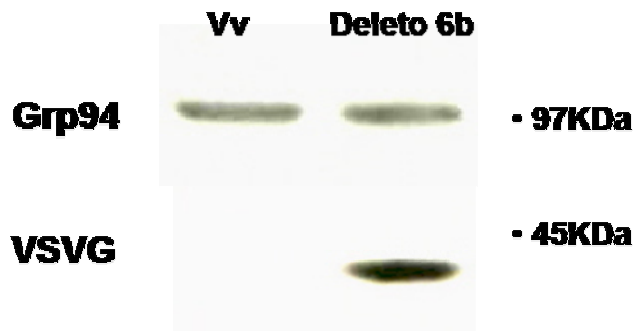


Figura. 39: Cellule C2C12 trasfettate transientemente con il cDNA deleto per Grp94 rispetto alle cellule di controllo. La foto mostra l'analisi western blotting in cellule C2C12 trasfettate transientemente con uno dei costrutti deleti per Grp94 (pbkrsv 6b) utilizzando un anticorpo che riconosce il doppio tag VSVG (40Kda), rispetto alle cellule di controllo (VV) trasfettate con il vettore vuoto pbkrsv, in cui il tag è assente.

La figura 40 riporta i risultati statistici (media \pm DS) di quest'analisi. Nelle cellule esprimenti la Grp94 deleto è stata riscontrata una diminuzione significativa nei valori di $[Ca^{2+}]_{re}$ (7B: $69,6 \mu M \pm 7,2$; 6B : $74,1 \mu M \pm 8,3$; controllo $107,6 \mu M \pm 38$).

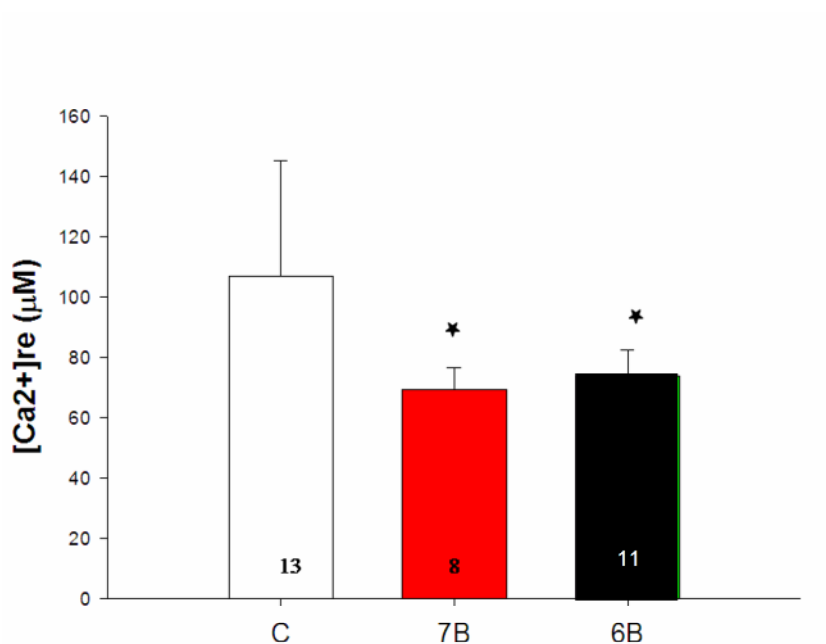


Figura 40. Effetto della sovraespressione transiente di costrutti deleti per Grp94 in cellule C2C12 sul contenuto di Ca²⁺ intracellulare stimato con equorina direzionata al reticolo (ER AEQ). Il pannello riporta i valori di $[Ca^{2+}]_{re}$ delle cellule sovraesprimenti transientemente il costrutto deleto per Grp94, 7B e 6B, rispetto al controllo (vettore vuoto C) (livello a della figura 28). Le cellule C2C12 sono state co-trasfettate con AEQ ER. I numeri scritti all'interno delle colonne indicano il numero di esperimenti effettuati per ciascuna condizione. Valore t-test, * $p \leq 0,01$.

Questi dati confermano ulteriormente i risultati ottenuti in cellule miogeniche C2C12 sovraesprimenti l'intera proteina Grp94. Quindi il dominio proteico responsabile di un'interazione modulatoria Grp94/SERCA2 non è localizzato a livello delle regioni delete (6B:573-781aa e 7B:474-781aa), infatti il risultato suggerisce che la regione con funzioni regolatrici è vicina al sito di dimerizzazione carbossiterminale (Figura 38).

È stata anche effettuata l'analisi di attività della pompa SERCA. La figura 41 riporta i valori statistici (media \pm DS) di questo parametro (tangente alla curva nei primi minuti di uptake di Ca^{2+} , Figura 34) calcolato in cellule C2C12 sovraesprimenti transientemente i costrutti delete 7B ($m = 0,14 \pm 0,02$; t-test, $p = 0,02$), 6B ($m = 0,16 \pm 0,07$; t-test, $p = 0,065$) e in cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto ($m = 0,23 \pm 0,09$).

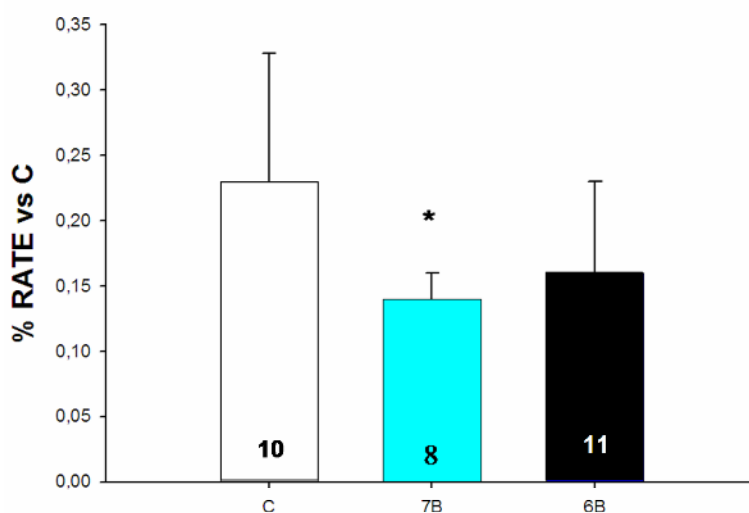


Figura 41. Effetto della sovraespressione transiente dei costrutti delete per Grp94 in cellule C2C12 sull'attività della pompa SERCA. L'istogramma rappresenta l'analisi statistica dei valori della tangente iniziale alla curva di uptake di Ca^{2+} (fig. 34) in cellule C2C12 sovraesprimenti i costrutti delete 7B e 6B per Grp94 rispetto a cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto (c). I valori sono stati normalizzati rispetto al valore medio calcolato in cellule di controllo. I numeri all'interno delle colonne indicano il numero di esperimenti presi in considerazione per l'analisi in ciascuna condizione.

Si può quindi concludere che la sovraespressione transiente, in cellule C2C12, di entrambi i due costrutti deleti per Grp94, 6B e 7B, influenza la $[Ca^{2+}]_{re}$, che risulta significativamente ridotta rispetto alle cellule di controllo. Mentre, con i dati fino ad ora disponibili, l'attività di SERCA risulta significativamente diminuita dopo trasfezione con il costrutto 7B, mentre per il delecto 6B si riscontra una riduzione con una tendenza alla significatività. Questi dati sono in accordo con i risultati ottenuti con il relativo studio del calcio totale dei depositi (figura 40).

2.4 Interazioni tra Grp94 e altre proteine legate al controllo dell'omeostasi del calcio.

I risultati ottenuti con lo studio dell'omeostasi del calcio ci hanno portato ad ipotizzare che la sovraespressione di Grp94, nelle cellule miogeniche C2C12, induca una modulazione inibitoria dell'attività della pompa SERCA portando alla riduzione della $[Ca^{2+}]_{re}$.

In letteratura esistono evidenze di come crt, in associazione a Grp58, interagisca con SERCA2b modulandone l'attività: crt si lega alla sequenza C-term di SERCA2b

e recluta Erp57 per modulare, in modo Ca^{2+} dipendente, i gruppi tiolici nel Loop L4 e di conseguenza l'attività della pompa (Camacho et al., 1995; Li and Camacho 2004). Sulla base di queste evidenze non si può escludere che Grp94, una proteina chaperone, sia in grado di interagire e modulare la funzione biologica della pompa del calcio di RE o di altri substrati. Il razionale di questo studio è stato quello di dimostrare possibili interazioni di Grp94 con alcune proteine del RE, quali SERCA-2, BiP o crt, mediante esperimenti di co-Immunoprecipitazione (co-IP) (cfr Materiali e Metodi).

2.4.1 Immunoprecipitazioni in presenza e assenza di cross-linking chimico in cellule C2C12 e in altre linee cellulari

L'IP di Grp94 è stata eseguita nei medesimi tipi cellulari usati per lo studio sull'omeostasi del calcio, come C2C12, HeLa ed HEK293 (figura 42).

L'IP di Grp94 nelle cellule C2C12, in presenza o in assenza di cross-linking chimico (CCL), evidenzia la totale co-IP di SERCA-2 con Grp94 e mostra un

arricchimento del segnale di SERCA2 nelle cellule C2C12 (fig. 42, lane 7, blot in alto) comparate al lisato totale (fig. 42, lane 9). Il risultato ottenuto anche in presenza di cross-linking chimico dimostra che il legame tra le due proteine è specifico e non dovuto ad interazioni non-specifiche che avvengono durante la lisi cellulare. Poiché la sovraespressione di Grp94 non ha determinato nessuna differenza significativa del contenuto totale di Ca^{2+} dei depositi in cellule HeLa ed HEK293, lo studio di Ip è stato esteso anche a queste due linee cellulari per determinare se esistono differenze con le C2C12.

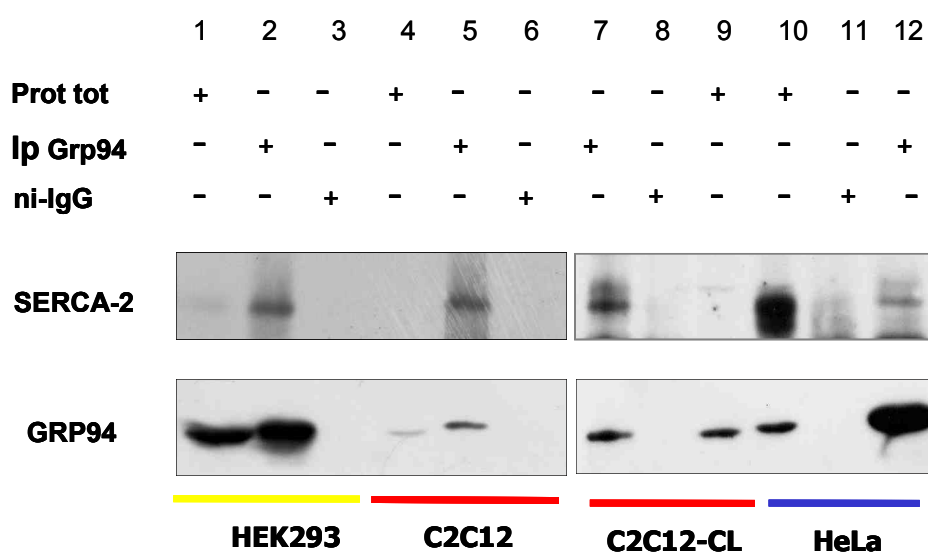


Figura 42. Immunoprecipitazione di Grp94 con SERCA-2 in C2C12 e in linee cellulari non miogeniche come HeLa e HEK293. Il pannello mostra il segnale per SERCA2 (anti-Serca ATPasi IID8 ABR) (blot in alto) individuato dopo immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Grp94 (3c4) in tutte le linee cellulari studiate HeLa, HEK293 e in C2C12 in presenza o in assenza di cross linking chimico (CL). L'analisi western blot del lisato proteico totale mostra l'espressione proteica di Grp94 e di SERCA-2: in cellule C2C12 (linea rossa) lane 4, in cellule HeLa (linea blu) lane 10 ed in cellule HEK293 (linea gialla) lane 1, blot in basso e in alto rispettivamente. L'Ip di Grp94 con SERCA-2 in cellule HeLa è evidenziata nella lane 12, blot in alto. In cell HEK293 l'Ip tra le due proteine è mostrata nella lane 2, blot in alto, e tale interazione è presente nelle C2C12 in presenza o meno di CL (lane 5 e 7, blot in alto). I polipeptidi reattivi per Grp94 (98 kDa) e SERCA2 (circa 110-116 kDa) sono stati visualizzati dopo separazione elettroforetica con gel di poliaccrilamide al 7,5%. I campioni per il lisato totale sono stati caricati con 30µg di omogenato totale, mentre per ciascun campione sono stati immunoprecipitati, con l'anticorpo Grp94, 100 µg di lisato proteico totale. Lanes 3,6,8 e 11 corrispondono ai campioni di controllo negativi immunoprecipitati con immunoglobuline non immuni IgG.

In cellule HeLa, l'immunoprecipitazione di Grp94 mostra la presenza di SERCA nel complesso immunoprecipitato evidenziando un'interazione tra le due proteine (fig. 42, lane 12, blot in alto). Però, a differenza delle cellule C2C12, l'analisi WB

del lisato totale mostra che in HeLa il contenuto di SERCA2 (fig. 42), a parità di contenuto proteico totale è notevolmente più elevato (fig. 42, corsia 6 e 10, rispettivamente blot in alto). Nonostante ciò la co-IP di SERCA2 con Grp94 è parziale, cioè solo una piccola parte di molecole di SERCA2 viene immunoprecipitata da Grp94, il cui segnale, arricchito rispetto a quello presente nel lisato totale indica che l'immunoprecipitazione è avvenuta in presenza di quantità adeguate di anticorpo.

Anche in n cellule HEK293 la co-IP di SERCA2 con Grp94 ha rilevato interazione tra le due proteine (fig. 42, lane 2, blot in alto). A differenza delle cellule C2C12, l'analisi WB del lisato totale mostra che il contenuto di Grp94 a parità di contenuto proteico totale, in cellule HEK293 (fig. 42, lane 1, blot in basso), sia molto superiore rispetto alle C2C12. Nonostante ciò, la quantità di SERCA2 dimostrabile dopo IP con Grp94, non sembra mostrare lo stesso arricchimento osservabile dopo immunoprecipitazione con Grp94 nelle cellule C2C12 (fig. 42, lane 1, blot in alto). Si può concludere che SERCA2 coimmunoprecipita con Grp94 in diverse linee cellulari, ma solo nella linea C2C12 vi è un arricchimento di SERCA, suggerendo che gran parte della pompa presente nella cellula interagisce con Grp94.

Il medesimo protocollo di immunoprecipitazione è stato esteso allo studio di un'altra linea cellulare miogenica come H9c2. L'IP di Grp94 in H9c2 evidenzia co-precipitazione di Grp94 e SERCA-2, con un notevole arricchimento del segnale di SERCA 2, se confrontato al lisato totale, (figura 43).

L'analisi western blot del lisato totale mostra come per le cellule H9C2, a parità di contenuto proteico totale, discreta quantità di Grp94 (fig. 43, lane 4 blot al centro) ed una scarsa presenza di SERCA2 (fig. 43, lane 4 blot in alto). L'interazione proteica avviene sia in presenza che in assenza di CCL, ma il segnale con CCL è più forte per SERCA-2, rispetto al segnale di Grp94, in quanto il CCL stabilizza il legame transitorio tra le due proteine SERCA2. Infatti, prova dell'efficacia del cross-linking chimico è la presenza nell'immunoprecipitato anche di BiP, la cui interazione con Grp94 nel complesso chaperone non è generalmente dimostrabile altrimenti.

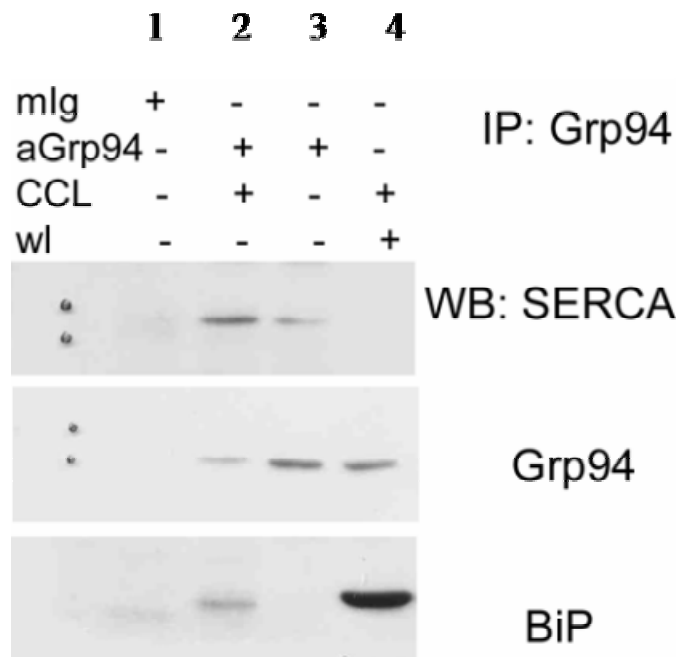


Figura 43. Immunoprecipitazione di Grp94 con SERCA-2 e con Bip in un'altra linea cellulare miogeniche come H9c2. Il pannello mostra il segnale per SERCA2 (anti-Serca atpasi IID8 ABR) (blot in alto) e Bip (anti-Grp78) (blot in basso) individuato dopo immunoprecipitazione (aGrp94, lane 2 e 3) con l'anticorpo anti-Grp94 (2G5) nella linea cellulare H9c2 in presenza o in assenza di cross linking chimico (CCL). L'analisi western blot del lisato totale (wl) in cellule H9c2, evidenzia l'espressione proteica di Grp94 (lane 4, blot al centro), Bip (lane 4, blot in basso) e SERCA-2 (lane 4, blot in alto). L'Ip ha evidenziato una forte interazione di Grp94 con SERCA-2 in presenza o assenza di CCL (lane 2 e 3 rispettivamente, blot in alto). L'Ip di Grp94 con Bip si evidenzia solo in presenza di CCL (lane 2, blot in basso). I polipeptidi reattivi per Grp94 (98 kDa), SERCA2 (circa 110-116 kDa) e Bip (78 kDa) sono stati visualizzati dopo separazione elettroforetica con gel di poliacrilamide al 7,5%. I campioni per il lisato totale sono stati caricati con 30µg di omogenato totale (wl), mentre per ciascun campione sono stati immunoprecipitati, con l'anticorpo Grp94, 100 µg di lisato proteico totale. Lane 1 rappresenta il segnale del campione di controllo negativo immunoprecipitato con immunoglobuline non immuni IgG.

2.4.2 Immunoprecipitazione di Grp94 nel cuore.

Immunoprecipitazioni su campioni di microsomi di ratto.

Per spiegare come Grp94 moduli l'attività di SERCA-2 nelle cellule miogeniche, si è ipotizzato che Grp94 potesse interagire diversamente con le diverse isoforme di SERCA-2 tessuto specifiche; esistono almeno 3 isoforme di questa proteina, derivanti da splicing alternativo di uno stesso trascritto, che differiscono nella sequenza primaria a livello C-terminale. L'isoforma ubiquitaria 2b (115 KDa) è presente in tutti i tipi di cellule eccetto che nel muscolo scheletrico adulto, mentre le isoforme 2a (109,9 KDa) e 2c (109,7 kDa) (Dally et al., 2006) sono altamente

espresse nel tessuto cardiaco, dove invece è scarsamente espressa l'isoforma 2b (circa un 20%). Le cellule HeLa, HEK293 e C2C12 presentano costitutivamente l'isoforma 2b.

Il rationale dell' Ip di Grp94 nei microsomi di cardiomiociti adulti di ratto è stata quella di verificare se l'isoforma 2a interagisse con Grp94. Tuttavia uno dei limiti di questo studio è stato quello di avere a disposizione solo un anticorpo che riconosce tutte e tre le isoforme di SERCA-2 senza discriminazione: l'isoforma 2c co-emigra con la 2a ed è quindi molto difficile distinguerle.

La figura 44, mostra che l'IP precipita una buona quantità di Grp94, a cui si accompagna la presenza di un polipeptide reattivo con anticopri anti-SERCA2, ma con mobilità elettroforetica, più bassa rispetto alla SERCA 2 presente nel lisato totale e che verosimilmente corrisponde all'isoforma 2a. Il peso molecolare apparente di tale banda co-immunoprecipitata sembra corrisponde a quello dell'isoforma 2b, che è presente in quantità ridotte nel miocardio.

Pertanto, l'Ip di Grp94 in microsomi di cuore di ratto evidenzia co-precipitazione con l'isoforma ubiquitaria SERCA-2b, mentre non sembra vi sia alcuna interazione con l'isoforma 2a e/o 2c.

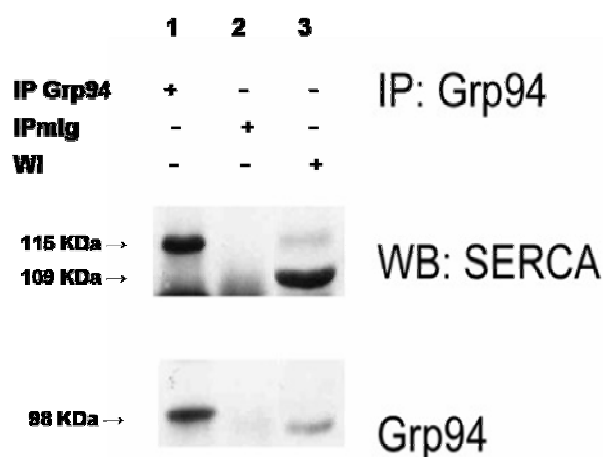


Figura 44. Immunoprecipitazione di Grp94 con SERCA-2 in microsomi di cuore di ratto. Il pannello mostra il segnale per SERCA2 (anti-Serca atpasi IID8 ABR) (blot in alto) individuato dopo immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Grp94 (2G5) in microsomi di cuore di ratto. L'analisi western blot del lisato proteico totale mostra i livelli di espressione di Grp94 (lane 3, blot in basso), di SERCA-2a (109,9 kDa) (lane 3, blot in alto) e di SERCA-2b (115 kDa) (lane 3,blot in alto). L'Ip ha evidenziato interazione tra Grp94 e SERCA2b (lane 1, blot in alto). I polipeptidi reattivi per Grp94 (98 kDa) e le isoforme di SERCA2 sono state visualizzate dopo separazione elettroforetica con gel di poliacrilamide al 7,5%. I campioni per il lisato totale sono stati caricati con 5 µg di omogenato totale (wl), mentre per l'immunoprecipitazione 100 µg di lisato proteico totale. Lane 2 corrisponde al campione di controllo negativo immunoprecipitato con immunoglobuline non immuni IgG.

Immunoprecipitazioni su campioni di cuore umano

L'insorgenza di insufficienza cardiaca sembra essere determinata da alterazioni dell'omeostasi del calcio; diversi sono stati gli studi che dimostrano come sia i livelli di espressione, che l'attività ATPasica di SERCA2 siano ridotti nella cellula del muscolo cardiaco patologico (Meyer et al.,1995), benchè risultati controversi esistano (Flesh et al., 1996; Schmidt et al., 1999). Le ragioni di queste discrepanze non sono chiare, ma potrebbero essere associate alla presenza di diverse isoforme di SERCA2 nel reticolo sarcoplasmatico miocardico; recentemente infatti è stata scoperta una nuova isoforma cardiaca SERCA 2c, la cui sovraespressione sembrerebbe essere associata alla presenza di cardiomiopatie (Dally et al., 2006). Poiché i dati finora ottenuti in questo studio hanno evidenziato, attraverso esperimenti di co-immunoprecipitazione ed analisi dell'omeostasi del Ca^{2+} , una possibile interazione regolatoria di Grp94 con SERCA2 in linee cellulari miogeniche come C2C12 e H9c2, si è deciso di estendere lo studio anche a lisati di cuore umano.

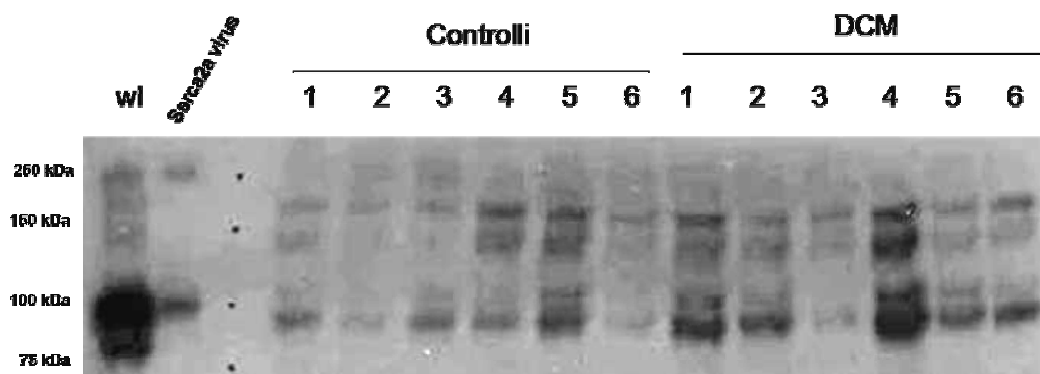


Figura 45. Immunoprecipitazione di Grp94 con SERCA-2 in lisati di cuore di umano. Il pannello mostra il segnale per SERCA2 (anti-Serca atpasi IID8 ABR) individuato dopo immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-Grp94 in lisati di cuore di umano di pazienti normali (controllo) e affetti da DCM. L'analisi western blot evidenzia una un'elevata espressione di SERCA-2 (110-115 kDa) (wl) e come controllo positivo sono stati caricati 3µg di lisato proteico totale di cellule HEK293 trasfettate con l'adenovirus per SERCA2a. I polipeptidi reattivi per SERCA2 sono stati visualizzati dopo separazione elettroforetica con gel di poliaccrilamide al 7,5%. I campioni per il lisato totale sono stati caricati con 30 µg di omogenato totale (wl), mentre per ciascun campione sono stati immunoprecipitati, con l'anticorpo Grp94, 100 µg di lisato proteico totale.

Grazie alla collaborazione del nostro laboratorio con quello della Dott.ssa Federica del Monte, ho trascorso un periodo di stage presso l'Harvard Medical School, Massachusset General Hospital di Boston, in cui ho analizzato, mediante esperimenti di co-IP, la presenza di interazioni tra Grp94 e SERCA-2 in 6 campioni di cuore umano prelevati da soggetti normali e 6 campioni da soggetti affetti da cardiomiopatia dilatativa (DCM) (cfr Materiali e Metodi).

L'IP di Grp94 sia nei lisati di controllo che DCM evidenziano una co-precipitazione di Grp94 con SERCA 2 (110-115 kDa) (figura 45).

Tuttavia l'utilizzo di un anticorpo che non discrimina tra le tre isoforme di SERCA-2 non ha permesso di riconoscere l'isoforma coinvolta.

DISCUSSIONE

Lo studio degli effetti citoprotettivi delle proteine dello stress e dei meccanismi coinvolti è stato effettuato in modelli sperimentali *in vitro*, in cui l'espressione mirata delle proteine dello stress è stata indotta farmacologicamente o in modo specifico mediante trasfezione stabile o transiente di cDNA.

Curcumina per le sue proprietà antiossidanti (Ciolino et al. 1998; Ryter, Alam et al. 2006), antiinfiammatorie (Zhang et al., 1999; Plummer et al. 1999) e antitumorali risulta un potenziale agente terapeutico in molte patologie. Questo polifenolo, utilizzato come trattamento farmacologico a basso dosaggio, non mostra effetti tossici per le cellule (Sharma, Gescher et al. 2005).

Curcumina *in vitro* induce nei mioblasti C2C12 una lieve e specifica risposta allo stress di RE, probabilmente alterando l'omeostasi del calcio attraverso l'inibizione della pompa SERCA, determinando un aumento significativo e selettivo dei livelli di Grp94 (circa il 40%) senza influenzare l'espressione delle altre proteine di RE, come HO-1, crt and Grp78.

Tuttavia il solo pre-trattamento con curcumina, determina nelle C2C12 protezione anti-ossidante dopo esposizione con perossido di idrogeno, ritardando l'ossidazione proteica totale rispetto alle cellule di controllo non trattate. La nostra ipotesi è che l'esposizione farmacologica a Curcumina, nei mioblasti C2C12, possa influenzare l'aumento dell'espressione di Grp94, e quindi indirettamente ritardare l'insorgenza dello stress ossidativo. Tuttavia il reale meccanismo attraverso cui un breve pre-trattamento con curcumina determini l'aumento selettivo di Grp94 resta ancora da chiarire.

L'obiettivo è stato quello di indagare il contributo della sovraespressione di Grp94 alla protezione anti-apoptotica e anti-ossidante in presenza di stimoli apoptotici. Grp94 (glucose-regulated-protein-94) è una proteina dello stress che presenta notevole omologia di sequenza aminoacidica con HSP90 (Mazzarella and Green 1987) e che svolge nel RE, come altre proteine, quali Grp78, crt e le protein disulfide isomerasi (Grp58), funzione di chaperone e di tampone Ca^{2+} grazie alla presenza di numerosi siti di legame per questo ione (Nigam et al., 1994).

Il contributo della sovraespressione di Grp94 nella protezione all'apoptosi è stato studiato mediante esposizione a Staurosporina, un'inibitore delle protein chinasi (Kaufman 2002) (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003); si ricordi infatti che il solo trattamento con A23187 non è in grado di indurre apoptosi in cellule C2C12, ma diretta morte cellulare via necrosi (Vitadello et al., 1998).

Nonostante tutti i cloni di C2C12 abbiano dimostrato sovraesprimere Grp94, solo un clone (8/2A11) non ha presentato modificazioni di espressione delle altre proteine del RE, quali Grp78 e crt.

E' noto infatti che i livelli di espressione di Grp94 o Grp78 sono inversamente correlati all'incidenza di morte cellulare per necrosi o apoptosi dovuta a sovraccarico di Ca^{2+} (Vitadello et al., 2003). Al contrario la sovraespressione di crt determina maggiore suscettibilità all'apoptosi indotta sia da staurosporina sia da taspigargina (un inibitore della pompa SERCA), responsabile quindi di un incremento del Ca^{2+} citosolico (Nakamura et al., 2000). L'effetto della sovraespressione di Grp94 sembra completamente opposto a quello che si verifica per crt: la sovraespressione di quest'ultima proteina chaperone si accompagna ad un incremento della suscettibilità all'apoptosi (Nakamura, Robertson et al. 2001), in quanto è responsabile sia dell'aumento del Ca^{2+} totale nel RE che dello ione associato ai depositi a rilascio rapido (Bastianutto et al., 1995; Lievremont et al., 1997; Nakamura et al., 2000). La minore resistenza all'apoptosi potrebbe essere dovuta all'elevata affinità del legame per il Ca^{2+} caratteristica della crt. Nonostante l'affinità di legame per il Ca^{2+} di Grp94 e Grp78 sia notevolmente inferiore a quella di crt, ambedue le proteine partecipano in modo significativo al controllo dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} , apparentemente favorendone il contenimento di questo ione nel RE (Lievremont et al. 1997; Vitadello et al. 2003). Gli effetti antiapoptotici della sovraespressione di Grp94 nei diversi cloni di C2C12 sono stati evidenziati, dopo trattamento con staurosporina, valutando l'attivazione della Caspasi 3, la cui cinetica di attivazione è risultata ritardata in tutti i cloni sovraesprimenti Grp94. Tuttavia staurosporina agisce attraverso un meccanismo d'azione misto che coinvolge, non solo la via mitocondriale ma anche la via apoptotica di RE (Kaufman 2002) (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003) che comporta il possibile coinvolgimento di Caspasi 12. E' noto infatti che lo stress cellulare, indotto da inibizione delle kinasi, può determinare da una parte

l'attivazione di fattori trascrizionali che potenziano l'apoptosi e dall'altra indurre un rilascio massiccio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari che attiva la proteina calcio dipendente Calpaina. Quest'ultima, attivando a monte la Caspasi 12, porta all'attivazione della Caspasi 9 e, come evento finale, alla Caspasi 3, coinvolgendo così anche la via apoptotica mitocondriale (Kaufman 2002) (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003). Staurosporina induce apoptosi attraverso l'attivazione della via di RE mediante attivazione della caspasi 12, attivazione che risulta significativamente ridotta nei cloni sovraesprimenti Grp94 rispetto al controllo, indicando pertanto la presenza di protezione anti-apoptotica.

I cloni utilizzati presentano modifiche di tipo adattativo, che riguardano anche la variazione dell'espressione di proteine anti-apoptotiche Bcl2 e/o pro-apoptotiche Bax e Serca e aventi effetti opposti sull'omeostasi del calcio: i livelli di SERCA2b e Bcl-2 sono significativamente aumentati nei cloni sovraesprimenti 8/2A11 e 8/3D2 rispetto al clone di controllo S1C8. La sovraespressione di Bcl-2 nel clone 8/2A11 potrebbe spiegare l'aumentata resistenza all'apoptosi in questa linea clonale, tuttavia il concomitante riscontro di un'aumentata espressione di SERCA2b, che in modo opposto a Bcl-2 contribuisce a mantenere elevati i livelli di calcio nel RE, potrebbe aumentare la suscettibilità cellulare all'apoptosi, neutralizzando gli effetti protettivi di Bcl-2.

Nonostante ciò l'uso della trasfezione transiente ha escluso che la protezione anti-apoptotica fosse dovuta alla presenza di concomitanti modificazioni dell'espressione di proteine pro o anti apoptotiche o di altre proteine del reticolo che intervengono nel controllo dell'omeostasi del calcio.

Come per altre proteine chaperone del RE, il legame con il Ca^{2+} è importante nel regolare l'attività e l'interazione con le proteine clienti. In particolare, è stato identificato nel dominio carico al N-terminale di Grp94 un sito ad alta affinità per il calcio, che regolerebbe l'attività di legame del chaperone con i peptidi substrato (Biswas, Sriram et al. 2006). La concentrazione di ione Ca^{2+} sequestrato nel RE rappresenta quindi un fattore importante che influenza l'equilibrio omeostatico della cellula. Grp94 è caratterizzata da una elevata capacità, pur con bassa affinità, di legare calcio, esibendo circa quindici siti di legame per questo ione: quattro apparentemente presentano moderata affinità di legame ($\text{KD} \sim 2\mu\text{M}$) e undici bassa affinità ($\text{KD} \sim 600\mu\text{M}$) (Argon and Simen, 1999). Tale capacità potrebbe

conferire a questa proteina proprietà di tampone e quindi coinvolgerla nella regolazione dell'omeostasi dello ione calcio nel RE.

Dati già presenti in letteratura hanno dimostrato che, cellule miogeniche stabili di C2C12 e H9C2 sovraesprimenti Grp94, dopo esposizione a stress indotto da A23187 o mediante ischemia, presentano diminuzione della mortalità cellulare dovuta a necrosi (Vitadello et al., 2003). Inoltre anche in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, trattate con lo stesso ionoforo, si osserva un effetto protettivo della sovraespressione di Grp94 contro la morte indotta da apoptosi, mentre la riduzione dei livelli di Grp94 è caratterizzata da un significativo aumento della mortalità cellulare (Bando et al., 2004).

La localizzazione endoluminale consentirebbe alle molecole di Grp94 di legare lo ione Ca^{2+} all'interno del RE interferendo con il suo rilascio e rallentando così l'incremento della concentrazione intracellulare/citosolica di calcio libero ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) derivante da tale deposito (Vitadello et al., 2003; Bando et al., 2004). Grp94 sembra esercitare quindi un particolare ruolo nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} e di conseguenza nei meccanismi responsabili della citoprotezione.

Le conoscenze attuali su Grp94, anche se scarse, non escludono tuttavia l'intervento di altri meccanismi di protezione antiapoptotica. Grp94 potrebbe interagire e modulare la funzione biologica di proteine associate al RE e con effetti sull'omeostasi del Ca^{2+} , come la pompa ATPasica SERCA e i canali di rilascio del calcio sensibili alla rianodina o all'inositolo trifosfato (Demaureux et al., 2003).

Poiché alterazioni dell'omeostasi del calcio potrebbero generare o aumentare sia la suscettibilità cellulare all'apoptosi o allo stress ossidativo, sono stati analizzati gli effetti della sovraespressione, sia stabile che transiente, di Grp94 sui livelli di calcio nel RE e sulla sua cinetica di rilascio dal RE in cellule miogeniche C2C12 e in altre linee cellulari.

Tutti i cloni C2C12 studiati sovraesprimenti Grp94, utilizzati nello studio di citoprotezione anti-apoptotica, presentano una diminuzione significativa del contenuto di Ca^{2+} nei depositi rispetto alle cellule del clone di controllo. Il medesimo risultato è stato ottenuto nelle C2C12 in condizioni di sovraespressione transiente di Grp94, escludendo possibili fenomeni adattativi dei cloni stessi.

Interessante è stato riscontrare come, la diminuzione del contenuto di calcio dei depositi si associ alla presenza di protezione antiossidante: la sovraespressione stabile di Grp94 sembra avere un effetto protettivo ed inibitorio anche sull'insorgenza dello stress ossidativo, rispetto al clone di controllo, in seguito a trattamento per tempi brevi con dosi acute di perossido di idrogeno.

Scopo di questo studio è stato anche quello di chiarire i meccanismi molecolari attraverso cui la sovraespressione di Grp94 contrasti il danno ossidativo nelle C2C12 inducendo citoprotezione.

E' noto che Grp94 esiste nel RE in forma endoluminale (Argon et al. 1999), anche se esistono evidenze che mostrano una sua localizzazione transmembrana (Mazzarella and Green, 1987). Studi effettuati su cellule C2C12 mostrano che la quantità di Grp94 con localizzazione transmembrana è di circa il 10% (Frasson M, Vitadello M, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pinna L, Gorza L, Donella-Deana A, manoscritto in corso di revisione). Questa localizzazione apre la possibilità ad interazioni con le proteine situate sul versante citosolico del RE e determinanti il rilascio di Ca^{2+} da questo deposito e/o la suscettibilità all'apoptosi, come Bcl-2, Bax (Pinton et al., 2000, Scorrano et al., 2003), o Caspasi 7, Caspasi 12 e Calpaina (Reddy et al., 1999, Bando et al., 2004, Rao et al., 2001). Tuttavia non si può escludere che Grp94 in forma transmembrana, abbia effetto tampone sul Ca^{2+} citosolico.

In letteratura esistono evidenze di come crt, in associazione a Grp58, interagisca con SERCA2b modulandone l'attività: crt si lega alla sequenza C-term di SERCA2b e recluta Erp57 per modulare, in modo Ca^{2+} dipendente, i gruppi tiolici nel Loop L4 e di conseguenza l'attività della pompa (Camacho et al., 1995; Li and Camacho 2004). Sulla base di queste evidenze non si può escludere che Grp94, una proteina chaperone, sia in grado di interagire e modulare la funzione biologica della pompa del calcio di RE o di altri substrati.

Il razionale di questo studio è stato quello di dimostrare la presenza di possibili interazioni di Grp94 con proteine del RE mediante esperimenti di co-Immunoprecipitazione.

L'analisi WB in cellule C2C12 ha messo in evidenza la presenza di una grande quantità di Grp94, ma a parità di contenuto proteico totale, una scarsissima

presenza di SERCA2. L'Ip in C2C12 ha mostrato tuttavia una completa co-precipitazione delle due proteine proponendole in una possibile interazione di tipo regolatorio. Tale interazione è riscontrabile anche in presenza di detergenti e la sua specificità è confermata dal medesimo riscontro in lisati cellulari ottenuti dopo esposizione a cross-linking chimico con DSP. Le C2C12 sembrano un adeguato modello sperimentale per studiare l'interazione modulatoria di Grp94 con le proteine del RE ed in particolare con SERCA2.

Interessante è stato scoprire come la sovraespressione di Grp94 nelle cellule C2C12 induca una modulazione dell'attività della pompa SERCA, che giustificerebbe la riduzione della $[Ca^{2+}]$ nel RE rispetto alle cellule di controllo. Così mentre nel clone 8/2A11 c'è la tendenza, anche se non significativa, ad una minore attività (circa il 14,6 %) della pompa del calcio di RE rispetto al clone di controllo, nelle cellule C2C12, sovraesprimenti transientemente Grp94, si evidenzia una riduzione significativa della funzionalità di SERCA del 20% ($p < 0.01$). Questo risultato, alla luce di quanto osservato con gli studi funzionali nelle cellule miogeniche C2C12, suggerirebbe per Grp94 una possibile interazione di tipo regolatorio (inibitorio) con SERCA2, come peraltro già proposto per calreticulina e Grp58 (Camacho et al., 2005).

Il medesimo esperimento di immunoprecipitazione è stato esteso a due linee cellulari non miogeniche. In cellule HeLa ed HEK293 l'Ip ha rilevato un segnale debole di co-precipitazione tra Grp94 e SERCA2. Infatti l'entità della co-immunoprecipitazione differisce tra linee cellulari diverse: a parità di elevato contenuto proteico totale sia di Grp94 che di SERCA2, solo una piccola quantità di SERCA2 co-immunoprecipita con Grp94 nelle cellule HeLa ed HEK293. Nelle cellule C2C12 ed H9c2 (cardiomiociti embrionali di ratto), un'altra linea miogenica, dove la quantità totale di SERCA2 è al contrario scarsissima, l'immunoprecipitazione determina un vero e proprio arricchimento di SERCA2. Tuttavia nelle cellule H9c2 la debole interazione di SERCA-2 con Grp94, in assenza di CCL, evidenzerebbe la presenza di interazioni aspecifiche di SERCA2 con altre proteine e risulterebbe meno specifica rispetto a quella evidenziata nelle C2C12.

Nelle H9c2 anche la co-Ip di Grp78 con Grp94, che si verifica solo in presenza di CCL, indicando l'esistenza di un'interazione non stabile e non specifica tra le due

proteine. Grp78 infatti è una delle più abbondanti proteine chaperone del RE che presenta legami forti, ma transienti con numerose proteine clienti, incluse le catene immunoglobuliniche (Knittler and Haas 1992).

Per cercare di approfondire e chiarire il meccanismo d'azione attraverso cui Grp94 moduli l'attività di SERCA-2 nelle cellule miogeniche, si è ipotizzato l'esistenza di una diversa e specifica interazione con le differenti isoforme di SERCA-2. Esistono infatti almeno 3 isoforme tessuto specifiche della pompa di RE per il calcio. L'isoforma ubiquitaria 2b è presente in tutti i tipi di cellule e presenta bassi livelli di espressione a livello cardiaco (circa un 20%), mentre la sua assenza è riscontrabile a livello del muscolo scheletrico adulto. Le cellule HeLa, HEK293 e C2C12 utilizzate in questo studio presentano costitutivamente l'isoforma 2b. Le isoforme 2a e 2c sono entrambe altamente espresse nel tessuto cardiaco. L'indagine è stata estesa allo studio di Ip di Grp94 nei microsomi di cardiomiociti adulti di ratto al fine di verificare se l'isoforma 2a interagisse con Grp94. Resta tuttavia da sottolineare come uno dei limiti di questo studio sia stato quello di utilizzare un anticorpo che riconoscesse tutte e tre le isoforme di SERCA-2 senza discriminazione: l'isoforma infatti 2c co-immigra con la 2a ed è quindi molto difficile distinguerle.

L'Ip di Grp94 in microsomi di cuore di ratto evidenzia co-precipitazione dell'isoforma ubiquitaria SERCA-2b con Grp94, che non sembra invece evidenziarsi con l'isoforma 2a e/o 2c. Questo ci fa concludere che l'interazione tra Grp94 e SERCA2 è coinvolta anche delle cellule cardiache adulte di ratto, in quanto linea miogenica, e potrebbe essere legata al tipo di isoforma specifica per SERCA-2. Si può pertanto concludere che l'interazione tra Grp94 e SERCA2 sia una caratteristica specifica della linea miogenica.

Sebbene gli esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi anti-Grp94 rivelino quindi che SERCA2 co-immunoprecipita con Grp94 nelle differenti linee cellulari, l'effetto della sovraespressione transiente di Grp94 sull'omeostasi cellulare del Ca^{2+} sembra invece essere un evento dipendente dal tipo cellulare. Nelle cellule non miogeniche, HeLa ed HEK293, sovraesprimenti Grp94 non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nei valori di $[Ca^{2+}]_{re}$, dato che riflette la mancanza di modificazioni nell'attività di SERCA. Questi dati, che si discostano dai risultati ottenuti nelle C2C12, suggeriscono che l'effetto della

sovraespressione di Grp94 è cellulo-specifico, in quanto l'inibizione di SERCA 2 si riscontra solo nella linea cellulare miogenica studiata.

In questo studio abbiamo dimostrato che nelle cellule miogeniche C2C12 la sovraespressione di Grp94 determina citoprotezione, riducendo significativamente i livelli di calcio citosolico rilasciato dai depositi intracellulari attraverso la modulazione inibitoria della pompa di RE SERCA. La nostra conclusione è che la protezione antiossidante derivata da Curcumina, usata come un potenziale agente terapeutico, possa coinvolgere, almeno in parte, l'aumento dei livelli di Grp94. Il ruolo di quest'ultima, probabilmente modulando i livelli di calcio libero all'interno del RE, aumenterebbe la resistenza all'alterazione dell'omeostasi di questo secondo messaggero in condizioni di stress ossidativo, al fine di ritardare la progressione dell'atrofia muscolare.

MATERIALI E METODI

1 Animali e procedura sperimentale

1.1 Primo modello sperimentale: Allenamento.

I campioni di muscolo scheletrico e muscolo cardiaco oggetto dello studio sono stati ottenuti da ratti adulti di ceppo Sprague Dawley.

Il primo modello sperimentale è stato sviluppato presso il laboratorio del Prof. Arsenio Veicsteinas, dell'Università di Milano e ha coinvolto 15 ratti maschi di 2 mesi di età di cui 7 sono stati sottoposti giornalmente ad un'ora di esercizio fisico di entità lieve (corsa su tappeto motorizzato Tecmachine, Medical Development, France), tre volte alla settimana (sempre alla medesima ora e giorni settimanali), per 14 settimane e i rimanenti utilizzati come controlli sedentari (Marini et al., 2007). Durante la prima sessione di allenamento i ratti venivano fatti inizialmente familiarizzare con la struttura motorizzata per poi correre alcuni minuti ad una velocità di 10 m/min allo 0% di inclinazione. La durata e la velocità dell'esercizio sono stati gradualmente aumentati durante le seguenti settimane con lo scopo aumentare gradualmente l'entità dello sforzo fino a raggiungere il 60% V_{O_2max} in 11 settimane (Amstrong et al., 1983); alla fine di questo periodo la velocità era di 30m/min allo 0% di inclinazione. Tale carico di lavoro è stato poi sostenuto per altre 3 settimane. Gli animali sono stati sacrificati 48 ore dall'ultima sessione d'esercizio dopo essere stati anestetizzati. I muscoli soleo, plantare, tibiale anteriore di entrambi gli arti posteriori e cuore sono stati prelevati, congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a $-80^{\circ}C$.

1.2 Secondo modello sperimentale: induzione dell'atrofia muscolare.

I campioni di muscolo scheletrico sono stati ottenuti da ratti femmine di ceppo Sprague Dawley. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi, ciascuno di x settimane di età e circa 200g di peso corporeo, e sottoposti a riduzione del carico degli arti posteriori o modello di sospensione denominato "Tail cast suspension model" (Jaspers et al., 1984) per 4, 7, 15 e 21 giorni rispettivamente, presso il nostro laboratorio, Prof.ssa Gorza, Università degli Studi di Padova. Precisamente a 4 giorni sono stati sottoposti a sospensione 4 animali a1 giorno, 4 animali a

4 giorni , a 7 giorni 6 animali, a 15 giorni 3 animali e a 21 giorni 4 animali e parallelamente i relativi controlli sedentari. Gli animali, sospesi e i controlli, sono stati quindi sacrificati dopo essere stati anestetizzati. I muscoli soleo, plantare, tibiale anteriore ed EDL di entrambi gli arti posteriori sono stati prelevati, congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a -80°C .

1.3 Campioni di cuore umano

Campioni di cuore umano sani e DCM (cardiomiopatie dilatative) sono stati ottenuti dal Massachusetts General Hospital (MGH), Boston, MA attraverso approvazione di protocolli dell' Institutional Review Board. I campioni di DCM sono stati prelevati durante il trapianto cardiaco da porzioni del ventricolo sinistro derivanti dal cuore espantato. Il permesso per l'uso di organi espantati a scopo di ricerca scientifica necessita di documenti per il consenso. I campioni di cuore sano derivano da organi espantati da donatori, ma non utilizzabili per il trapianto a causa dell'età, della mancanza di istocompatibilità o del diverso gruppo sanguineo con il paziente ricevente.

2 Mantenimento in coltura delle cellule e trasfezione.

Le linee cellulari C2C12 (miogenica scheletrica), HeLa (tumorale della cervice uterina) e HEK293 (embrionale umana di rene) vengono fatte crescere su plastica e coltivate nel mezzo di coltura Dulbecco's modified Eagle (D-MEM, Sigma) completato con siero fetale bovino (FCS) al 10 % (v/v), L-glutamina (1 mM), streptomicina e penicillina (100 U/ml). Per i cloni C2C12 nel mezzo D-MEM viene aggiunto un antibiotico selettivo come la geneticina G418 (250 $\mu\text{g/ml}$).

Le cellule vengono mantenute in coltura in petri di plastica sterile, poste in un incubatore termostato a 37°C con il 5% di CO_2 . Tali condizioni assicurano un pH stabile attorno a 7.2-7.4 e un corretto grado di umidità.

Le cellule, per essere mantenute in coltura nel tempo, vengono lavate con PBS (NaCl 8g/l, KCl 0.2 g/l, NaHPO_4 1.14 g/l e KH_2PO_4 0.2 g/l in H_2O) e vengono incubate a 37°C per 1-2 minuti con tripsina 0.1% in PBS. L'azione della tripsina viene bloccata dall'aggiunta di mezzo di coltura fresco che contiene, tra le proteine seriche, anche l'inibitore della tripsina. La sospensione delle cellule si

centrifuga a 1200 rpm per 5 minuti a 20°C, quindi si elimina il surnatante e si risospende il precipitato in un volume opportuno di terreno di coltura completo; si procede alla diluizione appropriata su una petri nuova. Per favorire le condizioni di sterilità è stata utilizzata una cappa a flusso verticale, in cui l'aria circola dall'alto verso il basso, dotata di uno schermo di plexiglas, grazie al quale viene ridotta la possibilità di contaminazioni.

- La creazione di cloni C2C12 stabilmente transfettati è stata realizzata usando costrutti e procedure come descritto in Gorza and Vitadello, 2000. La sovraespressione di Grp94 è stata raggiunta usando il clone di coniglio cDNA 2.52, in cui è stata inserita la sequenza segnale di topo per direzionare la proteina al RE, mentre i cloni di controllo sono stati generati usando un costrutto che contiene una porzione di Grp94 cDNA di coniglio priva della sequenza di inizio traduzione. I cloni sono cresciuti in presenza di 250µg/ml G418 nel medium DMEM (Sigma) contenente 10% di siero fetale di vitello e L-glutamina e usati tra i passaggi 10-20.
- Le transfezioni transienti per testare la reazione TUNEL sono state raggiunte usando vettori bicistronici, in modo da identificare le cellule transfettate; il costrutto pT94, è stato usato per la sovraespressione, mentre il costrutto contenente il pT è stato usato per il confronto, come descritto precedentemente in Vitadello et al. 2003.
- Nelle misure della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare, le transfezioni transienti per la sovraespressione di Grp94 hanno utilizzato il vettore PBKrsv8A e per costrutto di controllo il vettore PBKrsv2.52; le cellule C2C12 (usate tra i passaggi 3-8) sono state seminate circa 16.000 cellule per vetrino ricoperto da gelatina in piastre da 24 pozzetti; queste cellule infatti crescono velocemente e per i questi specifici fini sperimentali non devono raggiungere la confluenza che scatenerrebbe la fusione a miofilamenti, inducendo una risposta allo stress ed un'aumento dei livelli intracellulari di Grp94. Le cellule HeLa ed HEK293 vengono invece piastrate ad una confluenza del 50%, circa 40.000 cellule per vetrino senza gelatina.
- Circa 80.000 cellule wild type C2C12 (usate tra i passaggi 14-18) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, mentre circa 10.000 cellule sono

state piastrate su vetrini ricoperti di gelatina in piastre da 24 pozzetti. Dopo 24h, le cellule sono state trattate con curcumina 5 μ M (Sigma) in 0.1% DMSO per 3h. Le piastre di controllo sono state incubate con solo DMSO. Il terreno di coltura è stato successivamente cambiato e le cellule sono state utilizzate 24h dopo.

- Per gli esperimenti di stress ossidativo, dopo abbondante risciacquo delle colture con DMEM, le cellule vengono esposte ad H₂O₂ 400-800 μ M in 1 ml/pozzetto di terreno di crescita per piastre da 6 pozzetti e in 0,5 ml/pozzetto dello stesso terreno per piastre da 24 pozzetti. Un certo numero di pozzetti, con nessun precedente trattamento con curcumina, è stato esposto a curcumina 20 μ M in terreno di crescita 1h prima dell'aggiunta di H₂O₂.

2.1 Costrutti

Per le trasfezioni transienti il cDNA di Grp94 è stato inserito nel vettore commerciale PBK-rsv (Stressgen); PBK-rsv8A esprime Grp94 e PBKrsv2.52 corrisponde al relativo costrutto di controllo; inoltre sono stati utilizzati i plasmidi bicistronici pT (costrutto di controllo) e pT94 (costrutto di controllo) (Vitadello et al. 2003) che coesprimono la proteina verde GFP.

Il cDNA dell'equirina direzionata al RE (AEQ RE) è stato inserito nel vettore commerciale PcdnaI (Invitrogen) (Montero et al. 2005).

2.1.1 Purificazione del DNA

La purificazione del DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando il kit fornito dalla QIAGEN. Il protocollo prevede la separazione del plasmide dal DNA batterico mediante il metodo della lisi alcalina, l'estrazione del DNA plasmidico mediante cromatografia su resina a scambio ionico, il suo recupero e concentrazione mediante precipitazione con isopropanolo. La determinazione della quantità di plasmide purificata viene effettuata mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8%. Tale analisi la linearizzazione del DNA, che si ottiene digerendo il costrutto con l'enzima di restrizione appropriato: EcoRI per AEQ RE, BamHI per pT e pT94 e KpnI per PBKrsv8A e 2.52.

2.2 Trasfezione transiente delle cellule C2C12 e HeLa

Negli esperimenti presentati in questa tesi le cellule C2C12 e HeLa vengono trasfettate col *metodo del calcio-fosfato* che permette una buona efficienza di trasfezione (C212 fino al 50% e HeLa fino al 65-70%).

Per ogni vetrino del diametro di 13 mm si utilizzano 4 µg di DNA totale, di cui 1 µg è costituito dal cDNA per l'equorina e 3 µg dai cDNA del costrutto per Grp94 (PBKrsv8A) o per il vettore di controllo (PBKrsv). Se la trasfezione richiede DNA di un solo tipo, come nei cloni di C2C12, se ne utilizzano 4 µg. Per vetrini di diametro pari a 24 mm, tali valori raddoppiano. Il DNA viene opportunamente diluito in una soluzione di TE per un volume complessivo di 45 µl per vetrino; a questi si aggiungono 5 µl di CaCl₂ 2.5 M sterile. In un tubo separato si preparano 50µl/vetrino di HBS 2X sterile (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.12 con 0.5 M NaOH). Viene quindi aggiunto il mix DNA-TE all'HBS, goccia a goccia, mediante una pipettrice Gilson, sotto agitazione (vortex): si forma in questo modo un precipitato fine che rende la soluzione leggermente torbida. Questa miscela, trascorsi 20 minuti a temperatura ambiente, viene aggiunta alle cellule direttamente al terreno di coltura, che era stato sostituito 60 minuti prima della trasfezione con terreno fresco. È importante sottolineare che per le cellule C2C12 il terreno DMEN deve essere utilizzato privo di antibiotici per aumentare l'efficienza di trasfezione. Il precipitato che si deposita sulla superficie cellulare viene inglobato per endocitosi.

La piastra viene posta in incubatore a 37°C. Dopo circa 24 ore le cellule vengono lavate più volte con PBS, cercando di eliminare il precipitato di DNA-calcio-fosfato rimasto in sospensione, e viene aggiunto nuovo terreno. L'osservazione al microscopio o gli esperimenti all'equorinometro vengono effettuati dopo circa 24 ore.

2.3 Trasfezione transiente delle cellule HEK293

Negli esperimenti presentati in questa tesi le cellule HEK293 vengono trasfettate con il *metodo del FuGENE*, che permette anche in questo tipo cellulare una efficienza di trasfezione fino al 65-70%.

Col metodo del FuGENE per ciascun vetrino di diametro pari a 13 mm si usano 1.5 µg di DNA, e 3 µl di FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche). Anche in questo caso il mezzo di coltura viene sostituito con del mezzo fresco 60 minuti prima della trasfezione. Il DNA viene diluito in una soluzione di TE fino ad un volume complessivo di 5 µl per vetrino (soluzione A); si prepara poi una seconda soluzione (soluzione B) contenente D-MEM sterile senza siero e 3 µl di FuGENE; questa seconda soluzione viene lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente si trasferisce la soluzione B nella provetta contenente la A. Dopo aver lasciato questa miscela a temperatura ambiente per 15 minuti, se ne mettono 50 µl sopra ciascun vetrino. Il DNA così veicolato entra nella cellula a seguito della fusione della componente lipofila con la membrana plasmatica.

Anche in questo caso, per vetrini del diametro di 24 mm, le quantità di DNA e i volumi da utilizzare raddoppiano. Dopo 24 ore è possibile utilizzare i vetrini.

3 Immunoistochimica

Sezioni criostatiche seriali di 12 µm di muscolo scheletrico, raccolte su vetrini gelatinati, sono state esposte a diversi pretrattamenti a seconda dell'anticorpo utilizzato, dettagliati in modo specifico più avanti. Le sezioni sono state quindi incubate con opportune diluizioni dell'anticorpo primario in albumina sierica bovina 0,5% in PBS (NaCl 136 mM , KCl 2,68 mM , NaHPO₄ 8 mM , KH₂PO₄ 1,4 mM, pH7,4) per 16 ore a 4°C e risciacquate con PBS per 10 minuti per 2 volte. Le sezioni sono state quindi incubate con l'anticorpo secondario (anti-immunoglobuline di topo coniugate con perossidasi) preadsorbite con siero di ratto per eliminare le immunoglobuline crossreattive e centrifugate a 10000 g per 10 min per favorire la deposizione degli aggregati. La dimostrazione dell'interazione tra Hsp70 e l'anticorpo primario ha richiesto un'ulteriore incubazione con un anticorpo terziario (vedi paragrafo specifico). L'interazione dell'anticorpo con l'antigene è stata rivelata stimolando l'attività perossidasi con incubazione a T ambiente per 15 minuti in tampone 0,1M Tris-HCl pH 7.6 contenente 0,75 mg/ml di imidazolo e 0,35 mg/ml di diaminobenzidina e perossido di idrogeno allo 0,01%. La reazione veniva quindi bloccata con risciacquo in PBS e le sezioni disidratate con concentrazioni crescenti di etanolo (etanolo 75% per 30 secondi, 95% per 3 minuti, 100% per 3 minuti) e passaggio

in xilene (3 minuti), e montate con Balsamo di Canada e vetrino coprioggetto. I vetrini sono stati osservati con microscopio ottico. Per l'immunolocalizzazione di Hsp70 il protocollo prevede che le sezioni siano fissate con paraformaldeide 4% in PBS per 10 minuti a T ambiente e quindi risciacquate con PBS per 10 minuti per due volte. L'attività delle perossidasi endogene è stata quindi inibita mediante incubazione in metanolo e perossido di idrogeno allo 0.3% per 30 minuti a T ambiente. L'anticorpo anti-Hsp70 inducibile (Stressgen) è stato utilizzato alle diluizioni di 1:100. Come anticorpo secondario sono state utilizzate anti-immunoglobuline di topo coniugate con perossidasi ottenute in coniglio (P0260 Dakocytomation) alla diluizione 1:100 e come anticorpo terziario, anti-immunoglobuline di coniglio coniugate con perossidasi (P-0399 Dakocytomation), alla diluizione di 1:300.

L'immunolocalizzazione delle diverse isoforme di miosina sarcomerica ha richiesto una fissazione delle sezioni con acetone freddo per 10 min a -20° C. Le sezioni sono state fatte asciugare all'aria e quindi risciacquate brevemente con PBS prima di essere incubate con gli anticorpi specifici: state fissate per 10 min in acetone freddo e incubate durante la notte a 4° C con appropriate diluizioni a seconda dei seguenti anticorpi primari monoclonali (Gorza, 1990): SC-71, che riconosce il tipo 2A MHC; BF-35, che reagisce con tutti le isoforme di MHC, eccetto l'isoforma 2X, e, quindi, caratterizzata attraverso l'assenza di riconoscimento per la popolazione di fibre fast con metabolismo ossidativo intermedio, lo stesso anche per l'isoforma 2D (Pette and Staron, 2000). Le fibre intermedie di tipo 1/2A sono state identificate con l'anticorpo monoclonale BA-D5 e SC-71. Le fibre intermedie di tipo 2A/2X sono state identificate attraverso la presenza di una più debole immunolocalizzazione con l'anticorpo SC-71, rispetto a quelle di tipo 2A, e per l'assenza di colorazione per l'anticorpo BA-D5. infine le fibre di tipo 2B sono state identificate con l'anticorpo monoclonale BF-35 e per l'assenza di segnale con BA-D5 e SC-71.

L'immunolocalizzazione di α , actina muscolare liscia ha richiesto la fissazione delle sezioni con paraformaldeide 4% e, dopo i due risciacqui con PBS, la permeabilizzazione con Triton 0,2% per 10 min. L'anticorpo anti- α actina muscolare liscia (clone 1A4 Sigma) è stato utilizzato alla diluizione di 1:2000. Il

protocollo di immunolocalizzazione è proseguito secondo quanto descritto per la miosina sarcomerica lenta.

4. Analisi elettroforetica e Western blotting

Modelli in vivo

Sezioni criostatiche di muscolo scheletrico (SOL, TA, PL e EDL) e cardiaco, raccolte in una microprovetta pre-raffreddata a -20°C , sono state solubilizzate con tampone di Laemmli caldo (10% glicerolo, 3,5% sodio dodecilfosfato, 62mM TrisHCl pH 6,8; Laemmli, 1970) e ulteriormente scaldate a 95°C per 5 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati a 10000 g per 10 minuti a temperatura ambiente; poi il surnatante è stato prelevato e aliquotato.

La determinazione della concentrazione proteica è stata effettuata secondo il metodo di Lowry et al. (1951) usando come riferimento una curva standard di albumina di siero bovino (BSA). In breve, gli standard per tracciare la curva di taratura sono stati preparati utilizzando una soluzione di PBS-BSA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), una soluzione di NaOH 0,016N e $10\mu\text{l}$ di tampone di Laemmli. I campioni sono stati allestiti secondo le indicazioni del protocollo, aggiungendo a tutte le provette il reattivo di FOLIN nelle appropriate quantità. L'analisi spettrofotometrica degli standard a 750 nm permette di trovare i valori delle diverse concentrazioni e la creazione di una retta di taratura a cui riferirsi per confrontare i valori ottenuti dalla lettura dei campioni in esame.

L'analisi elettroforetica è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli (1970), che permette la separazione delle proteine in base al peso molecolare, poiché la carica specifica delle proteine viene mascherata dall'interazione con il detergente anionico sodio dodecilsolfato. I campioni da analizzare sono stati caricati su gel di poliacrilamide (SDS PAGE) dal 7,5 al 12,5% (secondo le esigenze sperimentali) dopo aver aggiunto Bromofenolo blu 0.01% e β -mercaptoetanolo 5%. Un pozzetto parallelo è stato utilizzato per il caricamento degli standard di peso molecolare (Broad Range, BioRad). La corsa elettroforetica è stata effettuata all'amperaggio costante di 4 mA per 16 ore e quindi si è proceduto al trasferimento delle proteine separate nel gel su supporto di nitrocellulosa, esponendole per 2 ore a 400 mA in presenza di 25 mM Tris-glicina e metanolo 20%, pH 8.00. L'avvenuto

trasferimento è stato visualizzato dopo colorazione con rosso Ponceau delle proteine.

Dopo decolorazione con acqua deionizzata, la nitrocellulosa è stata saturata con 1% Blocking Reagent (BR, Roche Diagnostics) in TBST (150mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 0,05% Tween-20) per 1 ora a temperatura ambiente e incubata con l'anticorpo primario in 0,5% BR in TBST a 4°C in agitazione continua per 16 ore.

Gli anticorpi primari utilizzati nello studio sono stati: anticorpo monoclonale anti-Hsp70 inducibile (SPA-810 Stressgen), ottenuto in topo e diluito 1:50000; anticorpo monoclonale anti- α -actinina (clone EA-53 Sigma), ottenuto in topo e diluito 1:20000; anticorpo monoclonale anti-Grp75 (Stressgen) ottenuto in topo e diluito 1:50000; anticorpo monoclonale anti-Grp94 3C4 (Vitadello et al., Biochem, 1998) ottenuto in topo e diluito 1:2000; anticorpo policlonale anti HO-1 (Santa Cruz) ottenuto in capra e diluito 1:3000; anticorpo policlonale anti-Grp78 (SPA-826 Stressgen) ottenuto in coniglio e diluito 1:20000; l'anticorpo monoclonale anti-calsequestrina (Stressgen) diluito 1:50000. Dopo 3 lavaggi con TBST da 10 minuti ciascuno, la nitrocellulosa è stata incubata con specifici anticorpi secondari: anti-immunoglobuline (Ig) di topo coniugate con perossidasi (sc-2005 Santa Cruz Biotech.), diluite 1:4000, anti-Ig di coniglio coniugate a perossidasi (Dako) diluite 1:3000 e anti-Ig di capra coniugato a perossidasi (Santa Cruz) diluito 1:4000 in BR 0.5% in TBST, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione lenta. Dopo quattro lavaggi di 15 minuti ciascuno con TBST, la reazione immunologica è stata rivelata incubando la striscia di nitrocellulosa per un minuto in agitazione in una soluzione di luminolo-H₂O₂ (ECL GE Healthcare). La striscia veniva quindi riposta tra due fogli di carta da lucido per proiezioni ed esposta a lastre autoradiografiche (Kodak X-OMAT XAR-5).

Modelli in vitro

A) Per valutare l'espressione semiquantitativa di Grp94, dopo rimozione del terreno di coltura e ripetuti risciacqui con tampone PBS, le cellule C2C12 venivano solubilizzate in tampone di lisi secondo Laemmli (1970) privo di β -mercaptoetanolo e blu di bromofenolo (glicerolo 10% v/v, SDS 3%, TRIS 0.5 M, pH 6.8). I campioni erano bolliti per 5 minuti, centrifugati a 10000g per 10 minuti

e congelati in azoto liquido. Aliquote sono state utilizzate per la determinazione della concentrazione proteica secondo il metodo di Lowry, 1951, modificato, usando come riferimento una curva standard di albumina di siero bovino (BSA).

B) Cellule C2C12 aderenti in piastre da 6 pozzetti sono state solubilizzate in 25 μ l di tampone di lisi cellulare (Promega). Le cellule presenti nel surnatante sono state raccolte e centrifugate per 5 minuti a 300g ed il volume finale di lisi è stato portato a 40 μ l. La concentrazione proteica è stata determinata in pozzetti di confronto, lisati dopo abbondante lavaggio con sale di fosfato tamponato (PBS: 10mM Na fosfato, 150mM NaCl, pH 7.4) e usando il reagente di Bradford e l'albumina sierica bovina (BSA) come standard. Un'uguale quantità proteica di lisato, corrispondente a 20 μ g dell'ammontare totale delle proteine, è stata aggiunta al tampone semplice di Laemmli 2x e caricata su gel SDS-PAGE al 10%. Dopo il trasferimento in nitrocellulosa, i blot sono stati saturati con Blocking Reagent 1% (Roche Diagnostics) in tampone Tris-salino pH 8.0 addizionato con 0.05% Tween 20 (TBST) per 2h a temperatura ambiente e le strisce sono state incubate per una notte a 4°C con Blocking Reagent 0.5% in TBST, con l'anticorpo monoclonale anti-Grp94 3C4 (Gorza and Vitadello, 2000), con l'anticorpo policlonale anti-Grp78 SPA-826 oppure con l'anticorpo policlonale anti-calreticulina SPA-600 (Stressgen). La saturazione è stata realizzata con latte in polvere al 5% in TBST, quando le strisce sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti HO-1 OSA-111 (Stressgen Bioreagents) o con l'anticorpo policlonale anti caspasi-12 (Santa Cruz Biotechnology). Successivamente i blot sono stati risciacquati, incubati per 1h a RT con l'anticorpo secondario anti-topo coniugato a perossidasi oppure anti-coniglio (Santa Cruz Biotechnology) diluiti con Blocking reagent 0.5% in TBST e sviluppati usando un sistema di rilevazione della chemiluminescenza (ECL, GE Healthcare).

I livelli di espressione di ciascuna proteina sono stati quantificati ed espressi come come rapporto tra i valori dei campioni trattati rispetto ai controlli normali, mediante misura della densità ottica, usando NIH Image analysis Software e la normalizzazione ai valori densitometrici della calreticulina.

4.1 Estrazione di proteine

Le cellule C2C12 (confluenza 60% su piastra da 10 cm di diametro), HeLa ed HEK293 vengono lavate due volte con una salina fosfato (PBS) e quindi indotte a lisi in 500µl (per piastra) di una soluzione fredda di RIPA buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NaDOC, 1% nonidet-P40 (NP-40), 0.1% SDS, miscela di inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics)]. Nel caso del cross linking chimico (CL) per piastra vengono aggiunti al terreno 100 µl di DSP; le cellule, prima di venire lisate con RIPA, vengono quindi lasciate in forte agitazione per 30 min a temperatura ambiente.

Il lisato cellulare viene raccolto con una microsiringa in un'eppendorf, aggiunto 5µl/ml PMSF e incubato 10 minuti in ghiaccio. L'omogenato viene centrifugato a 11000 rcf per 15 minuti a 4 °C. Si ottiene, in tal modo, un pellet viscoso contenente DNA e detriti cellulari e una soluzione surnatante di proteine solubilizzate. Si preleva il surnatante, si aggiunge per provetta, 20µl di agarosio ben vortexato in una soluzione di NaCl 0,5M e si lascia in agitazione per 30min a 4°C. per ottenere il pellet di agarosio si centrifuga a 1000rcf per 30sec a 4°C. Si raccoglie il surnatante che si utilizza per l'immunoprecipitazione o in alternativa si aliquota e si congela in azoto liquido.

Per i campioni da tessuto cardiaco, circa 1 g di tessuto è stato polverizzato in azoto liquido, omogenizzato in 5 ml di una soluzione salina fredda di Tris (TBS, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, CaCl₂ 1mM, pH 7.6) + inibitori delle proteasi (Complete, Roche) e centrifugato per 30 min at 14000 rpm a 4°C. Il pellet scartato e il surnatante utilizzato per l'immunoprecipitazione o aliquotato e conservato in azoto liquido

4.2 Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è una tecnica che permette l'arricchimento di una particolare proteina attraverso la precipitazione della stessa con l'uso di specifici anticorpi.

Prima di procedere con si dosa il contenuto proteico dei lisati dei campioni tramite metodo Bradford et al. 1985. Si calcola il relativo volume corrispondente a 100 µg di proteina totale.

campioni in vitro: per ciascun campione 100 µg di lisato proteico totale, da cellule C2C12, HeLa o HEK293, è stato diluito in 300 µl, in una provetta da 1.5 ml, con del RIPA buffer con antiproteasici (lo stesso utilizzato per la lisi proteica). 5 µl di anticorpo primario anti-GRP94 3C4 (Vitadello et al. 2003) e in parallelo, per i controlli negativi, 5 µl di mouse IgG coniugate ad agarosio (sigma), sono stati aggiunti a ciascun campione di lisato proteico e le provette mantenute in continua agitazione per 1 h a 4°C. In seguito 40 µl di anti-mouse IgG coniugato ad agarosio sono stati aggiunti a ciascuna provetta e mantenute in agitazione, per 1-3h a 4°C. Il lisato proteico immunoprecipitato è stato a questo punto centrifugato a 1000 rcf per 30sec a 4°C, il supernatante è stato rimosso senza toccare il pellet. Quest'ultimo è stato risospeso nel buffer di risciacquo (0,1M NaCl+ inibitori delle proteinasi esclusa la calpeptina) per 4 volte, per eliminare le proteine aspecifiche in soluzione, e ad ogni passaggio centrifugato 30 sec a 1000rcf. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso nel tampone di caricamento (loading buffer) 1x + 10% β-mercaptoetanolo (Biorad), vortexato, spinnato e fatto riscaldare per 5 min at 95°C. I campioni sono quindi stati spinnati ulteriormente a 11000rpm per 5min a temperatura ambiente e caricati su un SDS-page allo 7,5% per poi essere trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. La banda per SERCA è stata individuata utilizzando l'anticorpo anti Serca ATPasi (ABRbiolabs).

campioni in vivo: 100 µg di lisato proteico totale, da campioni di cuore sano o DCM, è stato diluito a 300 µl, in una provetta da 1.5 ml, con la stessa soluzione tampone usata per ottenere i lisati proteici. 5 µl di anticorpo primario anti-GRP94 3C4 (Vitadello 1998) sono stati aggiunti alla soluzione proteica e le provette mantenute in continua agitazione per 1 h a 4°C per permettere all'anticorpo di legarsi totalmente allo specifico epitopo. Durante l'incubazione 500 µl di proteina G coniugata a sefarosio (Amersham) sono stati lavati aggiungendo 1ml dello stesso buffer utilizzato per la lisi proteica. Dopo aver vortexato tale soluzione contenente sefarosio, quest'ultimo è stato pellettato per 1 min alla massima velocità e il surnatante è stato eliminato. La procedura è stata ripetuta 2 volte e il risultante pellet è stato risopeso in un uguale volume di buffer contenente un cocktail di inibitori per le proteinasi (Complete, Roche). In seguito 20 µl di tale soluzione con sefarosio sono stati aggiunti a ciascuna provetta contenente il lisato proteico diluito da immunoprecipitare proteina e incubate, sempre in agitazione,

per 3h a 4°C per permettere l'adsorbimento della regione Fc dell'anticorpo alla proteina. Le sfere di sefarosio sono state a questo punto centrifugate a 14,000 rpm per 1 min a 4°C, il supernatante è stato rimosso e il pellet risospeso nel buffer di risciacquo (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.1% Triton X-100, pH 7.6 + inibitori delle proteinasi). Questo passaggio è stato ripetuto 3 volte per eliminare le proteine aspecifiche in soluzione. Il risultante pellet è stato risospeso in loading buffer 1x + 0.5% β -mercaptoetanolo (Biorad) e denaturato 30 min at 37°C., prima di essere caricato nel gel di poliacrilamide allo 7,5%.

4.3 Determinazione della ossidazione proteica mediante Oxiblot

Per valutare la formazione di gruppi carbonilici proteici, è stato utilizzato il kit OxyBlot per la determinazione della ossidazione proteica (Chemicon) in accordo con il protocollo sperimentale di fabbrica. Dopo abbondante risciacquo con PBS, le cellule sono state solubilizzate in 30 μ l di acido tetrafluoroacetico 0.01%, addizionato con antiproteasi, 5mM EDTA e beta-mercaptoetanol 2% (Dalla Libera et al. 2005). Per il tessuto muscolare sono state tagliate al criostato circa 10 fettine per campione, quindi solubilizzate allo stesso modo, ma facendo attenzione, prima di procedere alla determinazione proteica, di sonicare 10 min per 3 volte ciascun campione e vortexare per sminuzzare e solubilizzare il più possibile il tessuto per evitare alterazioni nella successiva quantificazione. La concentrazione proteica è stata determinata usando il protocollo dell'acido tricloroacetico-Lowry e BSA come standard (Vescoso et al. 2008). In seguito sono stati usati 10 μ g delle proteine totali per la derivatizzazione con DNPH; il controllo positivo includeva la derivatizzazione di 3 μ g di BSA ossidata, mentre per il controllo negativo è stata usata la stessa quantità proteica di quella utilizzata per le proteine totali, ma in assenza di DNPH. I campioni sono stati caricati su gel di acrilamide (SDS-PAGE) al 10%. Dopo il trasferimento in nitrocellulosa, i blot sono stati saturati una notte a 4°C con BSA 3% in tampone Oxyblot (Tris-salino pH 8.0 addizionato con CaCl₂ 2mM) e le strisce sono state incubate per 3h a temperatura ambiente nello stesso tampone con l'anticorpo policlonale anti-DNPH, risciacquate tre volte con il tampone Oxyblot addizionato con Tween 20 0.2%, e incubate 1h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario per ossidasi-coniugato anti-coniglio (Oxyblot, Chemicon). Il segnale è stato rilevato tramite

chemiluminescenza (ECL, GE Healthcare). Le proteine che hanno subito ossidazione (i.e., formazione di gruppi carbonilici) sono state identificate come una banda nel campione derivatizzato, ma non nel controllo negativo.

I livelli di ossidazione proteica sono stati quantificati, mediante misura della densità ottica, usando NIH Image analysis software. I valori sono stati espressi come rapporto tra i valori di ossidazione dei campioni trattati rispetto ai controlli normali, e normalizzati con il valore densitometrico del colorante rosso Ponceau della corrispondente banda dell'actina.

4.4 Analisi densitometrica e statistica

L'intensità relativa delle bande positive all'autoradiografia è stata valutata mediante densitometria. Le lastre autoradiografiche sono state analizzate utilizzando il cromatoscanner Shimadzu CS-930 alla lunghezza d'onda di 600 nm. I valori ottenuti sono stati espressi in percentuale rispetto alla media dei valori delle densitometrie dei campioni di controllo, caricati sul medesimo gel e normalizzati sui valori della densitometria effettuata sulla reattività per l' α -actinina. I valori sono stati espressi come media e SEM. La presenza di differenza statisticamente significativa tra campioni trattati e di controllo è stata valutata utilizzando ANOVA o il test di Student. Valori di $p \leq 0,05$ sono stati considerati significativi. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma Sigma Stat versione 2.0 (Jandel Europe, Germany).

5 Apoptosi

5.1 Saggio Tunel

Colture di C2C12 (16000 cellule per vetrino, diametro 13 mm) non trasfettate o dopo 24 ore dalla trasfezione transiente con la tecnica del Calcio fosfato sono esposte a Staurosporina $1\mu\text{M}$ per vari tempi. Alcuni vetrini sono utilizzati per valutare l'entità della necrosi, che segue l'evento apoptotico, con Propidio Ioduro $1\mu\text{M}$: i vetrini vengono brevemente sciacquati con PBS 1mM, fissati con paraformaldeide al 4% in PBS per 20 minuti e montati con gliucero in presenza di DAPI.

Negli altri vetrini la presenza di apoptosi è dimostrata mediante analisi TUNEL (Tdt-mediated d UTP Nick End Labeling). Questa tecnica permette di visualizzare la frammentazione del DNA: l'estremità libera 3'-OH, generate dal taglio a doppio filamento di DNA ad opera di endonucleasi, favorisce il legame della Terminal deossinucleotil nucleasi (Tdt), che esercita la funzione di polimerasi permettendo l'incorporazione di nucleotidi marcati (dUTP coniugato a FITC). Dopo rimozione del terreno di coltura i vetrini vengono fatti asciugare all'aria per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi fissati con paraformaldeide 4% in PBS per 30 minuti. I vetrini vengono quindi risciacquati per 30 min con PBS sterile e disidratati per 2 min con etanolo 100%. A questo punto i vetrini possono essere conservati a -20°C. Il protocollo prosegue con una rapida reidratazione dei vetrini con PBS sterile e permeabilizzazione 2 minuti a 4°C con Triton X 100 0.1% freddo in Na citrato 0.1%. Terminato il risciacquo, ogni vetrino è incubato per 60 minuti a 37°C. Per vetrino il mix di reazione contiene l'enzima 5U TdT in 100mM tampone cacodilato, 1mM CoCl₂ e 0.5nmol di dUTP coniugato con Fluorescein-12-dUTP (FITC) (Roche). Al termine dell'incubazione i vetrini sono sciacquati per 2 volte con PBS per 10 min. Allo scopo di visualizzare la reazione TUNEL nelle cellule trasfettate e quindi positive per la GFP, i vetrini sono stati incubati con anticorpo anti-FITC ottenuto in pecora (Roche, 1:50 in PBS contenente albumina bovina allo 0,5%) seguiti con anticorpi di pecora coniugati con radamina(Cappel, 1:100). Dopo il risciacquo con PBS, l'autofluorescenza è stata spenta mediante incubazione per 15 minuti a temperatura ambiente con ammonio cloruro NH₄Cl 50mM. Dopo un adeguato risciacquo, i vetrini sono stati montati su vetrini porta oggetto con glicerolo-PBS addizionato con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e osservati al microscopio a fluorescenza (Axioplan Zeiss, Germany).

5.2 Saggio per la Caspasi 3

Per ciascun clone C2C12, le cellule sono state piastrate in terreno DMEM con G418 su piastre da 6 pozzetti direttamente su plastica, in modo da ottenere il giorno seguente, per pozzetto, un numero uguale di cellule (circa 10⁶). In questo modo possono essere testati campioni multipli per clone. In parallelo 4 dei 6 pozzetti vengono trattate con 1µM staurosporina per 6h, mentre i due pozzetti non

trattati vengono utilizzati come controllo. Dopo aver eliminato il terreno, le cellule vengono brevemente lavate con del PBS freddo e lisate con del tampone di lisi (promega). Il lisato viene raccolto con una microsiringa in una provetta. Sia il substrato cellulare che il tampone per il saggio della caspasi devono essere mantenuti a temperatura ambiente e vortexati subito prima di essere utilizzati. Per il saggio della Caspasi 3 viene utilizzata una piastra da 96 pozzetti contenente, in triplicato, i campioni per il bianco (senza estratto cellulare) e per ciascun clone, il controllo negativo (lisato cellulare non trattato con staurosporina) e il relativo campione cellulare in cui è stata indotta apoptosi. Il saggio è messo appunto per testare un volume superiore a 20µl (corrispondente a 25–100µg proteina totale) per campione di estratto cellulare. Per reazione vengono aggiunti per pozzetto 10µl 100mM DTT, 2µl DMSO e 32µl di tampone per Caspasi 3, l'appropriato volume di lisato da testare e si porta a volume finale totale di 100µl con acqua deionizzata. Si agita la piastra per mischiare i componenti della reazione e si mette a reagire a 37°C in termostato per almeno 1h, controllando, affinché la reazione enzimatica colorimetrica si verifichi. Quindi per ciascun pozzetto viene letta l'assorbanza a 405 nm e si calcola la relativa attività enzimatica di caspasi 3 come segue: si calcola la media dei valori (in triplicato) di assorbanza per ciascun clone trattato (e per il controllo negativo) e si sottrae il valore medio del bianco. Quindi si normalizza per il controllo.

6 Misura della $[Ca^{2+}]_i$

6.1 Uso della fotoproteina Equorina

Le cellule vengono co-trasfettate con il vettore dell'equorina di reticolo AEQ RE (Montero, et al., 1995) e quello per Grp94 (PBKrsv 8A) con un rapporto 1:3. La ricostituzione prevede uno specifico protocollo: il vetrino con le cellule trasfettate è immerso in 300 µl di salina KRB priva di $CaCl_2$, con EGTA 600 µM. Viene aggiunta ionomicina ad una concentrazione 5µM, allo scopo di svuotare completamente il reticolo ed evitare un consumo dell'equorina in esso presente. In questo caso viene utilizzata per la ricostituzione una forma modificata di celenterazina (chiamata celenterazina N, si usa a concentrazione 5 µM), che

presenta una minore affinità per il Ca^{2+} . Successivamente le cellule vengono incubate per la durata di almeno 1 ora al buio, a 4°C.

6.2 Strumentazione e misura della bioluminescenza dell'equorina

Il sistema utilizzato per la rilevazione si basa sul metodo descritto da Cobbold et al. (1991). I vetrini da 13 mm di diametro, su cui le cellule sono state precedentemente piastrate, fatte crescere e trasfettate, vengono messi all'interno di una camera di perfusione (15 mm di diametro per 2 mm di altezza), che è posta a diretto contatto con un fotomoltiplicatore (EMI 97890) con amplificatore-discriminatore automatico. La cameretta viene perfusa continuamente con una soluzione fisiologica standard a 37°C, a cui vengono aggiunti i diversi stimoli. Il segnale di uscita dell'amplificatore discriminatore è raccolto da un contatore di fotoni, inviato poi ad un computer e registrato per l'analisi successiva. Un programma costruito su un modello matematico permetterà poi la conversione del segnale di luminescenza in valori di concentrazione del Ca^{2+} .

6.3 Microscopio a fluorescenza

Il microscopio a fluorescenza utilizzato è costituito da un microscopio invertito (AXIOVERT 100 TV della ZEISS) dotato di un obiettivo 40X ad immersione, di una lampada (XENON SHORT ARC LAMP 75X-O della USHIO) come sorgente luminosa, di un monocromatore, di uno specchio dicroico, che filtra solo la luce fluorescente emessa a λ compresa tra 505-530 nm, e di una telecamera (CCD camera IMAGO) collegata ad un computer. Il programma (TILLvisION 4.0) consente sia la selezione delle opportune lunghezze d'onda, sia l'acquisizione delle immagini che raggiungono la telecamera.

Inoltre è possibile analizzare "on line" la cinetica delle variazioni del segnale di fluorescenza proveniente da ciascuna regione cellulare esaminata, mentre la variazione del Rapporto di Fluorescenza (340/380) o la corrispondente misura della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ possono essere ottenute, in seguito, tramite l'applicazione di un opportuno algoritmo ("off line" analisi).

Negli esperimenti presentati in questa tesi le cellule vengono illuminate alternativamente a 340 e a 380 nm ogni 10 msec, le immagini vengono acquisite a 0.5 – 1 Hz.

6.3.1 Caricamento con Fura-2/AM

Il caricamento delle cellule in coltura, precedentemente piastrate su vetrini da 24mm di diametro, prevede la loro incubazione, a 37°C per 30 minuti, in un terreno a cui è stato aggiunto Fura-2/AM (2 µM), Pluronic F-127 (0.005%) e sulfinirazione (250 µM), che impedisce sia l'uscita della forma esterificata del colorante dalle cellule che la captazione da parte degli organelli intracellulari (*Di Virgilio et al.*, 1998).

Trascorso il tempo di incubazione a 37°C, il terreno di coltura, contenente il Fura-2/AM, viene diluito 1:2 con una soluzione salina "standard" contenente sulfinirazione 250 µM ed il vetrino viene lasciato a temperatura ambiente per altri 30 minuti per favorire la deesterificazione dell'indicatore. Dopo la fase di caricamento, il monostrato cellulare viene lavato 2 volte con la soluzione salina mKRB (in mM:140 NaCl, 2.8 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 11 glucosio, pH7.4) per eliminare il Fura-2/AM in eccesso. Infine il vetrino viene montato su una cameretta contenente 1 ml di salina per l'osservazione al microscopio. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C e le cellule sono state stimulate per rapido mescolamento con i diversi stimoli.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelmalki, A., S. Fimbel, et al. (1996). "Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training." *Pflugers Arch* 431(5): 671-9.
- Abraham, N. G. (1991). "Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis." *Blood Rev* 5(1): 19-28.
- Adhikari, A. S., K. Sridhar Rao, et al. (2004). "Heat stress-induced localization of small heat shock proteins in mouse myoblasts: intranuclear lamin A/C speckles as target for alphaB-crystallin and Hsp25." *Exp Cell Res* 299(2): 393-403.
- Altmeyer, A., R. G. Maki, et al. (1996). "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." *Int J Cancer* 69(4): 340-9.
- Argon, Y. and B. B. Simen (1999). "GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties." *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 495-505.
- Bakhshi, J., L. Weinstein, et al. (2008). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin." *Apoptosis* 13(7): 904-14.
- Balogun, E., M. Hoque, et al. (2003). "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element." *Biochem J* 371(Pt 3): 887-95.
- Bando, Y., T. Katayama, et al. (2004). "GRP94 reduces cell death in SH-SY5Y cells perturbed calcium homeostasis." *Apoptosis* 9(4): 501-8.
- Bando, Y., Katayama, T., et al. (2003). "GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) suppresses ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury". *Eur J Neurosci* 18(4):829-40.
- Bastianutto, C., E. Clementi, et al. (1995). "Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function." *J Cell Biol* 130(4): 847-55.
- Beere, H. M. and D. R. Green (2001). "Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis." *Trends Cell Biol* 11(1): 6-10.

- Benjamin, I. J., B. Kroger, et al. (1990). "Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6263-7.
- Bilmen, J. G., S. Z. Khan, et al. (2001). "Inhibition of the SERCA Ca²⁺ pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP." *Eur J Biochem* 268(23): 6318-27.
- Biswas, C., U. Sriram, et al. (2006). "The N-terminal fragment of GRP94 is sufficient for peptide presentation via professional antigen-presenting cells." *Int Immunol* 18(7): 1147-57.
- Bolli, R. (2000). "The late phase of preconditioning." *Circ Res* 87(11): 972-83.
- Booth, C. and G. L. Koch (1989). "Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins." *Cell* 59(4): 729-37.
- Borger, D. R. and D. A. Essig (1998). "Induction of HSP 32 gene in hypoxic cardiomyocytes is attenuated by treatment with N-acetyl-L-cysteine." *Am J Physiol* 274(3 Pt 2): H965-73.
- Brini, M., R. Marsault, et al. (1995). "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation." *J Biol Chem* 270(17): 9896-903.
- Bruneau, N., D. Lombardo, et al. (1998). "Participation of GRP94-related protein in secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase and in its internalization by the intestinal epithelium." *J Cell Sci* 111 (Pt 17): 2665-79.
- Cala, S. E. (2000). "GRP94 hyperglycosylation and phosphorylation in Sf21 cells." *Biochim Biophys Acta* 1496(2-3): 296-310.
- Capel, F., L. Demaison, et al. (2005). "Calcium overload increases oxidative stress in old rat gastrocnemius muscle." *J Physiol Pharmacol* 56(3): 369-80.
- Camacho, P. and J. D. Lechleiter (1995). "Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves." *Cell* 82(5): 765-71.
- Chavany, C., E. Mimnaugh, et al. (1996). "p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by

- benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2." *J Biol Chem* 271(9): 4974-7.
- Ciolino, H. P., P. J. Daschner, et al. (1998). "Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells." *Biochem Pharmacol* 56(2): 197-206.
 - Cobbold, P. H., A. Sanchez-Bueno, et al. (1991). "The hepatocyte calcium oscillator." *Cell Calcium* 12(2-3): 87-95.
 - Csermely, P., T. Schnaider, et al. (1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review." *Pharmacol Ther* 79(2): 129-68.
 - Demaurex, N. and C. Distelhorst (2003). "Cell biology. Apoptosis--the calcium connection." *Science* 300(5616): 65-7.
 - Demirel, S., V. Akkaya, et al. (2002). "Heart rate variability after coronary artery bypass graft surgery: a prospective 3-year follow-up study." *Ann Noninvasive Electrocardiol* 7(3): 247-50.
 - Desplanches, D., L. Ecochard, et al. (2004). "Skeletal muscle HSP72 response to mechanical unloading: influence of endurance training." *Acta Physiol Scand* 180(4): 387-94.
 - Donnelly, D. F. and D. Kholwadwala (1992). "Hypoxia decreases intracellular calcium in adult rat carotid body glomus cells." *J Neurophysiol* 67(6): 1543-51.
 - Duchen, M. R. (2004). "Roles of mitochondria in health and disease." *Diabetes* 53 Suppl 1: S96-102.
 - Durante, W., K. J. Peyton, et al. (1999). "Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(11): 2666-72.
 - Eisenstein, R. S., D. Garcia-Mayol, et al. (1991). "Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3): 688-92.
 - Ferreira, L. R., K. Norris, et al. (1994). "Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones." *J Cell Biochem* 56(4): 518-26.

- Freimann, S., M. Scheinowitz, et al. (2005). "Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression." *J Am Coll Cardiol* 45(6): 931-8.
- Gorza, L. (1990). "Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies." *J Histochem Cytochem* 38(2): 257-65.
- Gorza, L. and F. del Monte (2005). "Protein unfolding in cardiomyopathies." *Heart Fail Clin* 1(2): 237-50.
- Gorza, L. and M. Vitadello (2000). "Reduced amount of the glucose-regulated protein GRP94 in skeletal myoblasts results in loss of fusion competence." *Faseb J* 14(3): 461-75.
- Goto, K., M. Honda, et al. (2004). "Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat." *Jpn J Physiol* 54(3): 285-93.
- Haider, A., R. Olszanecki, et al. (2002). "Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 188-94.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." *Free Radic Res* 31(4): 261-72.
- Hammond, C. and A. Helenius (1993). "A chaperone with a sweet tooth." *Curr Biol* 3(12): 884-6.
- Hirose, L., K. Nosaka, et al. (2004). "Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors." *Exerc Immunol Rev* 10: 75-90.
- Hornef, M. W., B. H. Normark, et al. (2003). "Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* 198(8): 1225-35.
- Hunter, R. B., H. Mitchell-Felton, et al. (2001). "Expression of endoplasmic reticulum stress proteins during skeletal muscle disuse atrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(4): C1285-90.
- Hutter, D. A., R. Berkowitz, et al. (2006). "Application of continuous positive airway pressure in hypoxemic acute respiratory failure associated with diastolic dysfunction in pregnancy." *Congest Heart Fail* 12(3): 174-5.

- Itoh, K., N. Wakabayashi, et al. (2003). "Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles." *Genes Cells* 8(4): 379-91.
- Izumo, S. and H. Aoki (1998). "Calcineurin--the missing link in cardiac hypertrophy." *Nat Med* 4(6): 661-2.
- Jasmin, B. J. and V. Gisiger (1990). "Regulation by exercise of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles: opposite effect of running training in antagonist muscles." *J Neurosci* 10(5): 1444-54.
- Jaspers, S. R. and M. E. Tischler (1984). "Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension." *J Appl Physiol* 57(5): 1472-9.
- Ji, L. L. (2002). "Exercise-induced modulation of antioxidant defense." *Ann N Y Acad Sci* 959: 82-92.
- Jin, B. and Y. P. Li (2007). "Curcumin prevents lipopolysaccharide-induced atrogen-1/MAFbx upregulation and muscle mass loss." *J Cell Biochem* 100(4): 960-9.
- Kacimi, R., J. Chentoufi, et al. (2000). "Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection." *Cardiovasc Res* 46(1): 139-50.
- Kadowaki, H., H. Nishitoh, et al. (2004). "Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases." *J Chem Neuroanat* 28(1-2): 93-100.
- Kaufman, R. J. (2002). "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease." *J Clin Invest* 110(10): 1389-98.
- Kaufmann, S. H. (1994). "Heat shock proteins and autoimmunity: a critical appraisal." *Int Arch Allergy Immunol* 103(4): 317-22.
- Kelly, D. A., P. M. Tiidus, et al. (1996). "Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70." *J Appl Physiol* 81(6): 2379-85.
- Kelley, PM and Schlesinger, MJ (1978). "The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts". *Cell*. 15(4):1277-86.

- Keyse, S. M. and R. M. Tyrrell (1987). "Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts." *J Biol Chem* 262(30): 14821-5.
- Khassaf, M., R. B. Child, et al. (2001). "Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise." *J Appl Physiol* 90(3): 1031-5.
- Khassaf, M., A. McArdle, et al. (2003). "Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle." *J Physiol* 549(Pt 2): 645-52.
- Kikuchi, G., T. Yoshida, et al. (2005). "Heme oxygenase and heme degradation." *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 558-67.
- Kilgore, J. L., B. F. Timson, et al. (1994). "Stress protein induction in skeletal muscle: comparison of laboratory models to naturally occurring hypertrophy." *J Appl Physiol* 76(2): 598-601.
- Knittler, M. R. and I. G. Haas (1992). "Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release." *Embo J* 11(4): 1573-81.
- Kondo, H., K. Nishino, et al. (1994). "Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization." *FEBS Lett* 349(2): 169-72.
- Ku, Z., J. Yang, et al. (1995). "Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol* 268(6 Pt 1): C1369-74.
- Kushida, T., G. Li Volti, et al. (2002). "Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation injury in endothelial cells." *J Cell Biochem* 87(4): 377-85.
- Kuznetsov, G., L. B. Chen, et al. (1994). "Several endoplasmic reticulum stress proteins, including ERp72, interact with thyroglobulin during its maturation." *J Biol Chem* 269(37): 22990-5.
- Lawler, J. M., W. Song, et al. (2003). "Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle." *Free Radic Biol Med* 35(1): 9-16.

- Lee, P. J., B. H. Jiang, et al. (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia." *J Biol Chem* 272(9): 5375-81.
- Leger, C. (2000). "[Vitamin E and cardiovascular prevention]." *Ann Biol Clin (Paris)* 58(5): 527-40.
- Lennon, S. L., J. C. Quindry, et al. (2004). "Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion." *Acta Physiol Scand* 182(2): 161-9.
- Lepore, D. A., K. R. Knight, et al. (2001). "Role of priming stresses and Hsp70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle." *Cell Stress Chaperones* 6(2): 93-6.
- Liu, H., R. C. Bowes, 3rd, et al. (1997). "Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells." *J Biol Chem* 272(35): 21751-9.
- Li, Y. and P. Camacho (2004). "Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57." *J Cell Biol* 164(1): 35-46.
- Li, CY., Lee, JS., et al. (2000). "Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation". *J Biol Chem* 275(33):25665-71.
- Liu, H., R. C. Bowes, 3rd, et al. (1997). "Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells." *J Biol Chem* 272(35): 21751-9.
- Liu, H., E. Miller, et al. (1998). "Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death." *J Biol Chem* 273(21): 12858-62.
- Liu, Y., Lormes, W., Wang, L., et al. (2004) "Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training". *Eur J Appl Physiol* 91(2-3):330-5.
- Liu, Y., L. Gampert, et al. (2006). "Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70." *Front Biosci* 11: 2802-27.
- Lievremont, J. P., R. Rizzuto, et al. (1997). "BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important

role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} ." *J Biol Chem* 272(49): 30873-9.

- Linnik, K. M. and H. Herscovitz (1998). "Multiple molecular chaperones interact with apolipoprotein B during its maturation. The network of endoplasmic reticulum-resident chaperones (ERp72, GRP94, calreticulin, and BiP) interacts with apolipoprotein b regardless of its lipidation state." *J Biol Chem* 273(33): 21368-73.
- Little, E. and A. S. Lee (1995). "Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter." *J Biol Chem* 270(16): 9526-34.
- Liu, X. M., K. J. Peyton, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival." *J Biol Chem* 280(2): 872-7.
- Liu, Y., L. Gampert, et al. (2006). "Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70." *Front Biosci* 11: 2802-27.
- Liu, Y., Lormes, W., Wang, L., et al. (2004) "Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training". *Eur J Appl Physiol* 91(2-3):330-5.
- Liu, Y. and J. M. Steinacker (2001). "Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance." *Front Biosci* 6: D12-25.
- Locke, M., E. G. Noble, et al. (1990). "Exercising mammals synthesize stress proteins." *Am J Physiol* 258(4 Pt 1): C723-9.
- Locke, M., E. G. Noble, et al. (1991). "Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern." *Am J Physiol* 261(5 Pt 1): C774-9.
- Locke, M. and C. Celotti (2001). "Cold stress does not induce stress proteins SP 25 and SP 72 in rat skeletal muscle." *Cryobiology* 43(1): 54-62.
- Locke, M., Atkinson B.G., et al. (1994). "Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content". *Am J Physiol* 266(5 Pt 1):C1240-6.

- Locke, M. and E. G. Noble (1995). "Stress proteins: the exercise response." *Can J Appl Physiol* 20(2): 155-67.
- Luo, G., X. Sun, et al. (2001). "Heat shock protects L6 myotubes from catabolic effects of dexamethasone and prevents downregulation of NF-kappaB." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(4): R1193-200.
- Macario, A. J. and E. Conway de Macario (2005). "Sick chaperones, cellular stress, and disease." *N Engl J Med* 353(14): 1489-501.
- Maglara, A. A., A. Vasilaki, et al. (2003). "Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins." *J Physiol* 548(Pt 3): 837-46.
- Marini, M., R. Lapalombella, et al. (2007). "Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile." *Eur J Appl Physiol* 99(5): 503-10.
- Mazarella, R. A. and M. Green (1987). "ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP94)." *J Biol Chem* 262(18): 8875-83.
- McArdle, A., W. H. Dillmann, et al. (2004). "Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction." *Faseb J* 18(2): 355-7.
- McCormick, J. G., D. T. Harris, et al. (1982). "Spontaneous genetic hypertension in the rat and its relationship to reduced ac cochlear potentials: implications for preservation of human hearing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(8): 2668-72.
- Melnick, J., S. Aviel, et al. (1992). "The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains." *J Biol Chem* 267(30): 21303-6.
- Mery, L., N. Mesaeli, et al. (1996). "Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx." *J Biol Chem* 271(16): 9332-9.
- Meunier, L., Y. K. Usherwood, et al. (2002). "A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins." *Mol Biol Cell* 13(12): 4456-69.

- Michalak, K. and A. B. Hendrich (2002). "[Role of cell membrane lipids in multidrug resistance and its modulation]." *Postepy Biochem* 48(3): 208-19.
- Michalak, M., E. F. Corbett, et al. (1999). "Calreticulin: one protein, one gene, many functions." *Biochem J* 344 Pt 2: 281-92.
- Mikami, T., S. Sumida, et al. (2004). "Endurance exercise training inhibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of mice [correction of rats] exposed to stress by induction of heat shock protein 70." *J Appl Physiol* 96(5): 1776-81.
- Mitchell, J. B., J. P. Dugas, et al. (2002). "Effect of exercise, heat stress, and hydration on immune cell number and function." *Med Sci Sports Exerc* 34(12): 1941-50.
- Montero, M., M. Brini, et al. (1995). "Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells." *Embo J* 14(22): 5467-75.
- Moran, M., J. Delgado, et al. (2004). "Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training." *Acta Physiol Scand* 180(2): 157-66.
- Morita, T., M. A. Perrella, et al. (1995). "Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1475-9.
- Morton, J. P., D. P. Maclaren, et al. (2007). "Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men." *Acta Physiol (Oxf)* 190(4): 319-27.
- Moseley, P. L. (1997). "Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism." *J Appl Physiol* 83(5): 1413-7.
- Muller, F.L. , W. Song, et al. (2007). " Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.293(3):R1159-68.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." *Cell* 48(5): 899-907.

- Naito, H., S. K. Powers, et al. (2000). "Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats." *J Appl Physiol* 88(1): 359-63.
- Naito, H., S. K. Powers, et al. (2001). "Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats." *Med Sci Sports Exerc* 33(5): 729-34.
- Nakamura, K., E. Bossy-Wetzel, et al. (2000). "Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis." *J Cell Biol* 150(4): 731-40.
- Nakamura, K., M. Robertson, et al. (2001). "Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin." *J Clin Invest* 107(10): 1245-53.
- Nakano, H., E. Kobayashi, et al. (1987). "Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60." *J Antibiot (Tokyo)* 40(5): 706-8.
- Neuffer, P. D., G. A. Ordway, et al. (1996). "Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle." *Am J Physiol* 271(6 Pt 1): C1828-37.
- Nigam, S. K., A. L. Goldberg, et al. (1994). "A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily." *J Biol Chem* 269(3): 1744-9.
- Ning, W., R. Song, et al. (2002). "TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5): L1094-102.
- Nishizawa, J., A. Nakai, et al. (1996). "Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart." *Circulation* 94(9): 2185-92.
- Noble, E. G., A. Moraska, et al. (1999). "Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training." *J Appl Physiol* 86(5): 1696-701.

- Noble, E. G., R. Ho, et al. (2006). "Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats." *Acta Physiol (Oxf)* 187(4): 495-501.
- Oishi, Y., A. Ishihara, et al. (2001). "Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles." *Acta Physiol Scand* 172(2): 123-30.
- Oishi, Y., K. Taniguchi, et al. (2002). "Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature." *J Appl Physiol* 92(3): 1097-103.
- Oishi, Y., K. Taniguchi, et al. (2003). "Differential responses of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle." *Muscle Nerve* 28(5): 587-94.
- Oishi, Y., K. Taniguchi, et al. (2003). "Upregulation of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading." *Jpn J Physiol* 53(4): 281-6.
- Oishi, Y., T. Ogata, et al. (2005). "Calcineurin and heat shock protein 72 in functionally overloaded rat plantaris muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 330(3): 706-13.
- O'Neill, D. E., F. K. Aubrey, et al. (2006). "Slower skeletal muscle phenotypes are critical for constitutive expression of Hsp70 in overloaded rat plantaris muscle." *J Appl Physiol* 100(3): 981-7.
- Ornatsky, O. I., M. K. Connor, et al. (1995). "Expression of stress proteins and mitochondrial chaperonins in chronically stimulated skeletal muscle." *Biochem J* 311 (Pt 1): 119-23.
- Otterbein, L. E. and A. M. Choi (2000). "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6): L1029-37.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." *Cell Death Differ* 11(4): 381-9.
- Pachori, A. S., A. Smith, et al. (2007). "Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway." *J Mol Cell Cardiol* 43(5): 580-92.

- Pette, D. and R. S. Staron (2000). "Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions." *Microsc Res Tech* 50(6): 500-9.
- Pietrobon, D., F. Di Virgilio, et al. (1990). "Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells." *Eur J Biochem* 193(3): 599-622.
- Pimstone, N. R., P. Engel, et al. (1971). "Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism." *J Clin Invest* 50(10): 2042-50.
- Pinton, P., D. Ferrari, et al. (2000). "Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells." *J Cell Biol* 148(5): 857-62.
- Pinton, P., Ferrari, D., et al. (2001). "The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action". *EMBO J* 20(11):2690-701.
- Pizzo, P., C. Fasolato, et al. (1997). "Dynamic properties of an inositol 1,4,5-trisphosphate- and thapsigargin-insensitive calcium pool in mammalian cell lines." *J Cell Biol* 136(2): 355-66.
- Platt, J. L. and K. A. Nath (1998). "Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse." *Nat Med* 4(12): 1364-5.
- Plummer, S. M., K. A. Holloway, et al. (1999). "Inhibition of cyclooxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex." *Oncogene* 18(44): 6013-20.
- Podack, E. R. and L. E. Racz (2007). "Allogeneic tumor-cell-based vaccines secreting endoplasmic reticulum chaperone gp96." *Expert Opin Biol Ther* 7(11): 1679-88.
- Poso, A. R. (2002). "Monocarboxylate transporters and lactate metabolism in equine athletes: a review." *Acta Vet Scand* 43(2): 63-74.
- Powers, S. K., S. L. Lennon, et al. (2002). "Exercise and cardioprotection." *Curr Opin Cardiol* 17(5): 495-502.

- Powers, S. K., J. C. Quindry, et al. (2008). "Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury." *Free Radic Biol Med* 44(2): 193-201.
- Puntschart, A., M. Vogt, et al. (1996). "Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise." *Acta Physiol Scand* 157(4): 411-7.
- Radak, Z., M. Sasvari, et al. (2000). "Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium." *Arch Biochem Biophys* 376(2): 248-51.
- Radak, Z., M. Sasvari, et al. (2000). "Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle." *Arch Biochem Biophys* 383(1): 114-8.
- Raju, V. S. and M. D. Maines (1994). "Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs." *Biochim Biophys Acta* 1217(3): 273-80.
- Raju, V. S., W. K. McCoubrey, Jr., et al. (1997). "Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element." *Biochim Biophys Acta* 1351(1-2): 89-104.
- Ran, Q., R. Wadhwa, et al. (2000). "Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75." *Biochem Biophys Res Commun* 275(1): 174-9.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." *J Biol Chem* 276(36): 33869-74.
- Rao, R. V., A. Peel, et al. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78." *FEBS Lett* 514(2-3): 122-8.
- Reddy, R. K., J. Lu, et al. (1999). "The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis." *J Biol Chem* 274(40): 28476-83.

- Ronchi, R., L. Marano, et al. (2004). "Effects of broad band electromagnetic fields on HSP70 expression and ischemia-reperfusion in rat hearts." *Life Sci* 75(16): 1925-36.
- Ryter, S. W., J. Alam, et al. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." *Physiol Rev* 86(2): 583-650.
- Salo, D. C., C. M. Donovan, et al. (1991). "HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise." *Free Radic Biol Med* 11(3): 239-46.
- Samelman, T. R. (2000). "Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training." *Exp Physiol* 85(1): 92-102.
- Sato, Y., D. G. Ferguson, et al. (1998). "Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice." *J Biol Chem* 273(43): 28470-7.
- Schaiff, W. T., K. A. Hruska, Jr., et al. (1992). "HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells." *J Exp Med* 176(3): 657-66.
- Scorrano, L. (2003). "Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis." *Cell Death Differ* 10(12): 1287-9.
- Scorrano, L., Oakes, SA., et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis". *Science* 300(5616):135-9.
- Sharma, R. A., A. J. Gescher, et al. (2005). "Curcumin: the story so far." *Eur J Cancer* 41(13): 1955-68.
- Shibahara, S., R. M. Muller, et al. (1987). "Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock." *J Biol Chem* 262(27): 12889-92.
- Sies, H. and W. Stahl (1995). "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." *Am J Clin Nutr* 62(6 Suppl): 1315S-1321S.
- Siu, P. M., R. W. Bryner, et al. (2004). "Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles." *Faseb J* 18(10): 1150-2.

- Smolka, M. B., C. C. Zoppi, et al. (2000). "HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(5): R1539-45.
- Snoeckx, L. H., R. N. Cornelussen, et al. (2001). "Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology." *Physiol Rev* 81(4): 1461-97.
- Sorger, P. K., M. J. Lewis, et al. (1987). "Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells." *Nature* 329(6134): 81-4.
- Srikakulam, R. and D. A. Winkelmann (2004). "Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle." *J Cell Sci* 117(Pt 4): 641-52.
- Stevenson, E. J., P. G. Giresi, et al. (2003). "Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle." *J Physiol* 551(Pt 1): 33-48.
- Strom, C. C., M. Aplin, et al. (2005). "Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy." *Febs J* 272(11): 2684-95.
- Strbo, N. and E. R. Podack (2008). "Secreted Heat Shock Protein gp96-Ig: An Innovative Vaccine Approach." *Am J Reprod Immunol* 59(5): 407-16.
- Sumbilla, C., D. Lewis, et al. (2002). "The slippage of the Ca²⁺ pump and its control by anions and curcumin in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 277(16): 13900-6.
- Sweet, D. (2003). "Cellular development." *Dev Cell* 5(6): 817.
- Szegezdi, E., U. Fitzgerald, et al. (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." *Ann N Y Acad Sci* 1010: 186-94.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, et al. (1986). "Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 135(2): 397-402.
- Tanguay, R. M., Y. Wu, et al. (1993). "Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress." *Dev Genet* 14(2): 112-8.

- Tarricone, E., C. Scapin, et al. (2008). "Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia." *Cell Stress Chaperones* (In press).
- Vescovo, G., B. Ravara, et al. (2008). "Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure." *Basic Res Cardiol* 103(3): 285-90.
- Vitadello, M., J. Ausma, et al. (2001). "Increased myocardial GRP94 amounts during sustained atrial fibrillation: a protective response?" *Circulation* 103(17): 2201-6.
- Vitadello, M., P. Colpo, et al. (1998). "Rabbit cardiac and skeletal myocytes differ in constitutive and inducible expression of the glucose-regulated protein GRP94." *Biochem J* 332 (Pt 2): 351-9.
- Vitadello, M., D. Penzo, et al. (2003). "Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia." *Faseb J* 17(8): 923-5.
- Volpe, P., A. Villa, et al. (1992). "The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6142-6.
- Wanderling, S., Simen, B. B., et al. (2007). " GRP94 Is Essential for Mesoderm Induction and Muscle Development Because It Regulates Insulin-like Growth Factor Secretion." *Mol Biol Cell* 18(10): 3764–3775.
- Welch, W. J., J. I. Garrels, et al. (1983). "Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca²⁺-ionophore-regulated proteins." *J Biol Chem* 258(11): 7102-11.
- Wijayanti, N., S. Huber, et al. (2004). "Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression." *Antioxid Redox Signal* 6(5): 802-10.
- Wyke, S. M. and M. J. Tisdale (2006). "Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." *Life Sci* 78(25): 2898-910.

- Yang, L., X. Liu, et al. (2008). "Glucose-regulated protein 75 suppresses apoptosis induced by glucose deprivation in PC12 cells through inhibition of Bax conformational change." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40(4): 339-48.
- Yano, K. and A. Zarain-Herzberg (1994). "Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties." *Mol Cell Biochem* 135(1): 61-70.
- Yet, S. F., R. Tian, et al. (2001). "Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice." *Circ Res* 89(2): 168-73.
- Yu, Z., Luo, H., et al. (1999). "The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis." *Exp Neurol* 155(2):302-14.
- Zhang, F., N. K. Altorki., et al. (1999). "Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells." *Carcinogenesis* 20(3): 445-51.