

CARATTERIZZAZIONE DI UNA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE MODULATA DAL CAMP IN MODO INDIPENDENTE DALL'ATTIVITÀ DELLA PKA: VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DI SEGNALI DI CALCIO DA PARTE DI EPAC IN CARDIOMIOCITI NEONATALI DI RATTO

Relazione scientifica di Andrea Marcantoni

(Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università degli Studi di Torino)

SOMMARIO

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il ruolo svolto dall'Adenosin Monofosfato Ciclico (cAMP) nell'induzione di fenomeni ipertrofici cardiaci secondo modalità indipendenti dall'attività della Proteina Chinasi A (PKA).

Recentemente, è stata scoperta una nuova famiglia di proteine attivate direttamente dal cAMP. Tali proteine, denominate EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP), appartengono alla classe delle Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) e sono in grado di interagire con il cAMP con un'affinità di legame simile a quella che caratterizza l'interazione tra il cAMP stesso con la subunità regolatoria della PKA. Queste proteine si sono dimostrate capaci di svolgere una funzione di GEFs nei confronti di piccole proteine G, come Rap1 e Rap2, appartenenti alla famiglia Ras; in particolare, EPAC1, in seguito al legame con il cAMP, è in grado di favorire lo scambio del Guanosin Difosfato (GDP) con il Guanosin Trifosfato (GTP) attivando, secondo questa modalità, le piccole proteine G Rap1 e Rap2.

Si ritiene che EPAC possa essere coinvolta nell'induzione di fenomeni di ipertrofia cardiaca. Esperimenti preliminari, evidenziano infatti che, in cardiomiociti neonatali di ratto, la stimolazione di questa proteina determina un aumento delle dimensioni cellulari ed un aumento dei livelli di espressione di alcuni geni considerati marcatori di fenomeni ipertrofici. Partendo da questi presupposti e considerando che, in condizioni di ipertrofia, nel muscolo cardiaco si osservano inoltre modificazioni dell'omeostasi intracellulare dello ione calcio, sono stati condotti esperimenti allo scopo di valutare se l'attivazione di EPAC determini variazioni della concentrazione intracellulare di tale ione. È stato evidenziato in cardiomiociti neonatali di ratto che l'attivazione di EPAC è in grado di determinare fenomeni di rilascio di calcio, presumibilmente da parte del reticolo sarcoplasmatico, secondo modalità indipendenti dall'attivazione della PKA.

INTRODUZIONE

Il cAMP ed il suo coinvolgimento in vie di trasduzione del segnale indipendenti dalla PKA, il ruolo di EPAC.

Il cAMP è, come già sottolineato in precedenza, uno dei più importanti messaggeri intracellulari presenti a livello cardiaco, e per lungo tempo la PKA è stata considerata come il principale effettore di questo nucleotide ciclico.

La scoperta di proteine denominate EPAC (Exchange Protein Directly Activated by cAMP) ha dimostrato l'esistenza di messaggeri direttamente attivati dal cAMP senza il necessario coinvolgimento della PKA ed ha aperto la strada all'indagine di nuove vie di trasduzione del segnale modulate dal cAMP (Rojj J. et al., 1998; Kawasaki H. et al., 1998).

Le proteine EPAC appartengono alla classe delle "Guanine Nucleotide Exchange Factors" (GEF's) e sono in grado di interagire con il cAMP con una affinità di legame simile a quella che caratterizza

l'interazione tra il cAMP stesso e la subunità regolatoria della PKA (Roij J. et al, 1998; Kawasaki H. et al., 1998).

Queste proteine si sono dimostrate capaci di svolgere una funzione di GEFs nei confronti di piccole proteine G, come Rap1 e Rap2, appartenenti alla famiglia Ras; più precisamente si può affermare che, in seguito al legame con il cAMP, EPAC facilita lo scambio del Guanosin Difosfato (GDP) con il Guanosin Trifosfato (GTP) attivando, secondo questa modalità, le piccole proteine G Rap1 e Rap2 (Bos J.L., 2003) (Fig.1)

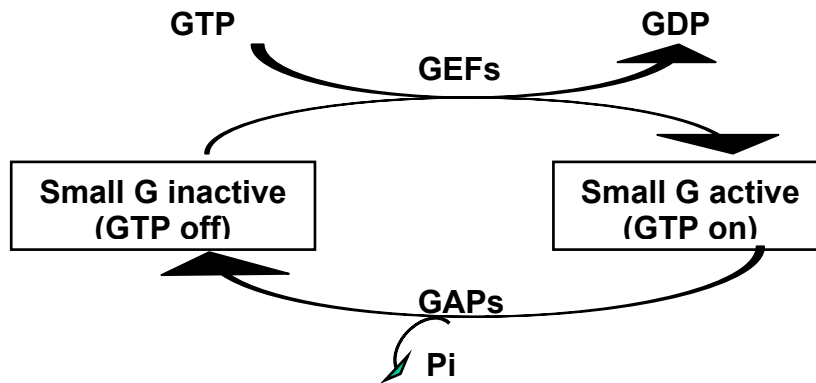


Fig.1 Meccanismo di funzionamento delle piccole proteine G

Al momento sono state isolate due isoforme di EPAC, EPAC1 ed EPAC2, entrambe caratterizzate dalla presenza di una regione regolatoria ed una catalitica (Kawasaki H. et al., 1998).

EPAC1 risulta essere particolarmente abbondante a livello cardiaco, sebbene sia espressa praticamente in tutti i tessuti, mentre EPAC2 è soprattutto presente nel tessuto nervoso e nelle ghiandole surrenali (Kawasaki H. et al., 1998).

Entrambe le isoforme di questa proteina sono coinvolte nella modulazione di fenomeni quali l'adesione cellulare (Rangarajan S. et al., 2002) e la secrezione di insulina (Ozaki N. et al., 2000). Particolarmente interessante risulta essere il ruolo, scoperto recentemente, di EPAC1 nella regolazione della secrezione di proteine con funzioni neuroprotettive e neurotrofiche (Maillet M. et al., 2003) (Fig.2). Infine, è stato anche dimostrato che EPAC è in grado di favorire, in sinergia con il fattore di crescita NGF, la crescita neuritica in cellule di ratto PC12 (Christensen A.E. et al., 2003).

Al momento, il ruolo di EPAC nel cuore resta sconosciuto.

EPAC attiva la piccola proteina G Rac

La superfamiglia delle piccole proteine G comprende numerose proteine con massa molecolare pari a 21 kDa, coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari. Nel loro stato inattivo ad esse è legato il GDP; la sostituzione di tale molecola con una molecola di GTP ne determina l'attivazione (Daniels R.H. and Bokoch G.M., 1999). La loro intrinseca attività GTP-asi consente loro di idrolizzare il GTP convertendolo nuovamente in GDP e di ritornare in uno stato inattivo; tale attività GTP-asi è inoltre stimolata dall'intervento di "GTPase-activating proteins" (GAPs).

Tra le differenti tipologie di piccole proteine G, la famiglia Rho, che include Rho, Rac e Cdc42, è stata particolarmente studiata in questi ultimi anni, essendo ritenuta importante nel processo di generazione del citoscheletro (Hall A. et al., 1998). Considerando il tessuto cardiaco, studi condotti utilizzando colture di cardiomiociti hanno evidenziato che l'espressione di un'isoforma di Rac costitutivamente attiva (V12Rac) determina fenomeni di ipertrofia (Pracyk J.B. et al., 1998; Clerk A. et al., 2001); inoltre, è stato dimostrato che topi transgenici che esprimono V12Rac sono affetti da cardiomiopatia dilatativa (Sussman M.A. et al., 2000). Queste osservazioni suggeriscono quindi che la piccola proteina G Rac sia coinvolta nella modulazione della risposta ipertrofica cardiaca e nel processo di rimodellamento cardiaco che si realizza durante lo sviluppo di alcune cardiomiopatie, in

cui si verifica un'alterazione dei meccanismi che regolano i fenomeni di adesione cellulare ed un aumento della taglia cellulare (Clerk A. and Sugden P.H., 2000).

I risultati di recenti esperimenti (Maillet M. et al., 2003) hanno evidenziato come EPAC1 sia in grado di regolare Rac attraverso l'attivazione di Rap1 (Fig.2) ed è stato anche evidenziato come la somministrazione di un composto, denominato 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, analogo del cAMP ed in grado di attivare in modo selettivo EPAC (Enserink J.M. et al., 2003), sia in grado di determinare l'attivazione selettiva di Rac in differenti tipi cellulari rappresentati, ad esempio, da cardiomiociti neonatali di ratto e da cellule HL-1 (Maillet M. et al., 2003); lo stesso risultato si ottiene infettando queste cellule con un costrutto adenovirale contenente il gene che codifica per la forma costitutivamente attiva di Epac1. E' stato infine dimostrato che recettori accoppiati a proteine G, come i recettori per la serotonina 5-HT₄ o i recettori β ₁ adrenergici, sono in grado di iniziare questa via di trasduzione del segnale (Maillet M. et al., 2003).

Nel complesso questi risultati rivelano un'insospettata connessione tra due famiglie di piccole proteine G, Ras e Rho, e suggeriscono che Rac possa funzionare a valle di una nuova via di trasduzione del segnale comprendente cAMP/EPAC1/Rap1 ed indipendente dall'attività della PKA.

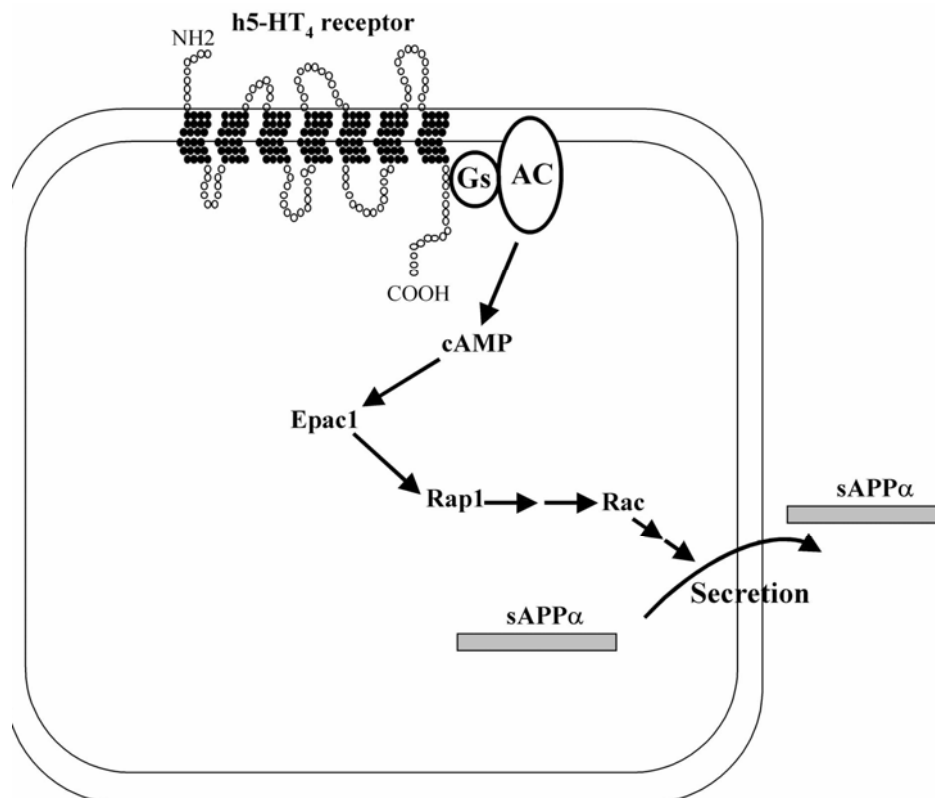


Fig.2 Attivazione di Rap1 e Rac da parte di EPAC in cellule nervose di topo in seguito alla stimolazione del recettore 5HT4. E' importante notare come l'attivazione di questa via di trasduzione del segnale determini il rilascio della proteina sAPP α , caratterizzata da importanti proprietà neurotrofiche. Una mancata funzionalità di questa via di trasduzione del segnale si ritiene possa essere causa di alcune patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer.

EPAC è coinvolta nell'indurre fenomeni di ipertrofia cardiaca?

In esperimenti preliminari (Morel E. et al., 2004) è stato osservato che, in colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto, l'attivazione di EPAC è seguita da un aumento delle dimensioni cellulari e del numero di filamenti di actina. Oltre a quanto descritto, EPAC sembrerebbe in grado di stimolare l'attività trascrizionale di geni considerati marcatori dell'ipertrofia cardiaca come l'Atrial Natriuretic Factor (ANF).

Nell'insieme questi risultati suggeriscono che l'attivazione di EPAC possa determinare l'insorgere di fenomeni di ipertrofia cardiaca.

Molti studi hanno ormai evidenziato che variazioni dell'omeostasi intracellulare del calcio determinano l'insorgere di fenomeni di ipertrofia cardiaca (Molkentin J.F., 2000) dovuti, almeno in parte, all'attivazione sostenuta di differenti vie di trasduzione del segnale modulate da questo messaggero (Balke C.W. and Shorofsky S.R., 1998). Pertanto, risulta plausibile valutare l'esistenza di una correlazione tra i fenomeni di ipertrofia cardiaca indotti dall'attivazione di EPAC ed eventuali variazioni dell'omeostasi intracellulare di calcio, considerando oltretutto che esistono già in letteratura delle prove che dimostrano come l'attivazione di EPAC, in cellule pancreatiche umane, determini fenomeni di rilascio di calcio (Kang G. et al., 2003).

MATERIALI E METODI

Colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto

Preparazione

Le cellule ventricolari neonatali si ottengono da ratti neonati di un giorno di età. Avvenuto il sacrificio, si procede all'espanto dei cuori che vengono rapidamente messi in 25 ml di soluzione fredda (ADS: NaCl 1,7 g, Hepes: 1,19 g, NaH₂PO₄: 0,03 g, Glucosio: 0,25 g, KCL: 0,1 g, MgSO₄: 0,025 g; pH 7,35 con NaOH) che è stata precedentemente filtrata. Gli atri vengono scartati ed i ventricoli vengono messi in 7 ml di soluzione enzimatica composta da ADS contenente Collagenasi (0,43 mg/ml, Boehringer) e Pancreatina (0,5 mg/ml, Sigma) ed agitati a 37°C per 5 minuti. Successivamente viene prelevato il surnatante che in questa fase predigestiva viene scartato. Sono quindi aggiunti altri 8ml di soluzione enzimatica e si ripete la fase di agitazione che dura 20 minuti.

Terminata questa fase si preleva il surnatante contenente le cellule e si aggiungono altri 8 ml di soluzione enzimatica ripetendo la fase di agitazione. Questa procedura viene eseguita 5 volte.

Le cellule che si ottengono sono centrifugate (1500 rpm/6 min) e trasferite in un tubo contenente 10ml di NCS (New Calf Serum, Invitrogen). Si effettua quindi una successiva centrifugazione (1500 rpm/6 min) e le cellule vengono risospese in 8 ml di soluzione ADS.

A questo punto si prepara una miscela di soluzioni in grado di generare un gradiente di densità che consente la separazione dei vari tipi cellulari presenti in funzione della loro dimensione. Per creare il gradiente si utilizza una soluzione Percoll (Sigma) diluita. La soluzione contenente le cellule ottenute dal processo di digestione enzimatico viene distribuita nei 4 tubi contenente ciascuno 7 ml di soluzione Percoll diluita. Si procede quindi ad una centrifugazione della durata di 30 minuti a 3000 rpm. Questa fase consente la separazione delle cellule non muscolari e delle emazie dai cardiomiociti ventricolari. Questi ultimi vengono risospesi in 40 ml di ADS e centrifugati (1500 rpm/6 min). A questo punto le cellule vengono sospese in 10ml di mezzo di coltura (Plating Medium: DMEM 7,5 ml, MEDIUM 199 1,7 ml, Horse Serum 0,5 ml, Newborn Calf Serum 0,05, Penicillina/Streptomycin 0,1 ml, Glutamina 0,1 ml), contaminate e piastrate (50000 cellule/ capsula) su capsule "petri" caratterizzate dalla base di vetro e per questo utilizzabili in esperimenti di "Calcium Imaging".

Poiché l'adesione cellulare su vetro non è sempre soddisfacente, le capsule vengono pretrattate con Laminina.

Alcuni esperimenti vengono condotti utilizzando cellule infettate con Adenovirus. Questa procedura consente di inserire nel genoma della cellula un plasmide contenente la sequenza genica che codifica per una specifica proteina, nel nostro caso il gene contenuto nel plasmide codifica per la proteina

EPAC. La cellula sottoposta a questo trattamento è caratterizzata da una sovraespressione della proteina in esame.

Allo scopo di verificare l'avvenuta infezione e soprattutto l'avvenuta trascrizione genica, si utilizzano normalmente plasmidi contenenti, oltre al gene codificante per la proteina oggetto di studio, anche il gene codificante per la proteina GFP; in questo modo le cellule in cui l'infezione ha avuto esito positivo, saranno anche caratterizzate dall'espressione di GFP e, se osservate con il microscopio a fluorescenza, risulteranno verdi e facilmente riconoscibili.

L'infezione con EPAC viene fatta considerando 100 come valore di M.O.I. (Multiplicity Of Infection), cioè come numero di virus per cellula. Come condizione di controllo si utilizzano celle infettate esclusivamente con GFP; in questo caso l'indice M.O.I. è pari a 10. Normalmente le cellule vengono infettate a 24 ore dalla dissociazione ed il virus viene lasciato agire per 24 ore; successivamente, si effettua un lavaggio e si attendono altre 24 ore prima di utilizzare le cellule.

Calcium Imaging

La sonda fluorescente utilizzata per valutare le variazioni di concentrazione intracellulare di calcio è rappresentata o dal FLUO-4AM (Molecular Probes) o, in alternativa, dalla RHOD-2AM (Molecular Probes), a seconda che si utilizzino rispettivamente cellule non infettate oppure infettate con costrutti adenovirali. In questo secondo caso le cellule, esprimendo la Green Fluorescence Protein (GFP), emettono luce fluorescente ad una lunghezza d'onda (λ) pari a 525nm. Tale valore di λ corrisponde a quello della luce fluorescente emessa dal FLUO-4AM quando è legato al calcio; per questo motivo si rende necessario l'utilizzo di una sonda per il calcio differente, rappresentata dalla RHOD-2 AM, che fluoresce ad un valore di λ pari a 570 nm (Fig.3).

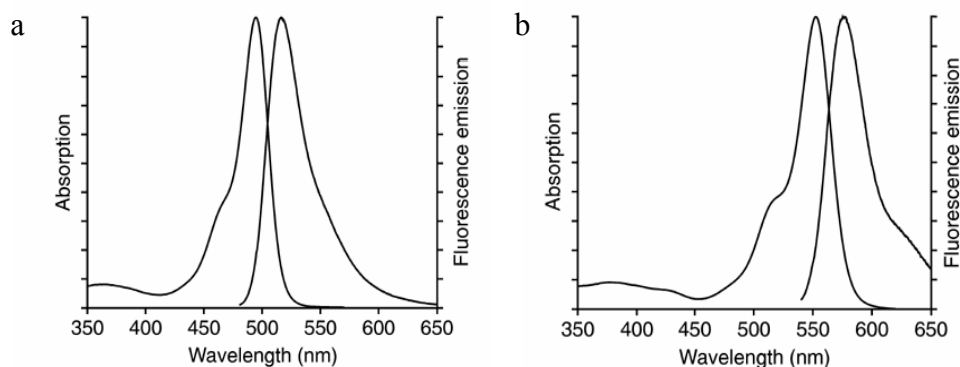


Fig.3 Spettri di assorbimento e di eccitazione delle sonde FLUO-4 (a) e RHOD-2 (b)

Il limite dell'utilizzo di questa sonda è rappresentato dal fatto che essa è normalmente impiegata in esperimenti in cui si vuole valutare la variazione di concentrazione intracellulare di calcio $[Ca^{2+}]_i$ a livello mitocondriale. Per fare questo è necessario incubare le cellule con questo colorante a temperatura ambiente. Eseguendo invece l'incubazione a 37 °C si dovrebbe evitare il caricamento dei mitocondri, anche se non si possono escludere eventuali fenomeni di contaminazione.

Un secondo limite relativo all'utilizzo di queste due sonde è relativo al fatto che esse non sono sonde raziometriche. Le sonde raziometriche sono in grado di emettere luce fluorescente a due differenti valori di λ a seconda che siano legate o meno a ioni calcio. E' possibile ottenere un valore numerico risultante dal rapporto tra l'intensità della radiazione luminosa emessa dalla sonda quando non è legata al calcio e quella emessa quando la stessa interagisce con questo ione bivalente. Questo valore risulta essere molto importante nella valutazione delle condizioni di caricamento della cellula con la sonda in esame. Se la sonda non è raziometrica, non si riesce ad esempio a distinguere tra condizioni in cui la cellula contiene una quantità modesta di colorante, e quindi l'intensità della fluorescenza risulta

ridotta, e condizioni in cui la cellula contiene una bassa $[Ca^{2+}]_i$ ma una normale quantità di colorante fluorescente ed i valori di intensità fluorescente sono ugualmente modesti.

I miociti neonatali di ratto vengono utilizzati in un periodo, successivo alla dissociazione, compreso tra uno e tre giorni. Essi vengono caricati con il colorante fluorescente ($5\mu M$) in una soluzione fisiologica (Ringer K^+ : HEPES 10mM, Glucosio 5mM, NaPiruvato 5mM, KCl 121 mM, $NaHCO_3$ 4,013 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, $MgCl_2$ 1,8 mM; pH 7,40 con NaOH) a $37^\circ C$.

Trascorsi 30 minuti, si effettua un lavaggio e si attendono altri 30 minuti prima di iniziare l'esperimento.

In esperimenti condotti in assenza di calcio nel mezzo extracellulare, prima di iniziare l'esperimento si sostituisce la soluzione extracellulare con una soluzione simile ma priva di calcio e contenente EGTA ($100\mu M$).

Le cellule vengono quindi disposte sotto un microscopio rovesciato (Nikon Eclipse) racchiuso in una gabbia di Faraday ed osservate mediante un obiettivo ad immersione a olio (63x). Le immagini vengono acquisite mediante un telecamera (Sensicam QE, Photoline) e l'utilizzo di un software di acquisizione di immagini (Metafluor).

Gli esperimenti sono condotti a temperatura ambiente ed al buio.

Il dispositivo di cambio di soluzione è rappresentato da un puntale collegato con differenti tubi a loro volta connessi a siringhe contenenti le soluzioni utilizzate per stimolare le cellule in esame. Mediante l'utilizzo di un micromanipolatore si posiziona il puntale nelle immediate vicinanze della cellula prescelta; è quindi possibile regolare il flusso delle soluzioni all'interno di ciascuna siringa grazie alla presenza di specifiche "clips" che consentono di mantenere aperti o di chiudere i tubi ad esse collegati.

RISULTATI

EPAC e la modulazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti ventricolari neonatali di ratto

La stimolazione di EPAC in presenza di calcio nel mezzo extracellulare determina un aumento della frequenza dei transienti di calcio

In presenza di calcio nel mezzo extracellulare, i miociti neonatali di ratto utilizzati in questi esperimenti sono in grado di generare spontaneamente transienti di calcio la cui frequenza aumenta in seguito alla somministrazione del composto, analogo del cAMP, 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-o-Methyladenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate (8-CPT, Sigma), agonista selettivo di EPAC, alla concentrazione di $10\mu M$ (Fig.4)

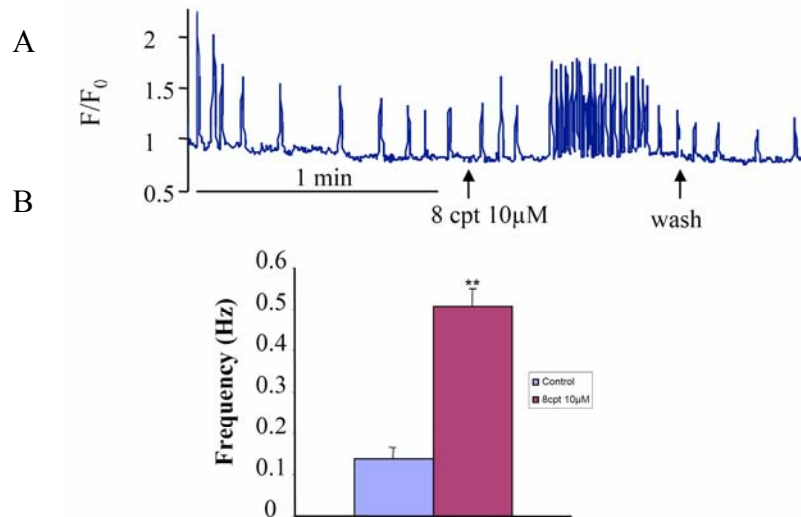


Fig.4 - A: time course della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore. Si osservi come la somministrazione di 8-CPT determini un aumento della frequenza dei transienti di calcio e come tale fenomeno sia reversibile

B: istogramma riassuntivo dell'effetto di 8-CPT ($10\mu M$) sulla frequenza dei transienti di calcio in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore. Gli esperimenti sono condotti in presenza di calcio nel mezzo extracellulare. In condizioni basali, la frequenza spontanea dei transienti di calcio di tali cellule è pari a $0,13\pm 0,02$ Hz ($n=7$); in presenza di 8-CPT essa aumenta in modo significativo (**: $p<0,01$) raggiungendo valori di $0,5\pm 0,04$ Hz ($n=7$).

I miociti neonatali presentano transienti di calcio la cui frequenza è aumentata dall'8-CPT anche in presenza di cesio e di calcio nel mezzo extracellulare

Prendendo spunto dal fatto che questo modello cellulare è caratterizzato dalla capacità di generare spontaneamente transienti di calcio e che l'attivazione di EPAC da parte di 8-CPT determina un aumento della loro frequenza, si è ipotizzato, in un primo momento, che EPAC potesse modulare la corrente pacemaker (I_f) di tali cellule. Tale corrente è infatti fondamentale nella modulazione del processo di sviluppo del ritmo cardiaco.

Pertanto, allo scopo di valutare se EPAC sia in grado di modulare la corrente I_f di tali cellule, sono stati condotti esperimenti in presenza di cesio (20 mM) nel mezzo extracellulare. E' infatti noto che questo catione bivalente è in grado di bloccare la corrente I_f .

Anche in queste condizioni sperimentali le cellule sono caratterizzate da variazioni spontanee della $[Ca^{2+}]_i$ e la somministrazione di 8-CPT determina un aumento della frequenza dei transienti di calcio (Fig.5).

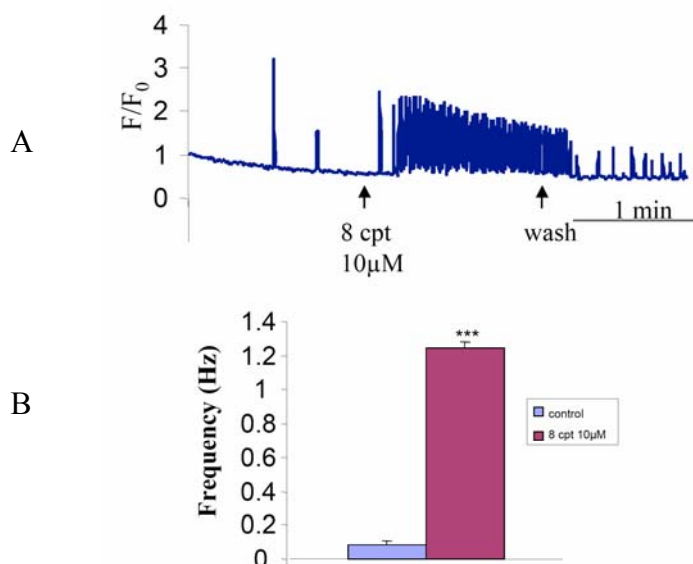


Fig.5 A: time course della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore. Si osservi come la somministrazione di 8-CPT determini un aumento della frequenza dei transienti di calcio anche in presenza di cesio nel mezzo extracellulare.

B: istogramma riassuntivo dell'effetto di 8-CPT ($10\mu M$) sulla frequenza dei transienti di calcio in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore ed in esperimenti condotti in presenza di calcio e cesio nel mezzo extracellulare. In condizioni basali, la frequenza spontanea dei transienti di calcio di tali cellule è pari a $0,08\pm 0,02$ Hz ($n=8$); in presenza di 8-CPT essa aumenta in modo significativo (***) raggiungendo valori di $1,25\pm 0,03$ Hz ($n=8$).

In assenza di calcio nel mezzo extracellulare l'attivazione di EPAC determina la comparsa di transienti di calcio conseguenti al rilascio di tale ione dal reticolo sarcoplasmatico

Esperimenti condotti in assenza di calcio nel mezzo extracellulare ed in presenza di EGTA ($100\mu M$), chelante del calcio utilizzato per garantire l'assenza di tale ione nel mezzo extracellulare, evidenziano come l'effetto di EPAC sia almeno in parte dovuto al rilascio di calcio dai compartimenti intracellulari, in particolare dal reticolo sarcoplasmatico. In queste condizioni sperimentali i miociti non presentano praticamente più un'attività basale spontanea e l'effetto dell'8-CPT è evidenziabile a concentrazioni pari a $100\mu M$ (Fig.6)

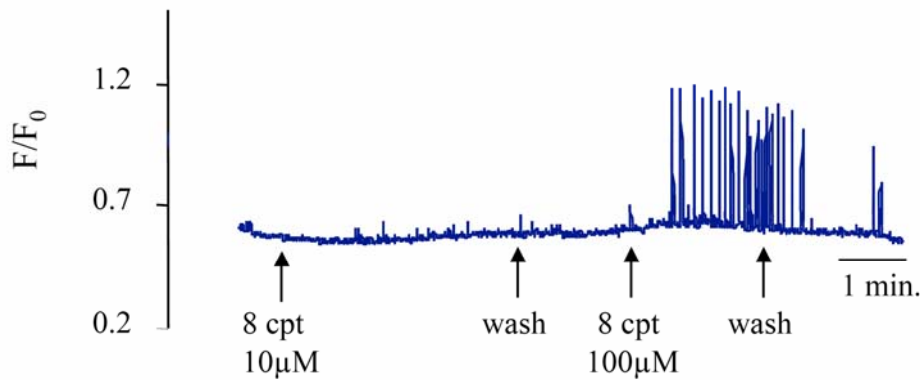


Fig.6 Time course della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti neonatali mantenuti in coltura per 24 ore. Si osservi come la somministrazione di 8-CPT a valori di concentrazione pari a $10\mu M$ non determini alcun effetto, mentre l'8-CPT a concentrazioni pari a $100\mu M$ determini la comparsa di transienti di calcio anche in assenza di tale ione dal mezzo extracellulare.

Per valutare se anche a questi valori ($100\mu M$) di concentrazione l'8-CPT non sia responsabile dell'attivazione di PKA, proteina che, come è noto, risulta anch'essa attivata dal cAMP, sono stati condotti esperimenti in presenza di H89 ($1\mu M$), inibitore dell'attività di PKA. In queste condizioni sperimentali, è stato osservato che la somministrazione di 8-CPT determina un aumento della frequenza dei transienti di calcio e che tale effetto è indipendente dall'attività fosforilativa della PKA (Fig.7).

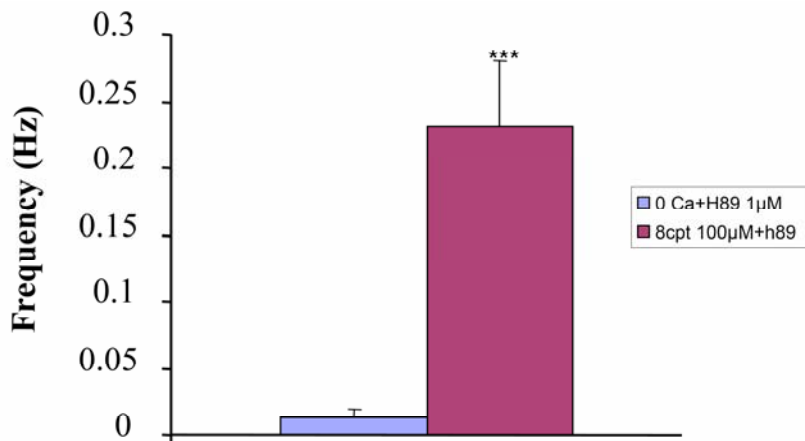


Fig.7 - Istogramma riassuntivo dell'effetto di 8-CPT ($100\mu M$), in presenza di H89, sulla frequenza dei transienti di calcio in miociti neonatali mantenuti in coltura per 24 ore. Gli esperimenti sono condotti in assenza di calcio ed in presenza di EGTA nel mezzo extracellulare. In condizioni basali tali cellule non evidenziano praticamente un'attività spontanea, infatti la frequenza dei transienti di calcio è pari a $0,0125\pm 0,0068$ Hz ($n=8$); in presenza di 8-CPT essa aumenta in modo significativo (***) raggiungendo valori di $0,23\pm 0,049$ Hz ($n=8$)

Esperimenti condotti su cellule infettate con costrutti adenovirali ed in grado di sovraesprimere la proteina EPAC, non hanno evidenziato sostanziali differenze in termini di effetti conseguenti alla somministrazione di 8-CPT ed anche in queste condizioni sperimentali si può osservare un effetto di tale agonista solo a concentrazioni pari a $100\mu M$.

In esperimenti successivi si è tentato di comprendere secondo quale modalità EPAC è in grado di determinare fenomeni di rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico; si è pertanto ipotizzato un'interazione di tale proteina con i recettori rianodinici. Esperimenti condotti in presenza di Rianodina (100 μ M), inibitore dei recettori rianodinici, evidenziano come, in queste condizioni sperimentali, la somministrazione di 8-CPT (100 μ M) sia seguita da un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ che permane per tutta la durata dello stimolo (Fig.8) a differenza di quanto osservato negli esperimenti precedenti in cui la somministrazione di 8-CPT determina aumenti dei valori di $[Ca^{2+}]_i$ che sono ripetuti e transitori.

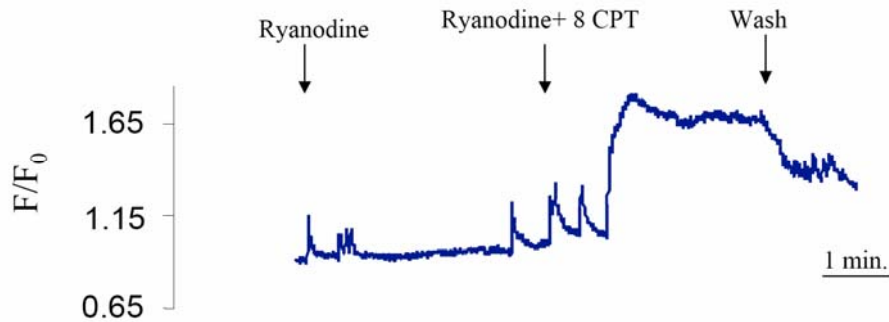


Fig.8 - Time course della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore. Si osservi come la somministrazione di 8-CPT, preceduta da un trattamento con Rianodina della durata di circa 5 minuti, determini un aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$

I risultati degli esperimenti condotti pretrattando le cellule con Rianodina, hanno fatto ipotizzare che l'8-CPT potesse interagire con l'attività della SERCA, inibendola; per questo motivo sono stati condotti ulteriori esperimenti sostituendo l'8-CPT con un inibitore specifico e reversibile della SERCA, noto con il nome di 2,5-Di (Ter-Butyl)-1,4-Benzohydroquinone (tBuBHQ, 100 μ M) (Fig.9). In queste condizioni sperimentali, è stato osservato che l'inibizione concomitante dei recettori rianodinici e della SERCA determina un aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$ secondo una cinetica paragonabile a quella osservata in Figura 8.

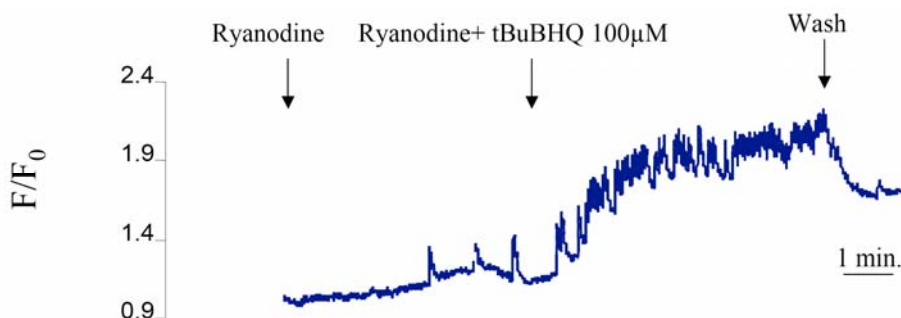


Fig.9 - Time course della variazione della $[Ca^{2+}]_i$ in miociti neonatali mantenuti in coltura per 48 ore. Si osservi come la somministrazione di t-BuBHQ, preceduta da un trattamento con Rianodina della durata di circa 5 minuti, determini un aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$. Tale fenomeno risulta paragonabile a quello che si osserva in Fig.15

DISCUSSIONE

Il lavoro è stato svolto in Francia, nel laboratorio di “Cardiologia cellulare e molecolare”, INSERM U-446 (Prof. R.Fischmeister), sotto la supervisione del Dr. Gregoire Vandecasteele, ed ha avuto come obiettivo quello di valutare se la proteina EPAC, probabilmente coinvolta in fenomeni ipertrofici cardiaci, fosse in grado di modulare segnali di calcio in miociti cardiaci neonatali di ratto.

Esperimenti preliminari hanno infatti evidenziato come l’attivazione di EPAC determinasse, in questo modello cellulare, un aumento delle dimensioni cellulari e del numero dei filamenti di actina e come stimolasse l’attività trascrizionale di alcuni geni, quali l’ANF (Atrial Natriuretic Factor), considerati marcatori dell’insorgenza di fenomeni ipertrofici (dati non mostrati).

I primi esperimenti condotti hanno evidenziato come, in presenza di calcio nel mezzo extracellulare, tali cellule fossero in grado di generare spontaneamente dei transienti di calcio e come la frequenza di tali transienti risultasse aumentata in seguito alla somministrazione di 8-CPT, agonista, considerato selettivo, di EPAC. Questi primi risultati hanno fatto ipotizzare che EPAC, modulando la frequenza dei transienti di calcio, potesse modulare la corrente pacemaker cardiaca (If); per questo motivo sono stati condotti esperimenti in presenza di cesio nel mezzo extracellulare. In queste condizioni sperimentali si è evidenziato ancora l’effetto di EPAC sulla frequenza dei transienti di calcio e si è esclusa una modulazione della corrente If da parte di tale proteina.

Rendendosi necessaria la semplificazione del nostro modello sperimentale, in cui le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ potevano dipendere da fenomeni di ingresso di calcio attraverso i canali ionici sarcolemmali o da fenomeni di rilascio di calcio dai compartimenti intracellulari, rappresentati, ad esempio, dal reticolo sarcoplasmatico o dai mitocondri, si è deciso di valutare gli effetti di EPAC sulla modulazione della $[Ca^{2+}]_i$ in assenza di calcio nel mezzo extracellulare. Occorre sottolineare che, in queste condizioni sperimentali, si genera un elevato gradiente di calcio tra l’interno e l’esterno della cellula che favorisce un flusso di tale ione nell’ambiente extracellulare ed un graduale svuotamento di calcio dai compartimenti interni; questo fenomeno spiegherebbe perché, quando tale ione non è presente nel mezzo extracellulare, è necessario aumentare di 10 volte (da 10 a 100 μ M) la concentrazione dell’agonista 8-CPT per poter osservare ancora un effetto di EPAC sulla modulazione dell’omeostasi intracellulare di calcio.

Concentrazioni così elevate di 8-CPT hanno d’altronde fatto sorgere dei dubbi riguardo alla specificità d’azione di tale composto. Come già sottolineato nei capitoli precedenti, esso è un analogo del nucleotide ciclico cAMP e, in quanto tale, potrebbe essere in grado di attivare anche la PKA, chinasi anch’essa attivata dal legame con il cAMP. Partendo da queste considerazioni, si è ritenuto opportuno valutare l’effettiva selettività dell’8-CPT e sono stati quindi condotti esperimenti in presenza di H89, inibitore della PKA. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l’effetto osservato risulta essere indipendente dall’attività di PKA.

Esistono prove in letteratura che dimostrano come, in condizioni di ipertrofia, si realizzino modificazioni funzionali a carico di numerose strutture sub-cellulari; a livello del reticolo sarcoplasmatico, in particolare, l’aumento della corrente di “leak” attraverso i recettori rianodinici (Meissner G., 2004) determina un conseguente accumulo di calcio a livello citosolico. A questo fenomeno di aumento dei livelli citosolici di calcio contribuisce anche la SERCA (Zheng M., et al. 2004) che, in tali condizioni patologiche, riduce la propria funzionalità.

Partendo da queste considerazioni, esperimenti condotti inibendo i recettori rianodinici con Rianodina, hanno evidenziato come la stimolazione di EPAC da parte di 8-CPT fosse ancora seguita da un aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$ che si verificava, però, secondo una diversa cinetica: non si osservava più un aumento della frequenza dei transienti di calcio, ma piuttosto un aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$ che si manteneva per tutta la durata dello stimolo. Poiché la cinetica dell’aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$ cambia in presenza di Rianodina, si può innanzitutto ipotizzare il coinvolgimento dei recettori rianodinici; in secondo luogo, esperimenti successivi condotti in presenza di Rianodina e, contemporaneamente, di tBuBHQ, inibitore di SERCA, hanno evidenziato un effetto del tBuBHQ

comparabile a quello indotto dalla somministrazione di 8-CPT in presenza di Rianodina, permettendo di ipotizzare che EPAC fosse responsabile dell'inibizione di SERCA.

Volendo quindi ipotizzare un meccanismo d'azione di EPAC, responsabile dell'aumento dei valori di $[Ca^{2+}]_i$, si può immaginare che tale proteina agisca inibendo l'attività di SERCA; questo fenomeno determinerebbe un accumulo di calcio a livello citosolico e tale ione, legandosi ai recettori Rianodinici, favorirebbe il rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico.

Per poter confermare tale ipotesi, ulteriori esperimenti si renderanno comunque necessari. Sarà inoltre importante valutare il contributo di altri recettori presenti a livello del reticolo sarcoplasmatico, come i recettori per l'IP₃, e di altre strutture cellulari come i mitocondri.

BIBLIOGRAFIA

Balke CW, Shorofsky SR. (1998) Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* **37**, 290-299.

Bers DM, Ziolo MT. (2001) When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization. *Circ. Res.* **89**, 373-375.

Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. (2001) Rap1 signaling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 369-377.

Bos JL. (2003) Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 369-377.

Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, Martinez A, Maenhaut C, Bos JL, Genieser HG, Doskeland SO. (2003) cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J. Biol. Chem.* **278**, 35394-35402.

Clerk A., Pham F.H., Fuller S.J., Sahai E., Aktories K., Marais R., Marshall C., Sugden P.H. (2001) Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1173-1184.

Clerk A., Sugden P.H. (2000) Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res.* **86**, 1019-1023.

Daniels R.H., Bokoch G.M. (1999) p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci.* **24**, 350-355.

de Rooij J., Zwartkruis F.J.T., Verheijen M.H.G., Coll R.H., Nijman S.M.B., Wittinghofer A., Bos J. L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **293**, 474-477.

de Rooij, J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20829-20836.

Enserink; JM., Christensen, AE., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, HG., Doskeland, SO., Blank, JL., Bos, JL. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 901-906.

- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. (2003) Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 2003 **278**, 8279-8285.
- Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D.E., Graybiel A.M. (1998). A family of cAMP-binding that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- Maillet, M., Robert, S.J., Caquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J.L., Fischmeister, R., Lezoualc'h, F. (2003) Cross-talk between Rap1 and Rac regulates sAPP α secretion. *Nature Cell. Biol.* **5**, 633-639.
- Masahiro Doi MD et al. (2002) Propranolol prevents the development of heart failure by restoring FKBP 12.6-mediated stabilization of ryanodine receptors. *Circulation* **105**, 1374-1379.
- Molkentin JF. (2000) Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Cir. Res.* 2000 **87**, 731-738.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S. (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 805-811.
- Pracyk J.B., Tanaka K., Hegland D.D., Kim K.S., Sethi R., Rovira R., Blazina D.R., Lee L., Bruder J.T., Kovcsdi I., Goldshmidt-Clermont P.J., Irani K., Finkel T. (1998) A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **102**, 929-937.
- Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, Bos JL. (2003) Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the β 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol.* **160**,487-493.
- Rehmann, H. *et al.*. Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 26-32 (2003).
- Shmigol AV, Eisner DA, Wray S (2001) Simultaneous measurement of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic [Ca²⁺] in rat uterine smooth muscle cells. *J. Physiol.* 531:707-713.
- Sussman M.A., Welch S., Walker A., Klevitsky R., Hewett T.E., Price R.L., Schaefer E., Yager K. (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J. Clin. Invest.* **105**, 875-886.
- Ueno H, Shibasaki T, Iwanaga T, Takahashi K, Yokoyama Y, Liu LM, Yokoi N, Ozaki N, Matsukura S, Yano H, Seino S. (2001) Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. *Genomics* **78**, 91-98.
- Zheng M. et al. (2003) Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart *Am.J.Heart Circ.Physiol.* **286**, H424-H433

Andrea Marcantoni