

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 1° anno

TITOLO:

**Attivazione Adenosina-dipendente del Fattore 1 Inducibile da Ipossia
indotta da Precondizionamento Ritardato in Cellule Epatiche.**

Candidato: Imarisio Chiara

***Tutor:* Prof.ssa Carini Rita**

INDICE

INTRODUZIONE	3
Il danno da ischemia-riperfusionazione nel fegato.	3
Il preconditionamento ischemico.	3
Il preconditionamento epatico.	4
Mediatori intracellulari del preconditionamento epatico.	4
Meccanismi intracellulari del preconditionamento precoce.	4
Il preconditionamento ritardato.	5
Fattore indotto da ipossia-1 (HIF-1).....	5
Le Anidrase Carboniche.	7
SCOPO DEL LAVORO	8
MATERIALI E METODI	9
Reagenti.	9
Isolamento e Trattamento degli epatociti.....	9
Preparazione delle frazioni nucleari.	10
Analisi della Mobilità Elettroforetica di complessi DNA-proteine nucleari (EMSA).....	10
Saggio di Trasfezione transiente.....	11
Misurazione dell'espressione di HIF-1.....	11
Misurazione dell'espressione di Anidrase Carbonica IX.....	11
Determinazione della vitalità cellulare.....	12
Misurazione del pH citosolico.	12
Misurazione del contenuto di Na ⁺ intracellulare.	12
Analisi dei dati e calcoli statistici.	12
RISULTATI	13
Il preconditionamento ritardato degli epatociti protegge dalle alterazioni del pH e del Na ⁺ intracellulare e dal danno indotto da ischemia simulata.	13
La stimolazione del Recettore A _{2A} dell'adenosina attiva HIF-1 negli epatociti preconditionati.....	16
HIF-1 induce l'espressione dell'Anidrase Carbonica IX in epatociti preconditionati.....	19
L'espressione dell'Anidrase Carbonica IX media gli effetti protettivi del preconditionamento ritardato contro il danno da ipossia.	22
DISCUSSIONE	24
BIBLIOGRAFIA	27
ATTIVITA' FORMATIVA	32
CORSI FREQUENTATI	33
CONGRESSI FREQUENTATI	33
PUBBLICAZIONI	33
PARTECIPAZIONI A SEMINARI	34

INTRODUZIONE

Il danno da ischemia-riperfusionem nel fegato.

Molti interventi di chirurgia epatica richiedono il mantenimento del fegato in una condizione di ischemia che può prolungarsi da 15 fino a 50 minuti. È ormai riconosciuto che il danno epatico conseguente ad epatectomia parziale o trapianto è il risultato delle alterazioni che si producono sia durante il periodo ischemico che durante la successiva riperfusione (Serracino-Ingloft et al., 2001). Nonostante lo sviluppo di tecniche chirurgiche abbia consentito una notevole riduzione del periodo ischemico, l'esposizione ad ischemia seguita da riperfusione è la principale causa del danno epatico durante la resezione del fegato e di gravi complicanze nel fegato trapiantato, come il mal funzionamento totale o parziale dell'innesto. Inoltre il danno da riperfusione può danneggiare il fegato a lungo termine ed aumentare la suscettibilità del paziente alle infezioni ed a fallimenti multipli dell'organo (Jaeschke, 2003).

Molti fattori contribuiscono al danno epatico da ischemia-riperfusionem. Durante il periodo ischemico si ha mancato apporto di ossigeno che determina la de-energizzazione dei mitocondri, con riduzione dell'adenosina trifosfato (ATP) ed alterazioni dell'omeostasi dell'idrogeno (H^+), del sodio (Na^+) e del calcio (Ca^{2+}) (Bronk et al., 1991; Gasbarrini et al., 1992; Carini et al., 1995; Rosser et al., 1995). Durante il periodo di riperfusione, con la reintroduzione dell'ossigeno, si ha, da parte dei mitocondri, la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che promuovono lo stress ossidativo, la transizione della permeabilità mitocondriale e una ridotta capacità di sintesi dell'ATP (Jassem et al., 2002). Tali eventi inducono attivazione di necrosi, caspasi ed apoptosi (Jassem et al., 2002). In questa fase si verifica anche l'attivazione delle cellule di Kupffer con il conseguente rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ossido nitrico (NO) e citochine pro-infiammatorie (Lentsch et al., 2000). Le citochine, insieme all'aumentata espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali dei sinusoidi, promuovono l'infiltrazione epatica dei neutrofili, con conseguente progressione del danno alle cellule parenchimali del fegato (Lentsch et al., 2000).

Il preconditionamento ischemico.

Gli studi fino ad ora intrapresi per ridurre le conseguenze dell'ischemia-riperfusionem epatica si sono focalizzati sulla ricerca di sistemi in grado di bloccare le alterazioni finali, che sono la causa della morte cellulare in seguito ad ischemia (alterazioni energetiche e ioniche) ed a riperfusione (infiammazione). I risultati ottenuti però non sono stati soddisfacenti.

Notevoli speranze sono derivate dalla scoperta del fenomeno noto come "preconditionamento". Tale scoperta ha dimostrato che i tessuti posseggono una complessa rete di sistemi molecolari che, una volta attivati, prevengono l'insorgenza delle alterazioni energetiche, ioniche ed infiammatorie durante l'ischemia-riperfusionem. Questo fenomeno è stato descritto per la prima volta da Murry e coll. nel miocardio, ma è stato successivamente documentato in altri organi quali il fegato, il cervello e l'intestino. In tutti questi tessuti è stato osservato che l'esposizione (o "preconditionamento") ad un primo ciclo di ischemia-riperfusionem protegge dal danno prodotto da una successiva ischemia o ischemia-riperfusionem prolungata (Yellon DM. et al., 2000). Gli studi compiuti sul cuore hanno dimostrato che gli effetti del preconditionamento ischemico si possono produrre in due fasi caratterizzate da differenti tempi e meccanismi: una fase immediata (preconditionamento precoce) che segue immediatamente la transitoria ipossia e dura 2-3 ore ed una fase

tardiva (precondizionamento ritardato) che inizia dopo 12-24 ore dal trattamento preconditionante e può durare fino a 3-4 giorni (Bolli et al., 2000; Cohen et al., 2000; Yellon DM. et al., 2000).

Con il termine preconditionamento si identifica perciò l'aumento della resistenza tissutale alla morte cellulare indotta da una pre-esposizione a uno stress non letale.

Il preconditionamento epatico.

Il fegato è uno degli organi in cui è stata dimostrata la possibilità di indurre il preconditionamento. Studi su topi e ratti hanno dimostrato che una breve interruzione (5-10 minuti) del flusso ematico seguita da 10-15 minuti di ri-perfusione riduce il danno epatico indotto da una successiva esposizione ad un periodo prolungato di ischemia seguita da ri-perfusione (Carini et al., 2003 a).

Il preconditionamento può essere indotto "in vitro", in epatociti isolati dal fegato di ratto, da 10 minuti di ipossia seguiti da 10 minuti di ri-ossigenazione (Carini et al., 2000). Nonostante molti studi intrapresi fino ad oggi, la comprensione dei meccanismi attraverso cui i fenomeni di preconditionamento aumentano la resistenza del fegato ai danni indotti da ipossia-ri-ossigenazione sono ancora in gran parte sconosciuti.

Mediatori intracellulari del preconditionamento epatico.

Recenti studi eseguiti da Peralta e coll. hanno dimostrato che il rilascio di adenosina e ossido nitrico (NO) gioca un ruolo chiave nel promuovere la protezione epatica da preconditionamento ischemico (Peralta et al., 1997).

Partendo da queste osservazioni ed utilizzando come modello cellulare preconditionato epatociti di fegato di ratto preconditionati con una breve ipossia-ri-ossigenazione, in studi precedenti abbiamo iniziato la caratterizzazione dei meccanismi e dei mediatori intracellulari responsabili del preconditionamento epatico. In particolare abbiamo visto che l'adenosina attiva la resistenza al danno ipossico degli epatociti tramite la stimolazione di una via di segnalamento che coinvolge i recettori A_{2A} , le proteine G_s , l'adenilato ciclasi, la PKA, le proteine G_i , la chinasi Src ed infine la fosfolipasi C e PI3K, che stimolano a loro volta l'attivazione di PKC ϵ/δ e p38 MAPK (Carini et al., 2001; 2004 a).

Come già menzionato, anche l'ossido nitrico, prodotto dalle cellule endoteliali, gioca un ruolo importante nel mediare il preconditionamento epatico. La capacità dell'NO di indurre il preconditionamento è stata confermata nel nostro modello di epatociti isolati da fegato di ratto e comporta la stimolazione di una via di segnalamento alternativa a quella regolata dall'adenosina che coinvolge la proteina Ras, la guanilato ciclasi, la chinasi dipendente dal cGMP ed ancora la PI3K e la p38 MAPK (Carini et al., 2003 b; 2006 a).

Meccanismi intracellulari del preconditionamento precoce.

Il danneggiamento dell'energizzazione cellulare è considerato la principale causa del danno agli epatociti conseguente all'ipossia-ri-perfusione (Bronk et al., 1991; Gasbarrini et al., 1992; Rosser et al., 1995; Carini et al., 1999).

Il progressivo accumulo di sodio citosolico in seguito ad ipossia deriva da un aumentato influsso di sodio ad opera della Na^+/K^+ ATPasi bloccata in conseguenza della mancanza di ATP, dall'attivazione dello scambiatore Na^+/H^+ e del

cotrasportatore $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ in risposta all'acidificazione del citosol (Carini et al., 2000). La protezione dall'aumento del sodio negli epatociti preconditionati è associata alla protezione dall'acidosi indotta da ipossia.

Gottlieb ha dimostrato che l'attivazione di una ATPasi vacuolare è importante nel proteggere i cardiomiociti preconditionati dall'acidosi intracellulare (Gottlieb et al., 1996). Tale proteina, distribuita in numerosi tipi cellulari tra cui gli epatociti, è fisiologicamente responsabile dell'acidificazione dei lisosomi ed endosomi (Arai et al., 1993).

Osservazioni ottenute negli epatociti preconditionati indicano anche che il controllo dell'acidosi richiede l'integrità del citoscheletro ed è associato alla traslocazione in membrana di vescicole endosomiche, regolata da p38 MAPK. Questo suggerisce la possibilità che il trasferimento della ATPasi vacuolare in membrana possa favorire l'estruzione di protoni, evitando l'attivazione di sistemi di tamponamento del pH dipendenti dal sodio. Tale effetto può essere critico per l'aumento della tolleranza epatica all'ischemia-riperfusion, in quanto l'accumulo di sodio intracellulare precipita la morte degli epatociti durante l'ipossia e l'inizio della riossigenazione (Carini et al., 1995; 2001; 2003 b; 2004 b; 2006 a)

Il preconditionamento ritardato.

Come accennato in precedenza, una seconda finestra di protezione è evidente circa 24 ore dopo l'applicazione dello stimolo preconditionante e può durare per 2-4 giorni. Il preconditionamento tardivo epatico è indotto da una transitoria ischemia-riperfusion (Kume et al., 1996; Shauer et al., 2003), da una breve ipertermia (Yamagami et al., 1998; Terajima et al., 2000), da un stress ossidativo (Ito et al., 2000) o dall'infusione di ANP (Kiemer et al., 2000; Yamagami et al., 2002).

Tutti questi stimoli migliorano la perfusione sinusoidale post-ischemica, attenuano l'infiltrazione dei leucociti, la produzione di bile e il rilascio di aminotransferasi fino a 48 ore dopo. Proprio per la sua maggior durata, il preconditionamento ritardato può essere particolarmente rilevante nel miglioramento dei trapianti di fegato.

Comunque, l'attuale conoscenza dei meccanismi responsabili è completamente preliminare. È stato dimostrato nel miocardio che il preconditionamento tardivo è associato alla sintesi di proteine citoprotettive quali l'NO sintasi inducibile, la Mn superossido dismutasi, la cicloossigenasi-2 e aldoso reductasi (Bolli et al., 2000; Hoshida et al., 2002; Bolli et al., 2002). Recenti osservazioni hanno mostrato che gli effetti citoprotettivi della fase ritardata del preconditionamento sono associati all'attivazione della trascrizione del DNA ed alla sintesi di nuove proteine (Lai et al., 2004; Koti et al., 2005).

Fattore indotto da ipossia-1 (HIF-1).

L'espressione di specifici geni in risposta a condizioni di stress e la nuova sintesi di proteine può rappresentare un evento chiave per l'acquisizione da parte della cellula di una maggiore e prolungata resistenza al danno epatico, caratteristica del preconditionamento ritardato (Bolli et al., 2000; Carini et al., 2003 a).

Il fattore indotto da ipossia-1 (HIF-1) ha un ruolo centrale nella trascrizione di numerosi geni che mediano la risposta tissutale e cellulare all'ischemia. Dalla sua scoperta, avvenuta nel 1992 (Semenza et al., 1992), sono stati individuati più di 70 geni sottoposti al suo controllo (Semenza et al., 2007).

HIF-1 è un fattore di trascrizione presente in vari organi e tessuti come cervello, cuore, reni, polmoni e muscoli, promuove la trascrizione di geni coinvolti nel controllo del metabolismo energetico regolando l'espressione di numerosi

trasportatori del glucosio, compreso GLUT-1, ed enzimi glicolitici che incrementano la produzione anaerobia di ATP, regola la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione cellulare, controlla sia l'eritropoiesi attraverso la trascrizione dell'eritropoietina sia l'angiogenesi tramite l'espressione di suoi due fattori chiave: VEGF-alfa e angiopoietina-2 (Ang-2). Ad HIF-1 viene riconosciuto un ruolo chiave sia nei processi fisiologici sia in quelli pato-fisiologici, poiché riveste anche il ruolo di pro-oncogene capace di rimodellare la matrice extra-cellulare e di indurre la digestione delle membrane basali favorendo la sopravvivenza e la progressione tumorale. (Semenza et al. 2007; Pouyssegur et al., 2006;).

Attivo solo come eterodimero, HIF-1 è un fattore di trascrizione composto da una subunità alfa e da una subunità beta che dimerizzano solo nel nucleo.

Il gene umano della subunità HIF alfa è localizzato sul Cromosoma 14q (14q21-24) e consta di 826 aminoacidi, mentre HIF beta è localizzato sul Cromosoma 1 (1q21) ed è costituito da 789 aminoacidi.

Per quanto riguarda la struttura delle due subunità, entrambe presentano nella porzione amino-terminale il dominio basico elica-giro-elica (bHLH), fondamentale sia per il legame al DNA sia per la dimerizzazione, quest'ultima regolata anche dal dominio PAS (Per-ARNT-Sim), sigla ricavata dalle iniziali delle prime tre proteine in cui è stato ritrovato: *Drosophila* Period (Per), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT, successivamente paragonato in tutto e per tutto alla struttura completa della subunità beta, e la *Drosophila* single-minded (Sim) (Wang et al., 1995 a; Jiang et al., 1996; Chapman-Smith et al., 2004; Yang et al., 2005).

Tutte e due le subunità sono dotate di una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) e di domini di transattivazione TAD, uno nella porzione C-terminale della subunità beta e due in quella alfa, un TAD-N (residui 531-575) che si sovrappone parzialmente con il dominio ODDD ed un TAD-C (residui 786-826).

La subunità beta differisce dalla alfa sia perché costitutivamente presente nel nucleo sia perché capace di legarsi con altre subunità diverse dalla alfa purché contenenti i domini bHLH e PAS.

La subunità alfa è specifica per la subunità beta ed essendo la sua traslocazione nel nucleo ossigeno-dipendente è fondamentale per regolare l'intera attività di HIF-1.

Normalmente presente nel citosol, è continuamente trascritta dal fattore di trascrizione SP-1. In condizioni di normossia ha un'emivita molto breve, di circa 5 minuti, durante i quali viene ubiquitinata e degradata nel proteasoma. Quando però la quantità di ossigeno scende sotto il 5% (40mmHg), questa subunità va incontro ad una stabilizzazione che le permette di traslocare nel nucleo, di legarsi alla beta e di dare così trascrizione genica (Wang et al., 1995 b).

In normossia, HIF alfa è soggetta all'azione della prolin-idrossilasi-2 (PHD-2) nel dominio ODDD (oxygen-dependent degradation domain) posto tra i residui 401-603 e lungo 200 Aa. (Huang et al., 1998). La PHD-2 è un enzima capace di idrossilare i due residui di Prolina 402 e 564 contenuti nel dominio ODDD servendosi come substrato dell'ossigeno e dell' α -chetoglutarato, nonché del ferro a livello del suo sito catalitico (Schofield et al., 2004). A seguito di questa duplice idrossilazione, HIF alfa viene riconosciuta e legata dal prodotto del gene tumor suppressor Von Hippel Lindau-protein (pVHL), che permette la formazione di E3 a cui si legano E2 ed E1 formando il complesso di ubiquitinazione fondamentale per la degradazione da parte della subunità 26S del proteasoma (Dery et al., 2005).

Un secondo sistema capace di impedire la trascrizione di HIF-1 è il fattore inibitore di HIF-1 (FIH), che idrossila il residuo di asparagina 803 presente nel dominio TAD nell'estremità C-terminale della subunità alfa, non rendendola più capace di legare i co-attivatori trascrizionali p300/CBP (CREB binding protein) e Ref-1.

In ipossia, la mancanza di ossigeno inibisce l'attività di PHD-2, rendendo così la subunità alfa capace di raggiungere il nucleo servendosi del segnale di localizzazione nucleare, di legare la subunità beta ed insieme di regolare i loro geni target che sono sempre preceduti dalla sequenza conservata HRE (hypoxia responsive elements), una breve sequenza pentanucleotidica 5'-RCGTG-3' (dove R sta per A per G).

Sebbene l'ipossia sia considerata come lo stimolo primario per l'attivazione di HIF-1, evidenze crescenti dimostrano che questo fattore di trascrizione può essere stabilizzato anche in condizioni di normossia. Numerosi stimoli non ipossici quali fattori di crescita (Feldser et al., 1999; Richard et al., 2000), ormoni vascolari (Richard et al., 2000; Gorlach et al., 2001), proteine virali (Moon et al., 2004; Wakisaka et al., 2004) e mediatori infiammatori, come ossido nitrico e citochine (Hellwig-Burgel et al., 1999) hanno mostrato infatti di indurre l'attivazione di HIF-1.

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato che la stimolazione dei recettori A_{2A} dell'adenosina in macrofagi murini induce un'attivazione normossica di HIF-1 attraverso una via di segnalamento che coinvolge le proteine PKC e PI3K (De Ponti et al., 2007).

Le Anidrasi Carboniche.

Uno dei principali geni bersaglio di HIF-1 è rappresentato dall'Anidrasi Carbonica IX, enzima appartenente alla famiglia delle carbonato deidratasi o anidrasi carboniche.

Nei tessuti sani la famiglia delle Anidrasi Carboniche è fondamentale per numerosi processi fisiologici che coinvolgono lo scambio ionico e la regolazione del pH, mentre nei tessuti maligni le isoforme IX e XII in particolare sono riconosciute come marker tumorali perché regolatrici dell'acidosi dell'ambiente extracellulare tumorale.

Tali enzimi sono stati identificati per la prima volta nel 1933 nei globuli rossi di bovino. Ad oggi sono note 15 isoforme di Anidrasi Carboniche suddivise in tre classi distinte (anidrasi carbonica alfa, beta e gamma), tutte metalloenzimi che necessitano di uno ione Zinco nel sito catalitico per poter catalizzare l'idratazione reversibile di anidride carbonica per formare acido carbonico (Breton, 2001), secondo la reazione qui sotto riportata, di cui la prima parte è ad opera dell'enzima mentre la seconda avviene istantaneamente:



Le 15 isoforme differiscono fra di loro per proprietà molecolari, localizzazione cellulare, distribuzione tissutale e proprietà cinetiche, e proprio a seconda della loro collocazione si possono così catalogare: cinque isoforme sono citosoliche (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), quattro sono transmembrana (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), due sono mitocondriali (CA VA, CA VB) e soltanto un'isoforma è secreta nella saliva e nel latte (CA VI) (Scheibe et al., 2006). Poiché le Anidrasi Carboniche producono ed usano protoni e ioni bicarbonato svolgono un ruolo chiave nella regolazione del pH, nell'equilibrio dei fluidi corporei e nell'acidificazione dell'ambiente extracellulare (Hilvo et al., 2004). Tali enzimi sono anche coinvolti in altri processi fisiologici, quali l'acidificazione dei tubuli renali, il riassorbimento osseo, la respirazione, la gluconeogenesi, la formazione di acido gastrico nello stomaco e del succo pancreatico alcalino (Breton, 2001)

In condizioni ipossiche, l'Anidrasi Carbonica IX è uno dei geni più diffusamente e uniformemente regolati da HIF-1.

L'Anidrasi Carbonica IX è composta da quattro domini: un dominio proteoglicanico N-terminale, un dominio catalitico, una regione transmembrana e una corta coda citoplasmatica (Hilvo et al., 2004). E' una delle 4 isoforme che si presenta come proteina integrale di membrana che espone nell'ambiente extracellulare il suo sito catalitico; raramente presente nei tessuti sani, in condizioni normali è rilevata nel tratto gastrointestinale (stomaco, fegato, intestino e pancreas) (Breton, 2001) dove assume il ruolo di facilitare il trasporto di H⁺/CO₂⁻ accoppiato alla secrezione gastrica (Pastorekova, 1997), è invece ritrovata in quantità massiccia nei tumori. Aumenta i suoi livelli di espressione in maniera dipendente

alla densità cellulare ed alla condizione ipossica attraverso una trascrizione diretta di HIF-1 del promotore di C.A.9, gene di 10,9 Kb costituito da 11 esoni (Kaluz et al., 1999) e la sua presenza nei tumori è indice di prognosi nefasta.

Le osservazioni relative al fatto che l'espressione dell'Anidrasi Carbonica IX è fortemente indotta sia in condizioni ipossiche in cellule in coltura che nelle regioni ipossiche dei tumori umani (Kaluz et al., 2002), suggeriscono il potenziale ruolo dell'enzima nell'adattamento delle cellule a bassi livelli di ossigeno.

SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo di questo lavoro sarà lo studio dei meccanismi intracellulari del preconditionamento epatico ritardato. A tale fine il progetto affronterà le seguenti tematiche:

1. Sviluppo di un modello cellulare di preconditionamento epatico ritardato impiegando epatociti primari isolati da fegato di ratto.
2. Analisi dell'effetto citoprotettivo del trattamento preconditionante valutando la prevenzione del danno cellulare indotto da ischemia simulata e delle alterazioni intracellulari ad essa associate (perturbazioni dell'omeostasi del sodio e del pH intracellulare).
3. Valutazione dell'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 negli epatociti preconditionati con determinazione della capacità di legame al DNA, dell'espressione della proteina e dell'attività transattivante.
4. Studio dei mediatori molecolari coinvolti nell'attivazione di HIF-1 e nell'effetto citoprotettivo del preconditionamento ritardato.
5. Esame del ruolo del gene target di HIF-1, Anidrasi Carbonica IX, nella citoprotezione indotta da preconditionamento ritardato ed analisi dei meccanismi intracellulari coinvolti con particolare riferimento alla prevenzione delle alterazioni del pH e del sodio intracellulare.

MATERIALI E METODI

Reagenti.

Le sostanze chimiche utilizzate sono state ottenute dalle seguenti ditte: CGS21680, acetazolamide, di sodio 4-acetamido-4'-isotiocianato-stilben-2,2'-disulfonato (SITS), gentamicina, penicillina, streptomina, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), VUF5574, PD 98059, H89, cheleritina, wortmannina e desferrioxamina, collagenasi IV, Hepes, Trizma Base, KCl, MgCl₂, DDT, PMSF, Na₃VO₄, Protease Inibitor NH Cocktail, acrilammide dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia); il Percoll è stato acquistato dalla GE Healthcare (Uppsala, Svizzera); ZM241385 dalla Tocris's Cookson Ltd. (Bristol, UK).

Isolamento e Trattamento degli epatociti.

Le cellule epatiche sono state isolate da fegato di ratti maschi di ceppo Wistar con peso corporeo di 250–300 g (Harlan Italy S. Pietro al Natissone (UD), Italia), utilizzando la tecnica della perfusione "in situ" con collagenasi. L'uso e cura degli animali sono stati approvati dal Ministro Italiano della Salute e dalla Commissione Universitaria per la Cura degli Animali rispettando le direttive del Consiglio Nazionale della Ricerca Italiano

I ratti sono stati anestetizzati iniettando intraperitonealmente una soluzione di pentotal sodico (50 mg/Kg di peso corporeo) alla quale è stata aggiunta eparina (37 mg/Kg di peso corporeo). Agli animali è stata aperta la cavità addominale ed è stata incanalata la vena porta. Il fegato è stato perfuso per 10 minuti con il tampone salino T₁ (NaCl 143mM, KCl 7mM ed Hepes 10mM a pH7,4) mantenuto a 37°C, con un flusso costante di 7.5 unità di pressione, grazie all'utilizzazione di una pompa peristaltica LKB Bromma 2115.

Dopo questa prima fase di lavaggio del fegato, l'organo è stato perfuso con 200 ml di tampone salino T₂ (NaCl 100 mM, KCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, la collagenasi di tipo 1 0.05%, tampone Hepes-NaOH 50 mM, pH 7.4), anch'esso mantenuto a 37°C ed iniettato ad un flusso costante di 4 unità di pressione.

Il fegato così digerito, è stato rimosso dall'animale e risospeso in 50ml di terreno DMEM5671 (Sigma) e gli epatociti sono stati purificati attraverso tre centrifugate da 5 minuti l'una a 500 rpm, seguite da un'ultima centrifugata di 3 minuti a 1050 rpm su gradiente di Percoll.

Dopo questo procedimento è stato effettuato il conteggio delle cellule utilizzando una camera Burker (il numero di epatociti solitamente ottenuto è di circa 300–400 milioni per fegato perfuso).ed è stata valutata la vitalità cellulare attraverso la conta al microscopio degli epatociti sfruttando il test di esclusione del Blu Tripiano.

Dopo il conteggio, la sospensione cellulare viene portata ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml, per poi essere piastrata su piastre per adesione cellulare precedentemente trattate con collagene e lasciata in incubatore per 48ore in DMEM-HAM F12 al 10% di siero fetale bovino, all'1% di penicillina/streptomina e all'1% di glutammina.

Gli epatociti sono stati preconditionati nel terreno Krebs-Henseleit-Hepes (NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.3 mM, NaHCO₃ 25 mM, Hepes 20 mM, a pH 7.4 con NaOH 1 N) (KHH) con 10 minuti di ipossia (95% N₂ - 5% CO₂) seguiti da 10 minuti di riossigenazione (95% aria - 5% CO₂) o mediante trattamento per 15 minuti con CGS21680 (CGS, 5 μM). Al termine del trattamento preconditionante, le cellule sono state incubate in nuovo terreno DMEM-HAM F12 e riposte in incubatore per altre 1-24ore.

Lo sviluppo del preconditionamento ritardato è stato valutato 24 ore dopo la stimolazione cellulare mediante determinazione della tolleranza degli epatociti alla morte indotta da 90 minuti di ischemia simulata riprodotta con l'incubazione delle cellule nel buffer salino KHH privo di siero ad una concentrazione finale di 10^6 cellule/mL in atmosfera ipossica. Le cellule di controllo sono state mantenute in normossia in terreno DMEM-HAM F12.

Gli inibitori chimici ZM241385 (1 μ M), wortmannina (250 nM), o chelirtrina (50 μ M) sono stati aggiunti 15 minuti prima del preconditionamento e rimossi dopo 2 ore. Acetazolamide (100 μ M) e disodio 4-acetamido-4'-isotiocianato-stilben-2,2'-disulfonato (SITS) (50 μ M) sono stati aggiunti 15 minuti prima dell'incubazione in atmosfera ipossica.

La linea cellulare HTC di epatoma di ratto è stata ottenuta dalla Collezione Europea di Colture Cellulari e coltivata in terreno DMEM-HAM F12 contenente 10% di siero fetale bovino, 1% di penicillina/streptomicina e 1% di glutammina. La procedura preconditionante e i trattamenti sono stati gli stessi di quelli usati per gli epatociti primari.

Preparazione delle frazioni nucleari.

A diversi tempi dai trattamenti, le cellule vengono raccolte in falcon, centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm a 4°C, risospese in PBS e ricentrifugate, al fine di lavarle dal terreno residuo.

Le cellule vengono risospese in una soluzione (Buffer A) contenente 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.4 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ e 1:50 cocktail inibitori proteasi, trasferite in eppendorf e poi incubate per 10 minuti in ghiaccio. Vengono centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm a 4°C e il lisato ottenuto viene risospeso ed omogenato con il Dounce in una sospensione di Buffer A. L'omogenato viene poi trasferito in eppendorf per essere centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm. Il sovrantante (frazione citosolica) viene prelevato ed aliquotato, mentre il fondello nucleare viene risospeso nella soluzione (Buffer C) contenente 20 mM Tris pH 7.6, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20% Glicerolo, 2 mM DTT, 0.4 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ e 1:50 cocktail inibitori proteasi, mantenuto in agitazione per 30 minuti in ghiaccio, e poi centrifugato per 30 minuti a 13500 rpm al fine di ottenere l'estrazione dei fattori nucleari.

Il sovrantante (estratto nucleare) viene recuperato, aliquotato ed utilizzato per EMSA e western blot.

Analisi della Mobilità Elettroforetica di complessi DNA-proteine nucleari (EMSA).

Gli estratti nucleari dosati ed aliquotati sono stati incubati con oligonucleotidi marcati con γ -³²P-ATP (Primm, Milano, Italia). Gli oligonucleotidi marcati contengono la sequenza di legame al DNA di HIF-1 (5'-ACGGTACGTGCCTCAGGA-3') e quella per il legame del fattore di trascrizione octamer-protein1, fattore costitutivamente presente negli estratti nucleari (oct-1; 5'-TGCGAATGCAAATCACTAGAA-3'). Al termine dell'incubazione i campioni vengono sottoposti a corsa elettroforetica in condizioni non denaturanti, seguita da trasferimento su lastra poi autoradiografata.

Per stabilire invece la specificità di legame che si instaura tra il fattore nucleare e l'oligonucleotide sono necessari degli esperimenti di competizione. Per questo motivo è stato aggiunto un eccesso di oligonucleotidi aspecifici non marcati. La specificità del saggio è stata dimostrata dalla scomparsa dei segnali in seguito all'aggiunta di un eccesso di 50 volte di oligonucleotidi specifici non marcati. La determinazione quantitativa è stata effettuata mediante conta nucleare diretta usando un InstantImager (Packard Instruments, Milano, Italia) e i valori sono stati normalizzati all'attività di oct-1.

Saggio di Trasfezione transiente.

Le cellule HTC giunte a semiconfluenza sono state trasfettate transientemente in multiwell da 24 pozzetti utilizzando il kit di trasfezione TransIT- (Mirus, Tema Ricerca, Italia), che prevede la preparazione di una mix contenente in rapporto 5:1 il vettore pGL3PGK6TKp (100ng) in cui sono state inserite 6 sequenze HRE ripetute (gentile dono di P.J.Ratcliffe, Wellcome Trust Center for Human Genetics, Oxford, UK) e il vettore reporter pRL-TK contenente il gene codificante la proteina renilla-luciferasi, che viene utilizzato come controllo dell'avvenuta trasfezione. Passate 5 ore dal momento della trasfezione, il terreno viene rimosso e sostituito da terreno fresco successivamente addizionato di CGS21680 (5 μ M).

Parte delle cellule sono state poi cotrasfettate con 1 μ g del vettore di espressione pcDNA3ARNTdelta_b (Δ ARNT) codificante la forma mutata dominante negativa della subunità ARNT (ottenuta da M.Schwarz, dell'Università di Tübingen, Germania). Dopo 24 ore, le cellule vengono risospese per valutare l'attività della luciferasi sfruttando il kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Milano, Italia). I vettori vuoti di controllo che contengono il gene della renilla luciferasi, ma sono privi delle sequenze HRE, hanno mostrato un'attività pressochè nulla dell'enzima. Tutti gli esperimenti di trasfezione sono stati svolti su piastre in duplicato e ripetuti almeno tre volte.

Misurazione dell'espressione di HIF-1.

Per misurare l'attivazione di HIF-1 è stata valutata la quantità di HIF- α in estratti nucleari di epatociti e cellule HTC. Uguali quantità di proteina sono state sottoposte a corsa elettroforetica su gel di SDS-poliacrilamide all'8,5% seguita da trasferimento su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate, dopo saturazione con proteine del latte, con l'anticorpo monoclonale anti-human HIF-1 α (H1- α 67, diluito 1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO). L'anticorpo anti-TFIID (santa Cruz Biotechnology, santa Cruz, CA) è stato utilizzato per confermare uguali carichi. L'avvenuto legame tra anticorpo e proteina è stato analizzato utilizzando il kit di immunorilevamento (ECL Plus; Amersham) e quantificato con videodensitometria.

Misurazione dell'espressione di Anidrasi Carbonica IX.

Aliquote proteiche di 30 μ g di lisati cellulari totali sono state sottoposte a corsa elettroforetica in gel al 10% di SDS-poliacrilamide e trasferite su membrane di nitrocellulosa. L'A.C.IX è stata rivelata tramite legame dell'anticorpo policlonale anti-C.A.IX (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). L'anticorpo monoclonale anti-actina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato utilizzato per assicurare l'uguale quantità di caricamento. L'avvenuto legame tra anticorpo e proteina è stato rilevato utilizzando il kit di immunorilevamento (ECL Plus; Amersham). L'intensità emessa dalla banda dell'A.C.IX e quella dell'actina è stata misurata tramite videodensitometria ed i risultati sono stati espressi come rapporti.

Determinazione della vitalità cellulare.

La vitalità cellulare è stata stimata attraverso la conta al microscopio impiegando il test di esclusione al Trypan blue su aliquote di sospensioni cellulari di 50 μ l unite a 50 μ l di Trypan blue (0,4%), ed è stata confermata dalla lettura al FACScan di aliquote di 500 μ l di sospensione cellulare incubate per 5 minuti con propidio ioduro alla concentrazione di 1 mg/ml.

Misurazione del pH citosolico.

Il pH citosolico è stato misurato utilizzando l'indicatore fluorescente 2',7'-bis(carbossietil)-5,6-carbossifluoresceina-acetossimetil estere (BCECF-AM) (Molecular Probes, Eugene OR, USA). In breve, gli epatociti (1×10^6 cellule/mL) sono stati incubati con BCECF-AM (5 μ g/mL) per 30 minuti a 25°C in un buffer Krebs (KHH) modificato contenente albumina sierica bovina al 2% e glucosio (10 mM). Dopo lavaggio, le cellule sono state staccate e risospese in KHH fresco ed incubate sotto diverse condizioni sperimentali. Ai tempi indicati, aliquote di 2 ml sono state prelevate e centrifugate per 1 min a 1000 rpm. I pellet cellulari sono stati risospesi in KHH fresco e la fluorescenza è stata determinata ad una lunghezza d'onda di 450/500 nm usando uno spettrofluorimetro Hitachi 4500. La curva di calibrazione è stata ottenuta per ogni esperimento incubando la sospensione di epatociti in terreni a diverso pH, in presenza di K⁺ (120mM) e dello ionoforo K⁺/H⁺ nigericina (10 μ M).

Misurazione del contenuto di Na⁺ intracellulare.

La quantità di Na⁺ intracellulare è stata misurata usando l'indicatore fluorescente benzofurano isoftalato acetossimetil estere (SBFI-AM) (Molecular Probes, Eugene OR, USA). In breve, gli epatociti sono stati trattati con SBFI-AM (10 μ M) per 60 minuti a 25° C in buffer KHH arricchito con albumina bovina sierica al 2% e glucosio (10 mM). Dopo lavaggio, le cellule sono state risospese in KHH fresco e incubate sotto diverse condizioni sperimentali. Ai tempi indicati, aliquote di 2 ml sono state prelevate e centrifugate per 1 minuto a 1000 rpm per rimuovere il mezzo di incubazione. I pellet cellulari sono stati risospesi in KHH fresco e la fluorescenza è stata misurata alla spettrofluorimetro Hitachi 4500 settato a 345/385 nm di eccitazione e 510 nm di emissione. Il rapporto fra i valori delle fluorescenze a 345 e 385 nm è stato calcolato dopo la correzione della fluorescenza spontanea dell'SBFI-AM. La calibrazione della fluorescenza dell'SBFI-AM è stata effettuata tramite l' incubazione degli epatociti in buffer con concentrazioni conosciute di Na⁺ e l'aggiunta dello ionoforo del sodio gramicidina D (2 μ M).

Analisi dei dati e calcoli statistici.

I dati sono stati espressi come medie \pm D.S. Le analisi statistiche sono state eseguite con il software statistico InStat-3 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, USA) usando il test ANOVA con la correzione di Bonferroni per confronti multipli quando sono stati analizzati più di due gruppi. La distribuzione della normalità di tutti i gruppi è stata preliminarmente verificata usando il test di Kolmogorov e Smirnov. La significatività è stata posta al 5%.

RISULTATI

Il preconditionamento ritardato degli epatociti protegge dalle alterazioni del pH e del Na⁺ intracellulare e dal danno indotto da ischemia simulata.

Il preconditionamento ritardato è stato prodotto esponendo colture di epatociti primari isolati da fegato di ratto ad un breve stress ipossico (10 minuti) oppure a 15 minuti di trattamento con l'agonista dei recettori A_{2A} dell'adenosina (A_{2AR}) CGS21680 (5μM), 24 ore prima dell'esposizione delle cellule ad ischemia simulata (ipossia in assenza di siero).

Il preconditionamento ritardato indotto da un breve stress ipossico (10 minuti) incrementa significativamente la tolleranza degli epatociti al danno cellulare causato da 90 minuti d'incubazione in condizioni ipossiche (Fig. 1 A).

Tale fenomeno è evidente anche a seguito dei 15 minuti di incubazione con CGS21680 (5μM) (Fig. 1 A) e viene significativamente annullato con l'uso dello specifico antagonista dei recettori A_{2A} ZM241385 (1μM) (Fig. 1 A).

Poiché la via di trasduzione mediata dal legame dell'adenosina ai recettori A_{2A} nel preconditionamento precoce coinvolge l'attivazione della proteina fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) e della proteina chinasi C (PKC), abbiamo indagato la possibilità che tali mediatori fossero coinvolti anche nel preconditionamento ritardato. Il trattamento degli epatociti con wortmannina (250 nM) e cheleritina (50 μM), inibitori rispettivamente di PI3K e PKC aggiunti 15 minuti prima dell'applicazione della procedura preconditionante, reverte gli effetti protettivi del preconditionamento ritardato contro il danno ipossico (Fig.1 B).

Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente dimostrato che l'acidosi intracellulare seguita dall'aumento del Na⁺ citosolico precipitano la morte cellulare in epatociti esposti ad ipossia.

In questa fase dello studio abbiamo dunque valutato se la citoprotezione indotta dal preconditionamento ritardato fosse associata ad effetti protettivi su tali alterazioni.

Come illustrato nella Figura 2, il preconditionamento ritardato degli epatociti tramite il breve stress ipossico (PC) o il trattamento con CGS21680, previene l'acidosi intracellulare e l'accumulo di Na⁺ citosolico.

Questo effetto protettivo viene annullato dal trattamento degli epatociti con gli inibitori wortmannina e cheleritina (Fig.2), confermando il coinvolgimento dei mediatori PI3K e PKC anche nella prevenzione delle alterazioni ioniche che si associano al danno cellulare in condizioni d'ipossia.

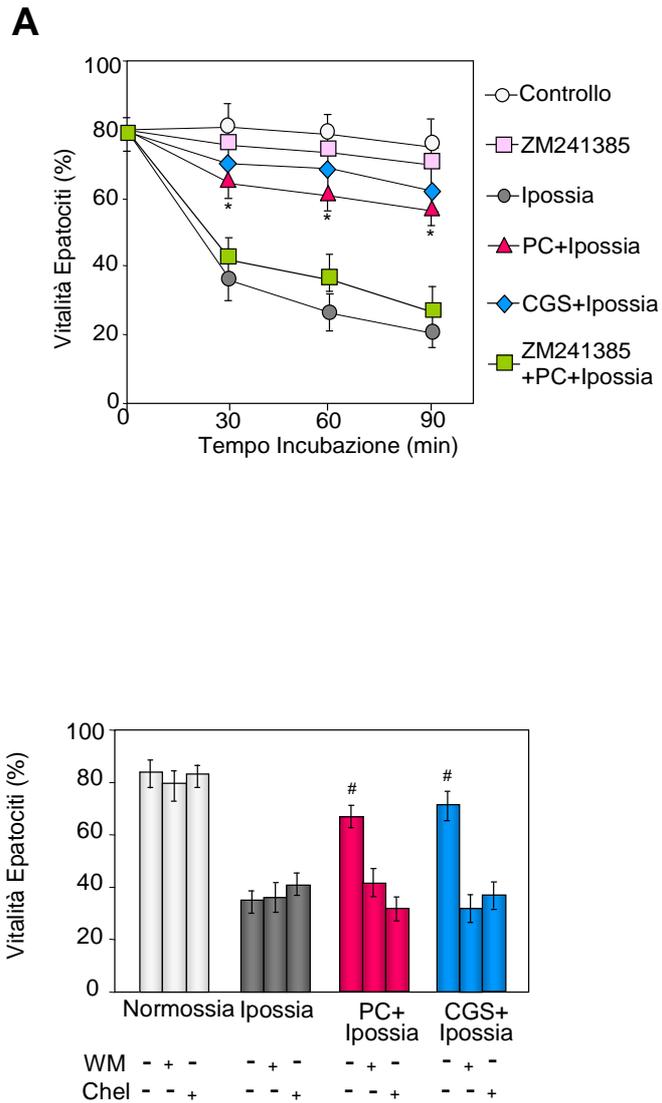


Figura 1.

*Il preconditionamento ritardato protegge gli epatociti dalla morte indotta da ischemia simulata: ruolo dei recettori A_{2A} dell'adenosina (A_{2A}R), di PI3K e PKC. Il preconditionamento ritardato è stato indotto esponendo colture di epatociti di ratto ad un breve (10 minuti) stress ipossico (PC) o a 15 minuti d'incubazione con l'agonista degli A_{2A}R CGS21680 (CGS, 5 μ M). Gli epatociti preconditionati e non preconditionati sono stati successivamente coltivati in normossia per 24 ore prima dell'esposizione all'ischemia simulata (ipossia in terreno senza siero). Gli inibitori ZM241385 (1 μ M), wortmannina (WM, 250 nM), o cheleritrina (Chel, 50 μ M) sono stati aggiunti al terreno di coltura 15 minuti prima della procedura preconditionante e rimossi 2 ore dopo. I risultati sono la media di almeno 5 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p <0.001 vs ipossia o ZM241385+PC+ipossia; # p <0.001 vs PC+ipossia+WM, o PC+ipossia+Chel.*

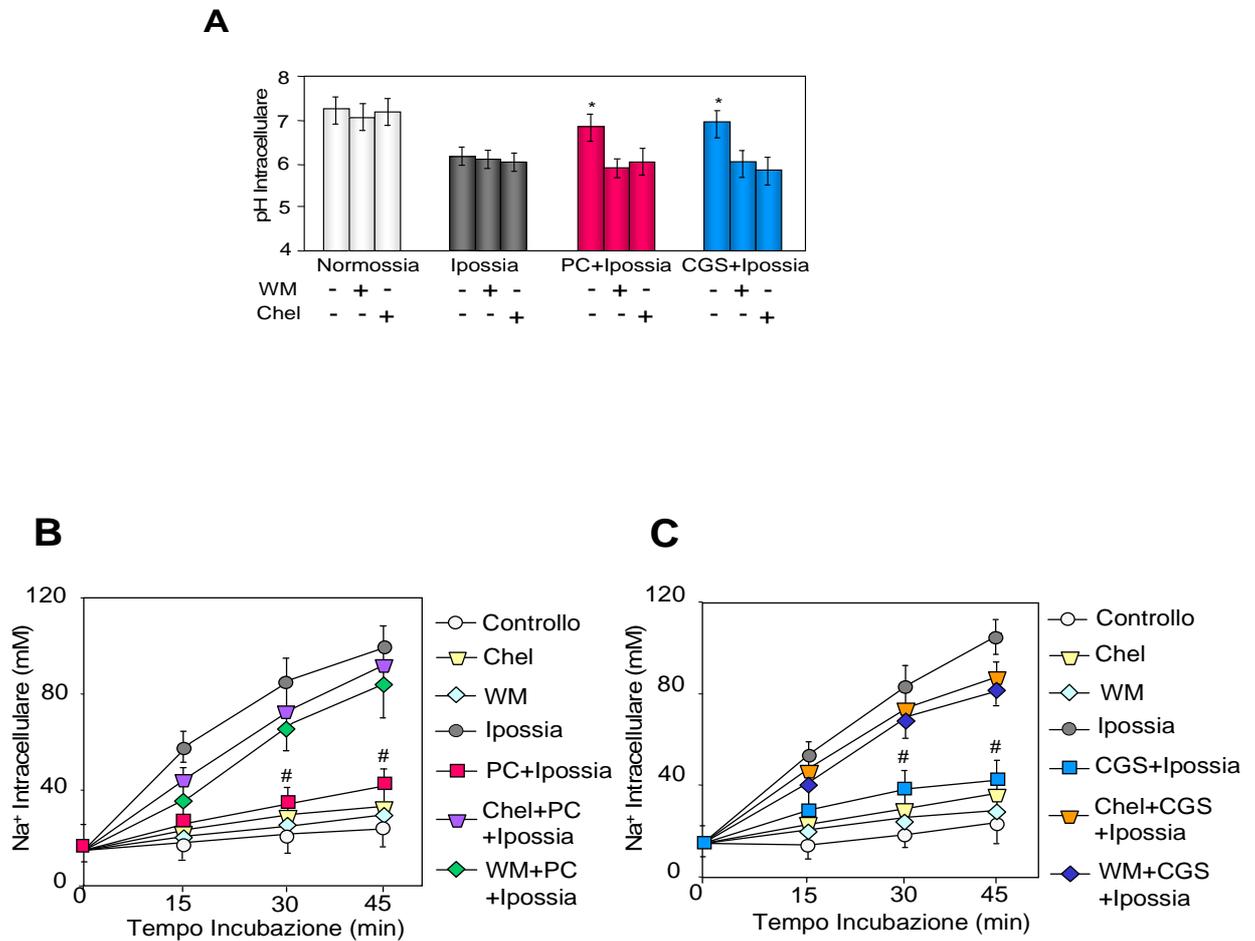


Figura 2.

Il preconditionamento ritardato previene l'acidosi intracellulare e l'accumulo di Na⁺ negli epatociti sottoposti a ischemia simulata. Il preconditionamento ritardato è stato indotto mediante uno stress ipossico (PC) o 15 minuti d'incubazione con CGS21680 (5 μM). Gli epatociti preconditionati e non preconditionati sono stati successivamente coltivati in normossia 24 ore prima dell'esposizione all'ischemia simulata. Wortmannina (WM, 250 nM) o chelitrina (Chel, 50 μM) sono state aggiunte al terreno di coltura 15 minuti prima del preconditionamento e rimossi 2 ore dopo.

Pannello A: il pH intracellulare è stato misurato dopo 30 minuti d'incubazione delle cellule in condizioni ipossiche o normossiche. Pannello B: le variazioni della concentrazione del Na⁺ intracellulare sono state misurate dopo l'induzione del preconditionamento ritardato mediante stress ipossico o trattamento con CGS21680, Pannello C. I risultati sono la media di almeno 4 esperimenti diversi ± D.S. Significatività statistica: *p<0.05 vs PC+ipossia+WM o PC+ipossia+Chel; #p<0.002 vs ipossia, PC+ipossia+WM o PC+ipossia+Chel.

La stimolazione del Recettore A_{2A} dell'adenosina attiva HIF-1 negli epatociti preconditionati.

Allo scopo di valutare se gli effetti citoprotettivi del preconditionamento ritardato coinvolgono l'attivazione del fattore di trascrizione inducibile da ipossia (HIF-1), in collaborazione con l'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Milano, abbiamo valutato, mediante la tecnica EMSA (Analisi della Mobilità Elettroforetica), la capacità dell'adenosina di stimolare la capacità dell'HIF-1 di legare sequenze specifiche di DNA.

Estratti nucleari di epatociti preconditionati con un breve stress ipossico (10 min.) presentano un aumento nel legame di HIF-1 al DNA dopo 2 ore (Fig. 3).

L'effetto del preconditionamento ritardato sull'attività di HIF è paragonabile a quello indotto da un periodo di ipossia continuo di 3 ore o dal trattamento con desferrioxamina (DFO, 100 μ M), un chelante del ferro noto attivatore di HIF-1 (Fig. 3).

L'incubazione delle cellule in condizioni ipossiche per 30 minuti non determina alcun evidente legame di HIF-1 al DNA, suggerendo che l'attivazione di HIF-1 negli epatociti preconditionati non è una conseguenza dell'esposizione all'ipossia transiente.

La stimolazione con CGS21680 (5 μ M) dei recettori A_{2A} dell'adenosina promuove il legame di HIF-1 al DNA, mimando gli effetti del preconditionamento ipossico (Fig.3).

L'attivazione di HIF-1 dovuta al preconditionamento ipossico è completamente annullata dal trattamento con l'antagonista degli A_{2AR} ZM241385 (1 μ M), confermando il fondamentale coinvolgimento dei recettori A_{2A} dell'adenosina nell'attivazione di HIF-1 (Fig. 3). È importante notare che ZM241385 non interferisce per nulla con le 3 ore di ipossia o di DFO capaci comunque di attivare HIF (risultati non mostrati).

L'esecuzione di immunoblotting su estratti nucleari di campioni di cellule sottoposti a preconditionamento ipossico o a trattamento con CGS21680 rivela un aumento del contenuto nucleare di HIF- α tempo-dipendente, in parallelo a quanto evidenziato per il legame di HIF-1 al DNA (Fig.4 A, B). Anche qui l'antagonista degli A_{2AR} ZM241385 previene la traslocazione nucleare di HIF-1 α (Fig.4 C), mentre il blocco dei recettori A₁ e A₃ con i rispettivi antagonisti DPCPX (100 μ M) e VUF5574 (100 μ M) non dà alcun effetto (Fig. 4 E).

Poiché le proteine PKA, PI3K e PKC sono coinvolte nella trasduzione del segnale mediata da A_{2AR} negli epatociti, abbiamo esplorato il loro ruolo nell'attivazione di HIF-1 mediante preconditionamento. L'inibizione della PKA con H89 (0.1 μ M), di PI3K con wortmannina (250 nM) o il blocco di PKC con chelitrina (50 μ M) abolisce la traslocazione nucleare di HIF-1 α indotta dal preconditionamento ipossico o dal trattamento con CGS21680 (Fig.4 C,D,E). Al contrario, l'inibizione di ERK1/2, che non è implicata nella via di segnalamento attivata dagli A_{2AR}, con PD98059, non dimostra alcun effetto (Fig.4 E).

La capacità dei recettori A_{2A} di mediare l'attivazione di HIF-1 in condizione non ipossica negli epatociti è stata confermata da esperimenti "in vivo" in ratto inoculato intraperitonealmente con CGS21680 (0.5 mg/Kg di massa corporea) 3 ore prima dell'isolamento degli epatociti. La Figura 4 F mostra che il contenuto nucleare di HIF-1 in epatociti isolati da fegato di ratto inoculato con CGS21680 aumenta di cinque volte rispetto ad epatociti isolati da fegato di ratto non trattati.

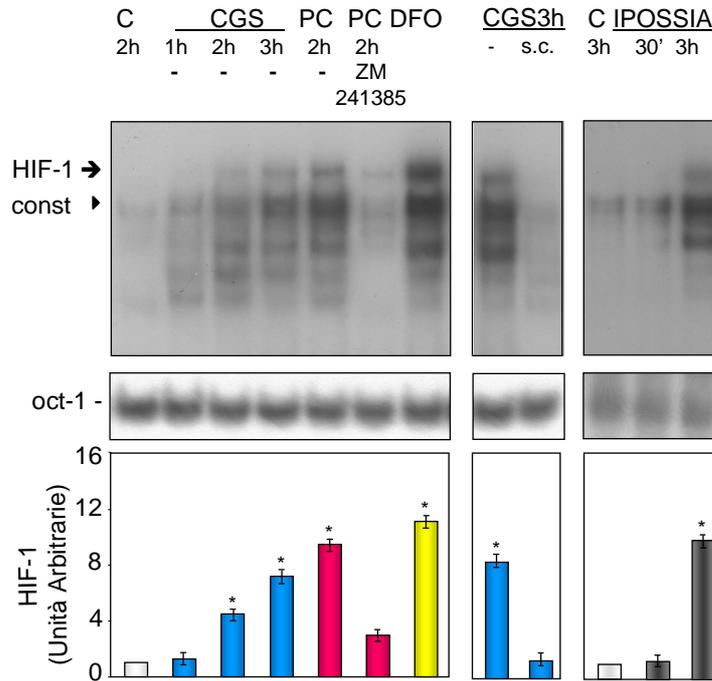


Figura 3.

Il preconditionamento ritardato promuove il legame di HIF-1 al DNA mediante la stimolazione dei recettori A_{2A} dell'adenosina. Analisi EMSA sull'attività di legame di HIF-1 al DNA effettuate su estratti nucleari ottenuti da epatociti non trattati (C), trattati con CGS21680 (CGS, 5 μ M), o preconditionati mediante 10 minuti di stress ipossico (PC). Come controllo positivo il legame di HIF-1 al DNA è stato indotto in epatociti incubati in condizioni ipossiche per 3 ore o con desferrioxamina (DFO, 100 μ M) per 20 ore. L'inibitore ZM241385 (1 μ M) è stato aggiunto al terreno di coltura cellulare 15 minuti prima del PC. La freccia indica il complesso inducibile HIF-1. Const. indica il complesso costitutivo. C.s. indica la competizione specifica del campione CGS 3h con oligonucleotidi specifici non marcati in eccesso di 50 volte. L'attività di legame del fattore di trascrizione costitutivamente espresso oct-1 è stata usata per valutare un uguale caricamento.

Le barre indicano la differenza in unità arbitrarie \pm D.S. in relazione al controllo non trattato. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. Significatività statistica: * $p < 0.001$ vs C, CGS1h, PC2h+ZM241385, CGS3h+ s.c..

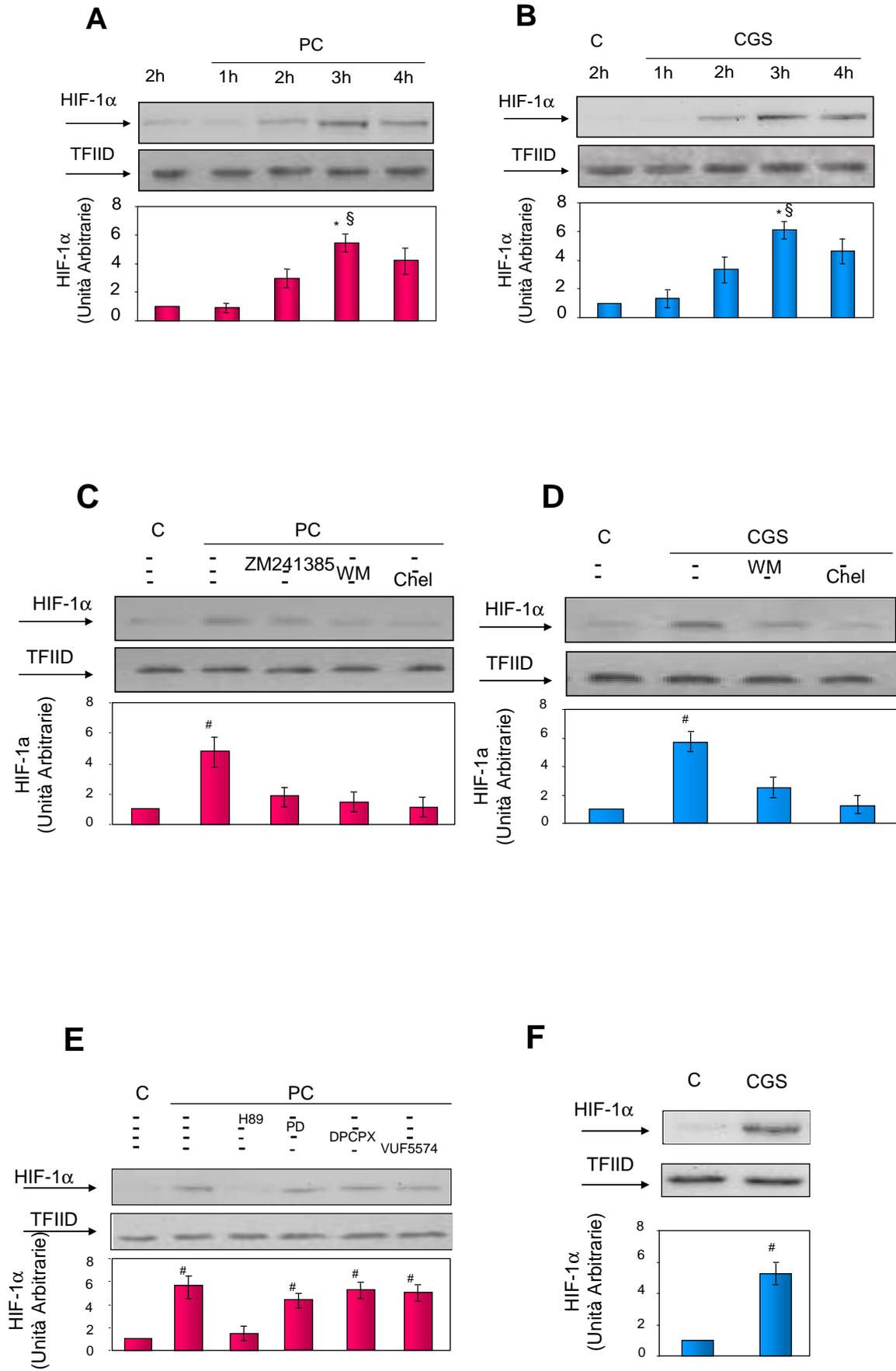


Figura 4.

Il preconditionamento ritardato incrementa la traslocazione nucleare di HIF- α Gli epatociti sono stati preconditionati mediante un breve stress ipossico (PC) o un trattamento con CGS21680 (CGS, 5 μ M). Sia le cellule preconditionate che le cellule non trattate di controllo (C) sono state poi coltivate in normossia per 1-4 ore.

Pannelli A e B: Time course dell'accumulo nucleare della proteina HIF-1 α in seguito ai diversi trattamenti preconditionanti. Pannelli C, D ed E: Effetto del blocco dei diversi recettori dell'adenosina o delle diverse proteine chinasi sulla localizzazione nucleare di HIF-1 α negli epatociti preconditionati. Gli inibitori ZM241385 (1 μ M), DPCPX (100 μ M), VUF5574 (100 μ M), wortmannina (WM, 250 nM), chelirtrina (Chel, 50 μ M), PD98059 (20 μ M) o H89 (0.1 μ M) sono stati aggiunti 15 minuti prima del preconditionamento degli epatociti. Le cellule preconditionate e le cellule di controllo (C) sono state poi coltivate in condizioni normossiche per 3 ore.

Pannello F: Effetto della somministrazione "in vivo" di CGS21680 sulla traslocazione nucleare di HIF-1 α in epatociti isolati mediante perfusione del fegato con collagenasi. I ratti hanno ricevuto CGS21680 per via intraperitoneale (0.5 mg/Kg) 3 ore prima della preparazione degli epatociti.

I livelli della proteina HIF-1 α sono stati valutati mediante analisi di immunoblotting degli estratti nucleari dagli epatociti primari. Il caricamento di quantità uguali di proteine è stato valutato mediante l'analisi della proteina TFDII. I valori sono stati espressi come unità arbitrarie dopo la normalizzazione a 1 dei campioni di controllo. I risultati sono la media di almeno 4 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p < 0.002 vs C, CGS1h o PC1h; § p <0.05 vs CGS2h o PC2h; # p <0.002 vs C, CGS+WM, CGS+Chel, PC+ZM241385, PC+WM o PC+Chel.

HIF-1 induce l'espressione dell'Anidrasi Carbonica IX in epatociti preconditionati.

L'anidrasi carbonica IX (A.C.IX) è un enzima transmembrana che catalizza la conversione dell'anidride carbonica e dell'acqua in acido carbonico ed è uno dei principali geni bersaglio di HIF-1.

L'espressione di A.C.IX in epatociti di ratto preconditionati è stata valutata mediante western blot utilizzando estratti cellulari prelevati alle 2,4,6,8,16 e 24 ore, dopo il preconditionamento ipossico o alle 4 ore dopo una breve incubazione con CGS21680 (5 μ M). Tali analisi di immunoblotting hanno mostrato che gli epatociti di controllo esprimono livelli trascurabili di A.C. IX, mentre a partire dalle 2 ore successive al preconditionamento ipossico e dalle 4 ore dopo incubazione con CGS21680, l'espressione di tale enzima subisce un incremento tempo-dipendente fino a 24 ore (Fig.5 A,B).

Per valutare il ruolo dei recettori A_{2A} dell'adenosina e dei mediatori PI3K e PKC nell'attivazione dell'A.C. IX in seguito a preconditionamento ipossico, abbiamo trattato gli epatociti, 15 minuti prima della procedura preconditionante, con gli inibitori ZM241385 (1 μ M), wortmannina (250 μ M) e chelirtrina (50 μ M). Analisi di Western blot hanno mostrato che tali sostanze inibiscono l'espressione della C.A.IX indotta dal preconditionamento (Fig. 5 C,D). Esperimenti paralleli condotti sulla linea cellulare di epatoma di ratto HTC hanno mostrato che la stimolazione con CGS21680 (5 μ M) induce l'accumulo nucleare di HIF-1 α e l'espressione di A.C. IX con una cinetica paragonabile a quella osservata negli epatociti primari preconditionati (Fig.6 A,B). Per ottenere maggiori informazioni sul ruolo che HIF-1 ha nell'induzione dell'A.C.IX nel preconditionamento epatico, le HTC sono state trasfettate con un vettore plasmidico contenente la sequenza del gene reporter dell'enzima renilla-luciferasi sotto il controllo della sequenza HRE multimerica, precedentemente riconosciuta come la sequenza specifica di legame al DNA di HIF-1. Come mostrato nella Figura 6 C, l'espressione del gene reporter subisce un incremento maggiore di 2,5 volte in risposta al trattamento con CGS21680

rispetto a quella osservata nelle HTC controllo trasfettate con un vettore plasmidico vuoto contenente solo il gene della renilla luciferasi.

Tale effetto è stato silenziato cotrasfettando le cellule HTC con un plasmide che esprime una forma dominante negativa della subunità- β di HIF-1 (HRE- Δ ARNT) (Fig. 6 C), capace di formare l'eterodimero nel nucleo ma non in grado di legare la sequenza HRE. Come mostrato nella figura 6 D, la cotrasfezione con la forma dominante negativa di HIF-1 β (HRE- Δ ARNT) abolisce l'espressione dell'anidrasi carbonica IX nelle cellule HTC trattate con CGS21680, confermando il coinvolgimento di HIF-1 nell'induzione della A.C. IX mediata dal preconditionamento.

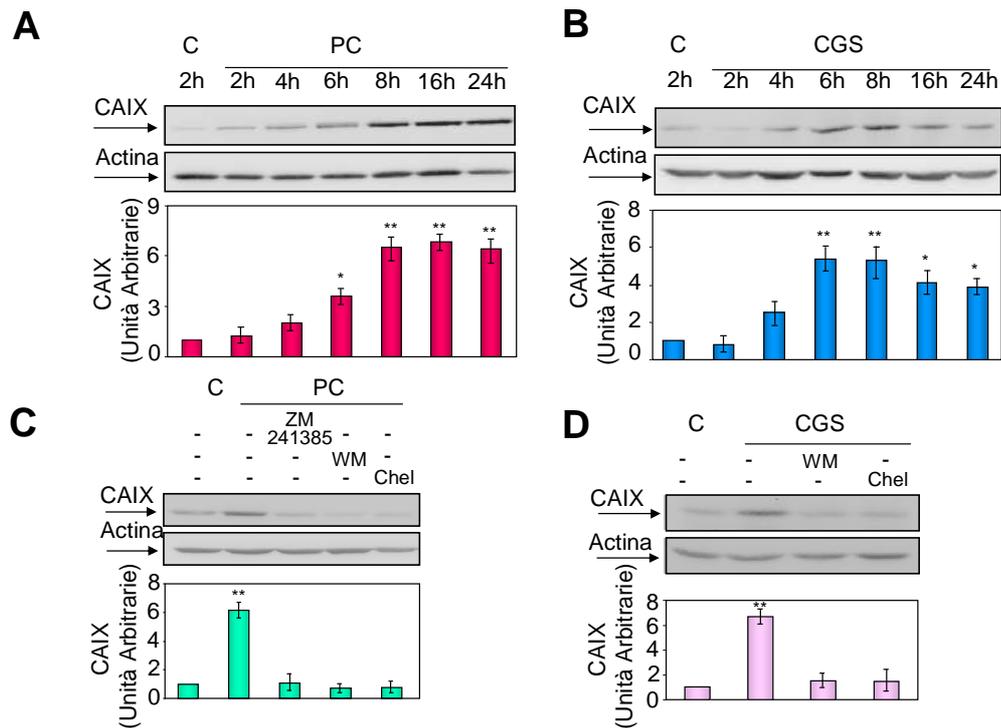


Figura 5.

*Il preconditionamento ritardato induce l'espressione di C.A.IX negli epatociti. Gli epatociti sono stati preconditionati mediante un breve stress ipossico (PC) (Pannelli A e C) o trattamento con CGS21680 (CGS, 5 μ M) (Pannelli B e D). Sia le cellule preconditionate che le cellule di controllo (C) sono state poi coltivate in condizioni normossiche per 8 ore (Pannelli C e D) o fino a 24 ore (Pannelli A e B). Gli inibitori ZM241385 (1 μ M), wortmannina (WM, 250 nM), chelitrina (Chel, 50 μ M) sono stati aggiunti 15 minuti prima del preconditionamento. L'espressione della C.A.IX è stata valutata mediante western blotting. L'intensità relativa delle bande corrispondenti alla C.A.IX e all'actina è stata misurata mediante videodensitometria e i risultati sono stati espressi come rapporti in seguito alla normalizzazione a 1 del controllo. I risultati sono le medie di almeno 4 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p < 0.05 vs C (pannello A), PC2h, PC4h; o vs CGS6h o CGS8h (pannello B); ** p < 0.001 vs C, PC2h, PC4h, PC6h (pannello A), o C, CGS2h, CGS4h (pannello B) o vs PC+ZM241385, PC+WM o PC+chel (pannello C); o vs C, CGS+WM o CGS+chel (pannello D).*

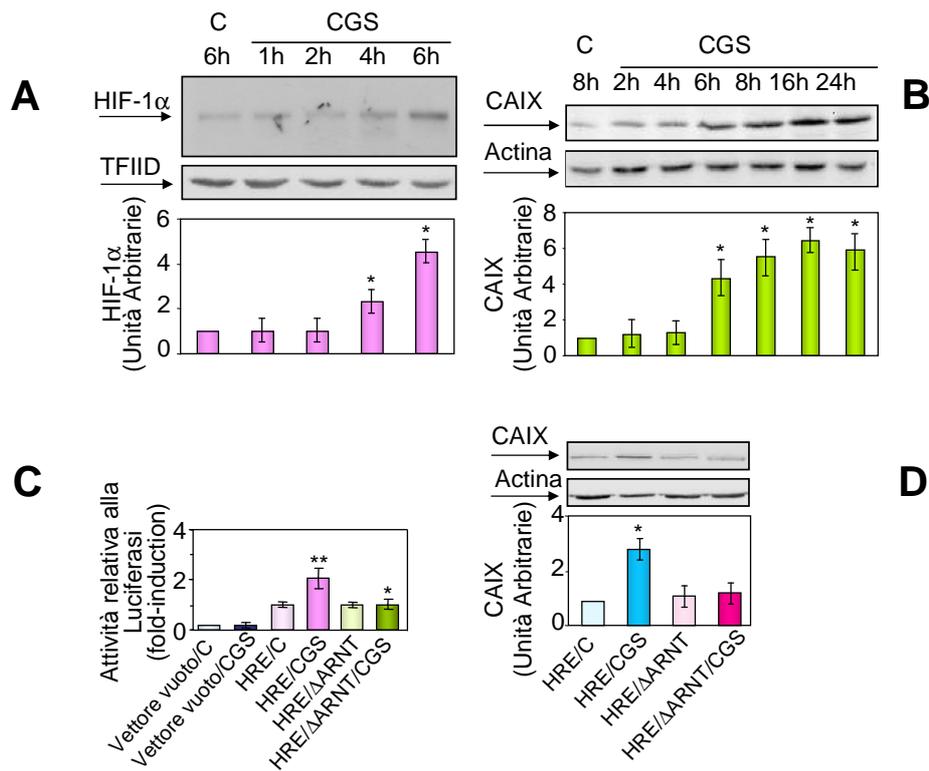


Figura 6.

Induzione di C.A.IX mediata da HIF-1 nella linea cellulare HTC. Pannello A: Immunoblotting del contenuto nucleare della proteina HIF-1 α nelle cellule HTC di controllo (C) o trattate con CGS21680 (CGS, 5 μ M). Il caricamento di quantità uguali di proteine è stato valutato mediante l'analisi della proteina TFIID. I valori sono stati espressi come unità arbitrarie dopo la normalizzazione a 1 del campione di controllo e sono la media di almeno 3 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p < 0.004 vs controlli. Pannello B: l'espressione di C.A.IX è stata valutata mediante immunoblotting in cellule HTC di controllo (C) o trattate con CGS21680 (5 μ M). L'intensità relativa delle bande corrispondenti alla C.A.IX e all'actina è stata misurata mediante videodensitometria e i risultati sono stati espressi come rapporti dopo la normalizzazione a 1 del controllo. I risultati sono la media di almeno 4 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p < 0.002 vs controlli. Pannello C: Le cellule HTC sono state trasfettate transientemente con un vettore di base pGL2 vuoto (vettore vuoto) o con un costrutto nel quale la luciferasi è controllata da un multimerico HRE (HRE), e sono state lasciate per 20 ore senza trattamenti (C), o trattate con CGS21680 (5 μ M). In talune condizioni, sono state cotrasfettate con un vettore di espressione codificante per un mutante dominante negativo della subunità costitutiva HIF-1 β (Δ ARNT). Le cellule sono state cotrasfettate con un vettore di controllo contenente il gene della renilla luciferasi. La chemiluminescenza, corretta per l'efficienza di trasfezione sulla base dell'attività di renilla luciferasi, è stata normalizzata a 1 in confronto all'attività nelle cellule non trattate. I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti \pm D.S. Significatività statistica: ** p < 0.001 vs vettore vuoto/C o vettore vuoto/CGS; * p < 0.004 vs HRE/CGS. Pannello D: Espressione di C.A.IX in cellule HTC cotrasfettate con un vettore di espressione codificante per un mutante dominante negativo della subunità costitutiva HIF-1 β (Δ ARNT). I risultati sono la media di almeno 3 esperimenti differenti \pm D.S. Significatività statistica: * p < 0.002 vs C, C/ Δ ARNT o Δ ARNT/CGS.

L'espressione dell'Anidrasi Carbonica IX media gli effetti protettivi del preconditionamento ritardato contro il danno da ipossia.

Numerosi studi suggeriscono il coinvolgimento dell' A.C. IX nella regolazione del pH intra ed extra-cellulare. Per questo motivo abbiamo analizzato il possibile contributo dell'A.C. IX nel mediare gli effetti protettivi del preconditionamento ritardato sull'acidificazione del pH intracellulare. Bloccando l'A.C.IX con acetazolamide o inibendo l'uptake di bicarbonato degli epatociti attraverso lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ con il disodio-4-acetamido-4'-isotiocianato-stilben-2,2'-disulfonato (SITS) viene revertita la protezione indotta dal preconditionamento ritardato. Infatti, il trattamento con acetazolamide e SITS, 15min. prima dell'incubazione ipossica, reverte gli effetti protettivi indotti dal preconditionamento ritardato sulla vitalità cellulare (Fig. 7 A), sul pH intracellulare (Fig. 7 B) e sull'accumulo di Na^+ citosolico (Fig. 7 C).

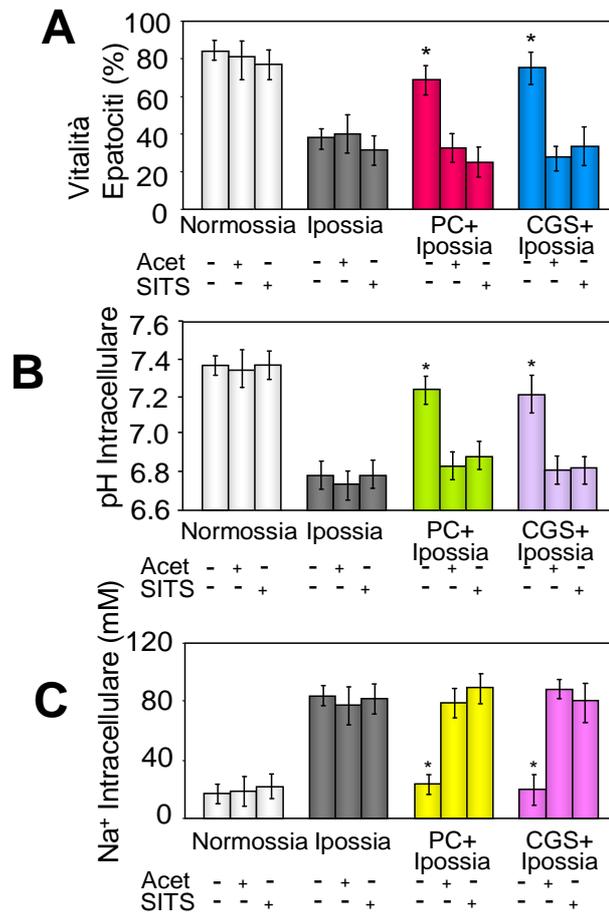


Figura 7.

C.A.IX media gli effetti protettivi del preconditionamento ritardato contro il danno ipossico. Il preconditionamento ritardato è stato indotto mediante uno stress ipossico (PC) o 15 minuti d'incubazione con CGS21680 (CGS, 5 μM). Cellule preconditionate e cellule di controllo (C) sono state coltivate per 24 ore in condizioni normossiche.

L'inibitore della C.A.IX acetazolamide (Acet, 100 μ M) o il bloccante dello scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ SITS (50 μ M) sono stati aggiunti 15 minuti prima dell' incubazione ipossica. Pannello A: la vitalità degli epatociti è stata valutata dopo 60 minuti d' incubazione in condizioni normossiche o ipossiche. I risultati sono la media di almeno 4 esperimenti indipendenti \pm D.S.. Significatività statistica: * $p < 0.001$ vs cellule preconditionate + inibitori. Pannello B: il pH intracellulare è stato valutato dopo 30 minuti d' incubazione in condizioni normossiche o ipossiche. I risultati sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti \pm D.S.. Significatività statistica: * $p < 0.04$ vs cellule preconditionate + inibitori. Pannello C: la concentrazione del Na^+ intracellulare è stata valutata dopo 30 minuti d' incubazione in condizioni normossiche o ipossiche. I risultati sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti \pm D.S. Significatività statistica: * $p < 0.002$ vs cellule preconditionate + inibitori.

DISCUSSIONE

L'azione protettiva associata alla fase ritardata del preconditionamento è ben documentata nel cuore e nel cervello (Bolli, 2000; Gidday, 2006). Nel fegato, il preconditionamento ritardato può essere indotto da un breve ciclo di ischemia/riperfusion, un'ipertermia transitoria, uno stress ossidativo e dal peptide natriuretico atriale ed è associato all'induzione di un numero di geni citoprotettivi, fra i quali figurano l'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS), Bcl-2, Bcl-xL, heat shock proteins ed eme-ossigenasi 1 (Carini et al., 2003 a; Lai et al., 2004; Koti et al., 2005). Il preconditionamento epatico ritardato migliora la perfusione sinusoidale post-ischemica, l'infiltrazione leucocitaria, la produzione biliare e il rilascio di aminotransferasi, fino a quarantotto ore dopo l'applicazione degli stimoli preconditionanti (Carini et al., 2003a). A causa della sua durata prolungata, l'induzione farmacologica del preconditionamento ritardato potrebbe essere particolarmente rilevante nel migliorare il danno da ischemia/riperfusion nella chirurgia epatica (Banga et al., 2000; Selzner et al., 2003), ma le conoscenze sui meccanismi coinvolti nel suo sviluppo sono ancora preliminari.

Le ricerche riportate in questo lavoro hanno voluto approfondire la caratterizzazione dei sistemi molecolari responsabili della produzione della fase ritardata del preconditionamento in epatociti primari di ratto. In particolare la nostra attenzione si è focalizzata su uno dei più importanti fattori di trascrizione modulati dall'ipossia, il fattore inducibile da ipossia-1 (HIF-1).

HIF-1 è infatti noto essere in grado di promuovere l'attivazione di specifici geni target ad azione citoprotettiva che nel caso del preconditionamento ritardato possono avere un ruolo chiave nell'acquisizione di una maggiore resistenza al danno tessutale da ischemia/riperfusion. I primi studi in cui è stato accertato il coinvolgimento di HIF-1 nel preconditionamento sono stati condotti su cervello di roditori. Questi studi hanno mostrato che 1-6 ore d'ipossia non letale seguite da 24 ore di riossigenazione inducono l'espressione di elevati livelli di HIF-1 e di suoi geni target. L'espressione di tali geni è inoltre risultata associata alla prevenzione degli effetti dannosi di una successiva ischemia (Bernaudin et al., 2002; Tang et al., 2006). Inoltre, Cai e collaboratori hanno recentemente riportato la completa perdita della cardioprotezione indotta da preconditionamento ischemico in topi con parziale mancanza di HIF-1 α (Cai et al., 2007).

Nel nostro modello sperimentale di epatociti preconditionati, abbiamo evidenziato un aumento del legame di HIF-1 al DNA 2 ore dopo l'esposizione agli stimoli preconditionanti. Abbiamo inoltre osservato che tale fenomeno si associa ad un incremento del contenuto nucleare di HIF-1 α .

L'attivazione di HIF-1 è stata abolita bloccando i recettori A_{2a} dell'adenosina (A_{2A}R), mentre la stimolazione degli epatociti esposti a normossia con l'agonista dei recettori A_{2a} dell'adenosina, CGS21680, ha mimato l'effetto dell'ipossia transiente. Questo ha indicato che la stimolazione di HIF-1 durante il preconditionamento epatico coinvolge meccanismi ossigeno-indipendenti innescati da segnali mediati dall'adenosina.

L'adenosina è un noto mediatore del preconditionamento epatico (Peralta et al., 1999; Carini et al., 2001) ed aumenta la tolleranza del fegato al danno indotto da ischemia/riperfusion (Lappas et al., 2006). La capacità dell'adenosina di promuovere l'attivazione ossigeno-indipendente di HIF-1 negli epatociti è sostenuta da recenti osservazioni che vedono l'adenosina attivare HIF-1 in macrofagi murini e in cellule di glioblastoma (Merighi et al., 2006; De Ponti et al., 2007; Ramanathan et al., 2007). Evidenze crescenti indicano che i fattori di crescita, le citochine e gli ormoni vascolari possono portare a un'induzione ossigeno-indipendente di HIF-1 in diversi tipi cellulari (Dery et al., 2005). Diversamente dalla stabilizzazione di HIF-1 α ossigeno-dipendente, la condizione ossigeno-indipendente comporta un incremento nella

traduzione dell'mRNA di HIF-1 α che sposta l'equilibrio tra la sintesi e la degradazione di HIF-1 α a favore di un suo accumulo tale da permettere la finale attivazione di HIF-1 (Dery et al., 2005).

Studi compiuti da molti laboratori hanno identificato il ruolo di PI3K, PKB/Akt, mTOR e p70S6 chinasi nella regolazione della traduzione dell'mRNA di HIF-1 attraverso la fosforilazione della proteina S6 nell'unità ribosomiale 40S (Dery et al., 2005). Inoltre, Page e collaboratori (Page et al., 2002) hanno mostrato che segnali regolati da PI3K e da PKC sono responsabili di un incremento della trascrizione dell'mRNA di HIF-1 α in cellule muscolari lisce vasali stimulate con angiotensina II. A tale riguardo è importante sottolineare che, come abbiamo osservato negli epatociti preconditionati, l'attivazione di HIF-1 indotta dall'angiotensina II è evidente solo dopo 2 ore dall'aggiunta dell'agonista e richiede il reclutamento della PI3K/Akt e PKC.

Queste osservazioni, unite al fatto che nel preconditionamento epatico i recettori A_{2A} dell'adenosina attivano la via di segnalamento che coinvolge la PI3K e le PKC δ/ϵ (Carini et al., 2001; 2004 a; 2004 b), suggeriscono la possibilità che l'induzione di HIF-1 mediata dall'adenosina possa essere dovuta ad un incremento della trascrizione e della traduzione di HIF-1 α . Il ruolo di HIF-1 nella protezione delle cellule epatiche contro il danno ischemico è anche in accordo con le recenti osservazioni riguardanti la capacità degli inibitori della HIF-prolil-idrossilasi nel prevenire l'ictus cerebrale (Gidday et al., 2006) e l'infarto del miocardio (Natarajan et al., 2006).

In questo lavoro abbiamo osservato che l'attivazione di HIF-1, innescata dalla stimolazione dei recettori A_{2A} dell'adenosina, è associata ad un incremento dell'espressione dell'anidrasi carbonica IX (A.C.IX).

Numerose evidenze sperimentali hanno precedentemente dimostrato che la trascrizione di A.C.IX è strettamente regolata da HIF-1 e studi in vitro hanno evidenziato che l'anidrasi carbonica IX può essere usata come marker per monitorare l'attivazione di HIF-1 (Wykoff et al., 2000). In accordo con tali osservazioni abbiamo mostrato che la trasfezione della subunità HIF-1 β dominante negativa previene l'espressione di C.A.IX nelle cellule epatiche preconditionate.

La A.C.IX è un enzima transmembrana espresso costitutivamente a livello del tratto gastrointestinale. L'espressione di A.C.IX al di fuori del tratto gastrointestinale è trascurabile in normossia, ma viene fortemente indotta in condizioni ipossiche (Wykoff et al., 2000; Svastova et al., 2004). È stato proposto che l'anidrasi carbonica IX giochi un ruolo chiave nell'acidificazione dell'ambiente extracellulare e nel mantenimento del pH intracellulare, mediante il rifornimento di bicarbonato all'interno della cellula (Wykoff et al., 2000; Svastova et al., 2004; Casey et al., 2006). A conferma di un ruolo della A.C.IX nella regolazione del pH intracellulare, in questo lavoro abbiamo mostrato che l'induzione di tale enzima negli epatociti preconditionati è in grado di migliorare l'acidosi intracellulare indotta da ischemia, promuovendo l'uptake di bicarbonato attraverso lo scambiatore Cl⁻/HCO₃⁻.

Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente dimostrato che l'attivazione di sistemi di regolazione del pH Na⁺-dipendenti (lo scambiatore Na⁺/H⁺ e il co-trasportatore Na⁺/HCO₃⁻) in risposta all'acidosi intracellulare causa un accumulo irreversibile di Na⁺ che, alterando la regolazione del volume cellulare, provoca la lisi osmotica e la morte per necrosi degli epatociti (Carini et al., 1995; 1999).

Abbiamo anche osservato che tutte le condizioni che prevengono l'acidosi intracellulare o il sovraccarico di Na⁺ svolgono un'azione protettiva contro la morte degli epatociti (Carini et al., 1995; 1999; 2000; 2003a; 2003c; 2004b; 2006b).

In accordo con tali osservazioni in questo lavoro abbiamo dimostrato che l'induzione della A.C.IX durante la fase ritardata del preconditionamento epatico riduce l'accumulo di sodio intracellulare e tale effetto è associato alla prevenzione della necrosi epatocitaria in condizioni di ipossia. Questo meccanismo è coerente con numerose osservazioni che dimostrano un'elevata espressione della A.C.IX nei tumori solidi umani e la correlazione fra la sua espressione e la progressione del tumore e del rischio di prognosi negativa per il paziente (Robertson et al., 2004). Tali

osservazioni cliniche, unitamente ai risultati riportati in questo lavoro, suggeriscono un ruolo svolto dalla A.C.IX nello sviluppo della resistenza all'ipossia da parte delle cellule tumorali. Non è da meno l'importanza che assume l'attivazione di HIF-1 mediante preconditionamento nel miglioramento del danno epatocellulare ischemico. Tale effetto epatoprotettivo di HIF-1 è concordante con recenti osservazioni di Plock e coll. che riportano che l'attivazione di HIF-1 in fegati di topo esposti ad una moderata ipossia induce l'espressione di proteine ad effetto citoprotettivo e previene l'apoptosi degli epatociti indotta da fas ligando (Plock et al., 2007).

In conclusione, i nostri risultati mostrano che nell'induzione degli effetti protettivi della fase ritardata del preconditionamento epatico è implicata la stimolazione autocrina dei recettori A_{2A} dell'adenosina, la quale promuove l'attivazione di una via di segnalamento che coinvolge le proteine PI3K e PKC. Tali mediatori inducono la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione HIF-1 α e ne aumentano la capacità di legame al DNA. L'attivazione di HIF-1 correla con un incremento dell'espressione dell'Anidrasi Carbonica IX, enzima responsabile della conversione dell'anidride carbonica in bicarbonato nell'ambiente extracellulare. Il trasporto successivo del bicarbonato all'interno degli epatociti attraverso lo scambiatore Cl⁻/HCO₃⁻ permette il mantenimento del pH citosolico, la prevenzione dell'accumulo di Na⁺ e della conseguente morte cellulare per lisi osmotica (Fig. 8). Queste osservazioni, unitamente alla dimostrata capacità di HIF-1 di inibire segnali pro-apoptotici (Gidday et al., 2006; Pouyssegur et al., 2006; Plock et al., 2007; Semenza et al., 2007), indicano HIF-1 come nuovo potenziale bersaglio molecolare per l'induzione farmacologica del preconditionamento ritardato nel fegato.

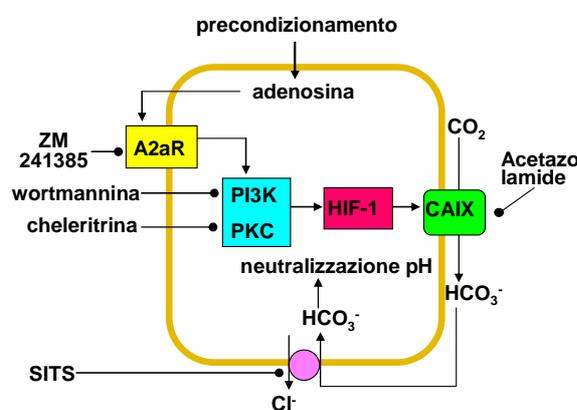


Figura 8.

Meccanismi molecolari coinvolti nella prevenzione del danno ipossico negli epatociti di ratto esposti al preconditionamento ritardato.

BIBLIOGRAFIA

- Arai K., Shimaya A., Hiratani N., Ohkuma S. Purification and characterization of lysosomal H⁺-ATPase. An anion-sensitive v-type H⁺-ATPase from rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 1993; 268: 5649-5660.
- Banga RN, Homer-Vanniasikam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White Sa, Prasad KR. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005; 92:528-538.
- Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* 2002; 277:39728-39738.
- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circulation research* 2000; 87:972-983.
- Bolli R., Shinmura K., Tang XL., Kodani E., Xuan YT., Guo Y., Dawn B. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc res* 2002; 55: 506-519.
- Breton S. The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP. Journal of the Pancreas* 2001; 2:159-164.
- Bronk SF., Gores GJ. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991; 14: 626-633.
- Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 I. *Cardiovasc Res.* 2007 doi:10.1093/cvr/cvm035.
- Carini R, Bellomo G, Benedetti A, Fulceri R, Gamberucci A, Parola M, Dianzani MU, Albano E. Alteration of Na⁺ homeostasis as a critical step in the development of irreversible hepatocyte injury after adenosine triphosphate depletion. *Hepatology* 1995; 21:1089-1098.
- Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248:280-293.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na⁽⁺⁾ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):166-72.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33:131-139.
- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003 a; 125:1480-1491.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2003 b; 34:1047-1055.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E. Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology* 2003 c; 37:277-285.
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Balzani G, Nitti MP, Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocytes preconditioning. *Gastroenterology* 2004 a; 127:914-923.

- Carini R, Castino R, De Cesaris MG, Splendore R, Demoz M, Albano E, Isidoro C. Preconditioning-induced cytoprotection in hepatocytes requires Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes. *Journal of cell science* 2004 b. Vol 117:1065-1077.
- Carini R, Trincerri NF, Alchera E, De Cesaris MG, Castino R, Splendore R, Albano E, Isidoro C. PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2006 a; 40:1738-1748.
- Carini R, Alchera E, De Cesaris MG, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G, Albano E. Purinergic P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J Hepatol* 2006 b;45:236-245.
- Casey JR. Why bicarbonate? *Biochem Cell Biol* 2006; 84:930-939.
- Chapman-Smith A, Lutwyche JK, Whitelaw ML. Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J Biol Chem.* 2004; 279:5353- 62.
- Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning from adenosine receptor to KATP channel. *Annual review of physiology* 2000; 62:79-109.
- De Ponti C, Carini R, Alchera E, Nitti MP, Locati M, Albano E, Cairo G, Tacchini L. Adenosine A2a receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K-dependent pathways in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007 Aug;82(2):392-402. Epub 2007 May 15.
- Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Mar;37(3):535-40.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999; Aug 15;59(16):3915-8.
- Gasbarrini A., Borle AB., Farghali H., Bender C., Francavilla A., Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 6654-6663.
- Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:437-48.
- Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res.* 2001; Jul 6;89(1):47-54.
- Gottlieb RA., Gruol DL., Zhu JY., Engler RL. Preconditioning in rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase and apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2391-2398.
- Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999; Sep 1;94(5):1561-7.
- Hilvo M, Rafajová M, Pastoreková S, Pastorek J, Parkkila S. Expression of Carbonic Anhydrase IX in Mouse Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2004; 52(10): 1313-1321.
- Hoshida S., Yamashita N., Otsu K., Hori M. The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines. *Cardiovasc res* 2002; 55: 495-505.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):7987-92.
- Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 31: 416-419.
- Jaeschke H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 284:G15.

- Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DDH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73:493-499.
- Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R and Semenza GL, Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 17771-17778, 1996.
- Kaluz S, Kaluzova M, Opavsky R, Pastorekova S, Gibadulinova A, Dequiedt F, Kettmann R, Pastorek J. Transcriptional Regulation of the MN/CA 9 Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase IX. 1999; Vol. 274, No. 46, Issue of November 12, pp. 32588-32595.
- Kaluz S, Kaluzová M, Chrastina A, Olive PL, Pastoreková S, Pastorek J, Lerman MI, Stanbridge EJ. Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1a stabilization. *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4469-77.
- Kiemer AK, Vollmar AM, Bilzer M, Gerwing T, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF- α mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF- κ B and AP-1. *J Hepatol* 2000; 33: 236-246.
- Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J* 2005; 19:1155-1157.
- Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 251-258.
- Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation* 2004; 77:1004-1008.
- Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 2006; 203:2639-2648.
- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169-173.
- Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Borea PA. Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:19-31.
- Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, Kim KR, Yu DY, Murakami S, Kim CW, Kim KW. Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α . *FASEB J.* 2004; Feb;18(2):382-4. Epub 2003 Dec 19.
- Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, Fowler AA 3rd, Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res.* 2006; 98:133-140.
- Page EL, Robitaille GA, Pouysségur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48403-9.
- Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavsky R, Zelnik V, Saarnio J, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997; 112:398-408.
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosellò-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997 Apr; 25:934-937.

- Peralta C, , Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Bulbena O, Rosellò-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by the activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29:126-132.
- Plock J, Frese S, Keogh A, Bisch-Knaden S, Ayuni E, Corazza N, Weikert C, Jakob S, Erni D, Dufour JF, Brunner T, Candinas D, Stroka D. Activation of non-ischemic, hypoxia-inducible signalling pathways up-regulate cytoprotective genes in the murine liver. *J Hepatol.*2007; 47:538-545.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441:437-443.
- Ramanathan M, Pinhal-Enfield G, Hao I, Leibovich SJ. Synergistic Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Macrophages by Adenosine A2A Receptor Agonists and Endotoxin Involves Transcriptional Regulation via the Hypoxia Response Element in the VEGF Promoter. *Mol Biol Cell* 2007; 18:14-23.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; Sep 1;275(35):26765-71.
- Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* 2004; 64:6160-6165.
- Rosser BG., Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-275.
- Scheibe RJ, Gros G, Parkkila S, Waheed A, Grubb JH, Shah GN, Sly WS, Wetzel P. Expression of Membrane-bound Carbonic Anhydrases IV, IX, and XIV in the Mouse Heart. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54(12):1379-1391.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 May; 5(5):343-54.
- Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterol* 2003; 125:917-936.
- Semenza GL., Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec;12(12):5447-54.
- Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J.* 2007 Jul 1; 405(1):1-9.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001 Feb; 181(2):160-6.
- Shauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003; 37: 286-295.
- Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zat'ovicova M, Gibadulinova A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004; 577:439-445.
- Tang Y, Pacary E, Freret T, Divoux D, Petit E, Schumann-Bard P, Bernaudin M. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol Dis* 2006; 21:18-28.
- Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of rat liver. *Hepatology* 2000; 31: 407-415.

- Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Muroso S, Furukawa M, Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*. 2004; Jun; 24(12):5223-34.
- Wang GL, Jiang B, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 a; 92:5510-14.
- Wang GL and Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230-1237,1995 b.
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60:7075-7083.
- Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, Kimoto S, Yamamoto H, Ozaki M, Yamamoto M. Heat shock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia-reperfusion in steatotic rat livers. *J Surg Res* 1998; 79: 47-53.
- Yamagami K, Yamamoto Y, Toyokuni S, Hata K, Yamaoka Y. Heat shock preconditioning reduces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4'-hydroxy-2-nonenal modified proteins in ischemia-reperfused liver of rats. *Free Radic Res*,2002; 36:169-176.
- Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, Bruick RK. Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2005; 280:36047- 54.
- Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon. A tool for scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000; 87:543-550.

ATTIVITA' FORMATIVA

Durante questo primo anno di dottorato, oltre al mio progetto, ho partecipato alla realizzazione di altre linee di ricerca seguite dal mio gruppo di lavoro:

- 1) Studio del Precondizionamento su biopsie di fegati umani analizzando l'attivazione o l'aumentata espressione dei mediatori del Precondizionamento caratterizzati nel nostro modello sperimentale in correlazione con dati clinici e sierologici:
- 2) Studio dei meccanismi intracellulari attivati dal Precondizionamento indotto "in vivo" in fegati di ratto sottoposti a trapianto:
- 3) Studio del ruolo della DGK nello sviluppo del Precondizionamento epatico:
- 4) Messa a punto di co-culture cellulari epatiche con l'obiettivo di appurare se lo sviluppo del fenotipo preconditionato da parte di una specifica cellula epatica è dovuto o meno alla presenza di altri tipi di cellule epatiche.

CORSI FREQUENTATI

Primo anno:

Corso di Inglese scientifico base.

CONGRESSI FREQUENTATI

Ho partecipato al congresso:

“Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia”.

15-20 Gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver - Vancouver, British Columbia - Canada.

E' stato inviato l'abstract **“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes”** Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini.

Comunicazioni presentate personalmente (poster):

“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes”

Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver - Vancouver, British Columbia - Canada.

PUBBLICAZIONI

Articoli:

E. Alchera, L. Tacchini, C. Imarisio, C. Dal Ponte, C. De Ponti, E. Gammella, G. Cairo, E. Albano, R. Carini. **Adenosine-Dependent Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Induces Late Preconditioning in Liver Cells. Hepatology 2008; 48: 230-239.**

Abstract:

“Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes” Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Keystone Symposia on molecular and cellular biology; 2008 Abstract Book; 144, pag.140.

“Role of HIF-1 and Carbonic Anhydrase IX in the induction of the Late Protective effects of Hepatocyte Preconditioning”. Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini. Journal of Hepatology; Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver, April 23-27,2008, Milan, Italy. S65-147.

“Stimulation of Adenosine A_{2A} Receptors Induces Postconditioning in Isolated Hepatocytes”. Caterina Dal Ponte, Elisa Alchera, Chiara Imarisio, Emanuele Albano and Rita Carini. Journal of Hepatology; Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver, April 23-27,2008, Milan, Italy. S66-150.

PARTECIPAZIONI A SEMINARI

4 ottobre 2007

Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica, svolto dal Prof. Fabio Marra, del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Firenze.

14 gennaio 2008

Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche, svolto dal Tenente Dott. Giorgio Portera, Ufficiale Biologo Carabinieri Reparto Investigazioni Scientifiche (RIS) Parma .

21 gennaio 2008

K+ channels in the heart: in and out of control, svolto dalla Dr. Susanne Radicke, Ph.D della University of Technology di Dresda.

23 gennaio 2008

Integrin trafficking and tumour cell invasiveness, svolto dal Dr. Jim Norman, Integrin Cell Biology Lab Beatson Institute for Cancer Research Glasgow, Scotland.

24 gennaio 2008

La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni, svolto dal Prof. Mario Raspanti, Professore dell'Università dell'Insubria-Varese.

31 gennaio 2008

Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatico cronica, svolto dal Prof. Valter Gattei, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio e per le terapie cellulari Centro di Riferimento Oncologico, I.R.C.C.S., Aviano.

6 febbraio 2008

Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo, svolto dal Dott. Gianluca DeBellis, Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Tecnologie Biomediche Segrate.

6 marzo 2008

Applications of gene expression profiling to cancer research, svolto dal Prof. Enzo Medico, Istituto di Ricerca e Cura del Cancro, Candiolo (Torino) Professore Associato di Istologia - Università di Torino.

7 marzo 2008

Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury, svolto dal Dr. Joan Rossello Catafau, Experimental Hepatology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques Barcellona.

13 marzo 2008

To repress gene expression just take out vinegar: role of the class II histone deacetylase HDAC4, svolto dal Prof. Claudio Brancolini, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche MATI Center of Excellence, Università di Udine.

9 aprile 2008

Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria, svolto dal Professor Gaetano Cairo, Istituto di Patologia Generale, Università di Milano.

14 aprile 2008

Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato, svolto Professor Massimo Massaia Università di Torino.

15 maggio 2008

The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions, svolto dalla prof. Agata Budkowska, dell' Institut Pasteur, Unitè Hèpacivirus, Parigi.

26 maggio 2008

Copy number variatons: non solo ritardo mentale, svolto dalla Prof. Orsetta Zuffardi, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Pavia.

5 giugno 2008

Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation, svolto dal Dr. Piero Carninci, RIKEN Genome Science Laboratory (Japan).

3 e 11 giugno 2008

Il trasferimento tecnologico dall'università all'impresa, svolto da Fabio Gastaldi, Fabrizio Conicella, Kevin Romani e Alberto Baldi, Bioindustry Park Canadese.

13 giugno 2008

Problem solving in patologia epatica, svolto dal Prof. Gavino Faà, Professore ordinario di Anatomia Patologica, Università di Cagliari.

1 luglio 2008, **Recombinant protein expression**

2 luglio 2008, **Recombinant antibodies and other affinity reagents**

16 luglio 2008, **Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma**

18 luglio 2008, **Fluorescent proteins**

Svolti dal Prof. Andrew Bradbury, Biosciences Division, Los Alamos National Laboratory, New Mexico.