



DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Nuovi Meccanismi di Tossicità Cardiaca Mediati da Oligomeri di Desmina

Tutor: Giulio Agnetti, PhD - DIBINEM, via Irnerio 48, Bologna

Introduzione

L'insufficienza cardiaca (HF) rappresenta una delle principali cause di morte al mondo, nonostante questo i meccanismi molecolari alla base del suo sviluppo non sono chiari¹.

Recenti evidenze in letteratura suggeriscono per l'HF l'esistenza di meccanismi di tossicità simili a quelli operanti nel cervello in malattie neurodegenerative, come la formazione di amiloidi². Inoltre è stato ipotizzato che le specie tossiche in malattie quali demenza senile siano oligomeri pre-amiloidi (PAOs) e non gli aggregati descritti oltre un secolo fa da Alzheimer³.

Il nostro gruppo, in collaborazione con Johns Hopkins University, ha di recente riportato l'esistenza di tali specie in un modello canino di HF e ha correlato la loro formazione all'induzione di forme modificate della proteina citoscheletrica desmina. Queste sono forme mono-fosforilate che si accumulano nel tessuto cardiaco sia nel modello canino che in pazienti con insufficienza⁴. La nostra ipotesi di lavoro è che tali forme mono-fosforilate di desmina inducano la formazione di PAOs responsabili di un'azione citotossica a carico dei mitocondri della cellula, come possibile meccanismo causale di HF.

Esperimenti preliminari hanno permesso di ottenere oligomeri pre-amiloidi *in vitro* trasducendo cardiomiociti neonatali di ratto (NRVM) con vettori lentivirali per forme mutanti di desmina che mimino o prevengano la fosforilazione delle Ser-27 e Ser-31 per sostituzione con Asp o Ala. PAOs di 600 kDa con caratteristiche amiloidosiche, dimostrate dalla positività alla Tioflavina T, e bande di controllo a ≈ 1200 kDa sono stati purificati mediante elettroforesi in condizioni native.

La tossicità mitocondriale degli oligomeri estratti da gel per elettroeluzione è stata testata incubando queste specie con particelle sub-mitocondriali (SMPs) ottenute da mitocondri cardiaci e valutandone il consumo di ossigeno con metodo ossigrafico. Le nostre analisi evidenziano come solo gli oligomeri pre-amiloidi di 600 kDa causino una riduzione del consumo di ossigeno, delineando un

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Sede Amministrativa Via Ugo Foscolo 7 - 40123 BOLOGNA – tel. 051 2092951 – Fax 051 2092958

Sede Operativa Biochimica
Via Irnerio 48, 40126 Bologna



DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

possibile meccanismo fisiopatologico di insorgenza di HF. Questi dati sono stati accettati in forma di abstract alla Gordon Conference su i filamenti intermedi di quest'anno (Snow Mountain, VT, US – giugno 2014).

Progetto

L'obiettivo nei 6 mesi di finanziamento sarà quello di valutare ulteriormente il danno mitocondriale indotto dai PAOs di desmina in mitocondri isolati e possibilmente in cellule intere. I mitocondri verranno isolati da cuori di ratto adulto⁵ e incubati con oligomeri derivati dai diversi mutanti verranno incubati per 20 e 40 minuti. Il consumo di ossigeno verrà misurato con metodo ossigrafico in presenza di diversi substrati (NAD⁺ e Succinato) o inibitori dei complessi della catena respiratoria (Rotenone).

Un ulteriore obiettivo del mio progetto sarà quello di ottenere linee cellulari che esprimano stabilmente oligomeri pre-amiloidi di desmina. Il medesimo vettore lentivirale utilizzato per infettare i NRVM sarà utilizzato sulla linea cellulare H9c2, una linea di cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto⁶. L'integrazione del plasmide nel genoma delle cellule H9c2 ci consentirà di ottenere dei cloni che esprimono stabilmente forme mono-fosforilate di desmina e producono PAOs. L'attività mitocondriale in cellule intere verrà monitorata mediante MitoTracker® (Life Technologies) tramite analisi al microscopio confocale. Image J sarà utilizzato per l'analisi di immagine. I dati ottenuti da questi esperimenti verranno analizzati tramite il software Prism (GraphPad) usando one-way (per una variabile) o two-way (per i trattamenti) ANOVA seguito da analisi Tukey post-hoc. Per tutti gli esperimenti $P \leq 0.05$ verrà considerato significativo. Ci aspettiamo di misurare una tossicità sequenza-specifica e dose-dipendente degli oligomeri di desmina generati da mutanti mono-fosfo-mimetici per Ser-28 sia su mitocondri isolati che in cellule intere nei tempi previsti dalla durata del progetto.

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Sede Amministrativa Via Ugo Foscolo 7 - 40123 BOLOGNA – tel. 051 2092951 – Fax 051 2092958

Sede Operativa Biochimica
Via Irnerio 48, 40126 Bologna



DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

References

1. Braunwald E. Research advances in heart failure: a compendium. *Circ Res* 2013;113:633-645.
2. Willis MS , Patterson C. Proteotoxicity and cardiac dysfunction--Alzheimer's disease of the heart? *N Engl J Med* 2013;368:455-464.
3. Haass C , Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101-112.
4. Agnetti G, Halperin VL, A Kirk J, Chakir K, Guo Y, Lund L, *et al.* Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure. *Cardiovasc Res* 2014;.
5. Bosetti F, Baracca A, Lenaz G, Solaini G. Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early post-ischemic reperfusion of rat heart. *FEBS Lett* 2004;563:161-164.
6. Agnetti G, Maraldi T, Fiorentini D, Giordano E, Prata C, Hakim G, *et al.* Activation of glucose transport during simulated ischemia in H9c2 cardiac myoblasts is mediated by protein kinase C isoforms. *Life Sci* 2005;78:264-270.

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Sede Amministrativa Via Ugo Foscolo 7 - 40123 BOLOGNA – tel. 051 2092951 – Fax 051 2092958

Sede Operativa Biochimica
Via Irnerio 48, 40126 Bologna