

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare - XXXII ciclo

Relazione attività di ricerca (primo anno)

Studente di dottorato: Serena Governali

Tutor progetto di ricerca: Massimo Reconditi, Marco Linari

Titolo della ricerca: La regolazione della prestazione del cuore studiata tramite diffrazione a raggi X

INTRODUZIONE

Il muscolo striato, scheletrico e cardiaco, deve il suo nome all'apparenza di bande chiare e scure che mostra quando osservato al microscopio ottico. Le bande sono dovute alla ripetizione, nel senso della lunghezza della cellula muscolare, dell'unità strutturale del muscolo, il sarcomero. In ciascun sarcomero le proteine contrattili polimerizzano in due tipi di filamenti: il filamento sottile, contenente actina, e quello spesso, contenente miosina. I filamenti sottili sono ancorati alla linea Z, alle due estremità del sarcomero, e si interdigitano con quelli spessi che si dipartono dal centro del sarcomero. Dal filamento spesso emergono le cosiddette "teste" della miosina, che sono i motori molecolari responsabili della generazione di forza e accorciamento del muscolo tramite interazioni cicliche con il filamento di actina. In ogni interazione la miosina va incontro ad un working stroke, alimentato dall'idrolisi di una molecola di ATP, che tira il filamento di actina verso il centro del sarcomero. La contrazione è iniziata dalla depolarizzazione della membrana cellulare seguita dall'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} che, legandosi alle proteine regolatrici del filamento sottile, promuove l'esposizione dei siti di actina per l'interazione con i motori miosinici. Recentemente è emerso un secondo meccanismo di attivazione basato sulla meccanosensibilità del filamento di miosina che lega il reclutamento dei motori dallo stato di riposo, in cui giacciono sul filamento spesso senza alcuna attività ATPasica (Zoghbi et al *PNAS* **105**:2386, 2008; Hooijman et al *Biophys J* **100**:969, 2011), al carico contro cui si contrae il muscolo (Linari et al *Nature* **528**:276, 2015; Reconditi et al *PNAS* **114**:3240, 2017).

OBIETTIVI DELLA RICERCA

La mia attività di ricerca, durante il primo anno di dottorato, si è rivolta allo studio dei meccanismi molecolari che agiscono nella regolazione della contrazione cardiaca; in particolare ho investigato l'andamento temporale dello sviluppo della massima velocità di accorciamento (la velocità V_0 in assenza di carico). A differenza del muscolo scheletrico, dove V_0 è costante indipendentemente dalla forza sviluppata (T), nel muscolo cardiaco V_0 è ridotta nelle fasi iniziali della contrazione (twitch) fino a quando la forza raggiunge un valore soglia pari a circa il 40% della forza di picco della twitch (T_p), indicando la presenza di un carico che si oppone allo scorrimento alla massima velocità (Daniels et al *J Physiol* **355**:367, 1984; de Tombe e ter Keurs *J Physiol* **454**:619, 1992).

Con esperimenti di meccanica su trabecole isolate dal cuore di ratto, abbiamo valutato se e come interventi inotropici possano alterare la relazione tra V_0 e T . Come agente inotropico abbiamo utilizzato l'isoproterenolo (ISO), un farmaco simpatico-mimetico attivo sui recettori beta adrenergici, che induce la fosforilazione di proteine a seguito dell'attivazione della proteina chinasi A. Successivamente, gli esperimenti meccanici sono stati combinati con esperimenti di diffrazione a raggi X per individuare i correlati strutturali associati con le risposte meccaniche.

METODI

Gli esperimenti sono stati condotti su trabecole isolate intatte dal ventricolo destro del cuore di ratto. Nella trabecola i miociti sono allineati a formare una struttura grossolanamente cilindrica (lunghezza 2-3 mm, diametro 150-200 μm) adatta per il setup sperimentale già usato con successo negli esperimenti su cellule isolate dal muscolo scheletrico. Il cuore, isolato dal ratto anestetizzato con una miscela di isofluorano al 5% (vol/vol), viene posizionato in una vaschetta da dissezione e continuamente perfuso con una soluzione di Krebs-Henseleit modificata (composizione, in mM: NaCl, 115; KCl, 4.7, MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; CaCl₂, 1; glucosio, 10) ossigenata con oxicarb (95% O₂ e 5% CO₂). La trabecola, scelta in base alla sua uniformità e assenza di ramificazioni, è dissezionata dalla parete interna del ventricolo destro. Le sue estremità, costituite da una porzione di valvola atrio-ventricolare e dalla parete del ventricolo, sono strette con fascette di alluminio e bloccate da un doppio uncino di titanio che termina con un occhiello. La trabecola, mediante gli occhielli, è montata orizzontalmente fra le leve di un trasduttore di forza e di lunghezza nella vaschetta sperimentale termoregolata. I cambiamenti di lunghezza del sarcomero sono registrati con uno striation follower (Lombardi e Piazzesi *J Physiol* **431**:141, 1990; Huxley, Lombardi and Peachey *J Physiol* **317**:12-13P, 1981). Durante l'esperimento la trabecola è continuamente perfusa con soluzione fisiologica ossigenata con oxicarb e stimolata a 0.5 Hz alla temperatura di 27°C.

Gli esperimenti di diffrazione a raggi X sono stati eseguiti alla linea di luce ID02 del Sincrotrone Europeo ESRF a Grenoble (Francia). La vaschetta, modificata con l'aggiunta di due finestre mobili di mylar che vengono avvicinate alla trabecola per ridurre il cammino dei raggi X nella soluzione e chiusa con un coperchio sigillato con silicone, viene montata verticalmente sul cammino del fascio di raggi X. I diagrammi di diffrazione sono registrati su un rivelatore di tipo CCD (FReLoN, 2048x2048 pixels, area attiva 50x50 mm²).

Il protocollo sperimentale per gli esperimenti di meccanica consiste nel determinare, in condizioni di controllo e in presenza di ISO, V_0 a T_p con il metodo dello slack test (KAP Edman *J Physiol* **291**:143, 1979) in controllo di lunghezza del sarcomero (Caremani et al *PNAS* **113**:3675, 2016), alla lunghezza del sarcomero di 2.2 μm . Un rapido accorciamento (completo in 2 ms) di ampiezza variabile (ΔL , 8-15% della lunghezza iniziale della trabecola (L_0)), applicato a T_p , fa cadere la forza a zero. Il tempo necessario per il risviluppo di forza (Δt) è proporzionale a ΔL . La relazione tra ΔL e Δt è lineare e la sua pendenza è una misura di $V_{0,p}$ (Fig. 1A). Un accorciamento a rampa di ampiezza 10% L_0 (ΔL_{10}) e velocità V_0 viene applicato a tempi diversi durante lo sviluppo di forza, da zero a T_p . A tempi precoci, quando V_0 non ha ancora raggiunto il valore massimo $V_{0,p}$, compare un ritardo tra fine della rampa e tempo al quale la forza inizia a risvilupparsi ed il valore di V_0 è misurato dal rapporto tra ΔL_{10} e il tempo dall'inizio della rampa all'inizio del risviluppo di forza.

Negli esperimenti al sincrotrone i diagrammi di diffrazione sono stati raccolti durante l'accorciamento a V_0 imposto alla fine della latenza quando la forza è zero e a 0.4 T_p , quando V_0 ha raggiunto $V_{0,p}$ (distanza rivelatore-campione, 1.6 m) dopo aver aggiustato la lunghezza del sarcomero in diastole a 2.2 μm (distanza rivelatore-campione, 30 m).

RISULTATI

$V_{0,p}$ misurata in condizioni di controllo ($[\text{Ca}^{2+}]_0 = 1 \text{ mM}$, SL = 2.19 μm) con il metodo dello slack test (Fig. 1A) è $7.32 \pm 0.17 \text{ L}_0/\text{s}$ (media \pm SEM, 5 trabecole). La stessa velocità di accorciamento imposta subito dopo la latenza per prevenire lo sviluppo di forza a seguito dello stimolo (linea continua nel pannello in alto in Fig. 1B) risulta più grande di V_0 , come mostrato dal ritardo nello sviluppo di forza. Il tempo trascorso dall'inizio della rampa fino allo sviluppo di forza è circa due volte la durata della rampa, indicando che alla fine della latenza ($T=0$) V_0 è circa la metà di $V_{0,p}$ (linea tratteggiata nel pannello in alto in Fig. 1B). In cinque trabecole V_0 a $T=0$ è $3.69 \pm 0.16 \text{ L}_0/\text{s}$. Con l'aumentare di T , V_0 aumenta (cerchi neri in Fig. 1C), fino a diventare uguale $V_{0,p}$ per $T>0.4 T_p$, in accordo con i dati in letteratura (Daniels et al, 1984; de Tombe and ter Keurs, 1992). La

riduzione di V_0 a bassa forza è spiegata con la presenza di un carico viscoso. In presenza di ISO 10^{-7} M, che aumenta T_p di circa 2.5 volte il valore di controllo, il valore di $V_{0,p}$ non è significativamente diverso dal controllo ($7.14 \pm 0.25 L_0/s$), mentre V_0 a forza zero è circa il 45% più grande del controllo ($5.34 \pm 0.24 L_0/s$) e sale a $V_{0,p}$ per forze di circa 0.2 T_p (cerchi blu in Fig. 1C), indicando una riduzione del carico viscoso che limita V_0 .

Per individuare i correlati strutturali associati alla riduzione del carico viscoso in presenza di ISO, gli esperimenti di meccanica sono stati ripetuti alla linea di luce ID02 a ESRF, dove i diagrammi di diffrazione sono stati raccolti in diastole e durante l'accorciamento a V_0 imposto alla fine della latenza e a 0.4 T_p in condizioni di controllo e in presenza di ISO 10^{-7} M. I risultati preliminari indicano che le riflessioni meridionali M3 e M6, che originano rispettivamente dai motori miosinici e da strutture periodiche lungo filamento spesso, non subiscono cambiamenti significativi tra la condizione di controllo e in presenza di ISO. Questi risultati indicano che il carico viscoso responsabile della transitoria riduzione di V_0 non ha effetto sulla conformazione dei motori miosinici né sul grado di attivazione del filamento spesso.

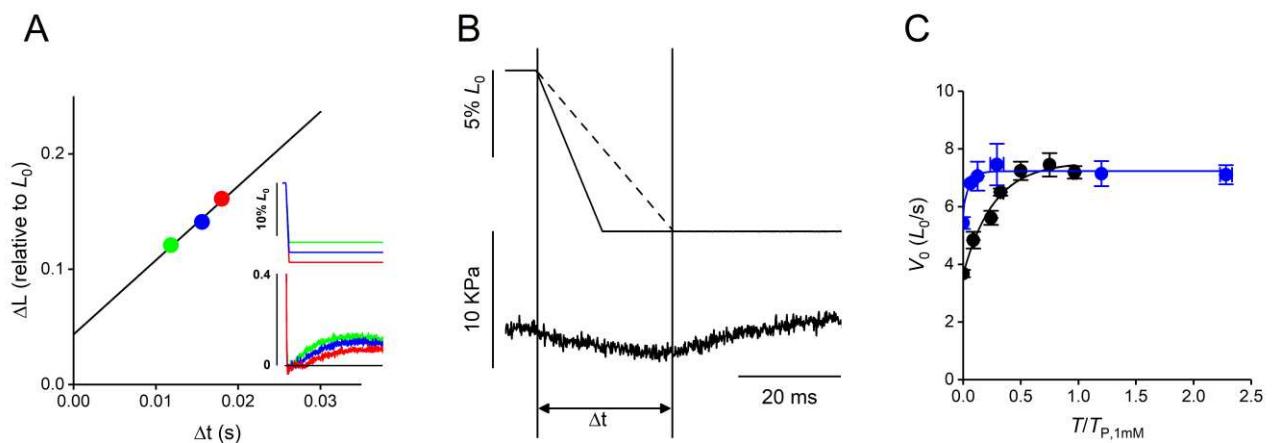


Figura 1. Misura di V_0 a diversi livelli di forza durante una twitch. A. Misura di $V_{0,p}$ (a T_p) in condizioni di controllo utilizzando il metodo dello slack test. Colori diversi si riferiscono a rampe di diversa ampiezza, come mostrato nell'inserto. $V_{0,p}$ è misurata dalla pendenza della retta di regressione (linea nera). B. Una rampa di velocità $V_{0,p}$ e ampiezza $10\% L_0$, viene applicata subito dopo la fine della latenza quando la forza è zero (linea continua), inducendo un ritardo nello sviluppo di forza che si protrae per un tempo significativo dopo la fine della rampa, indicando che in questo caso V_0 (rappresentato dalla linea tratteggiata) è molto minore di $V_{0,p}$. C. Dipendenza di V_0 dal livello di forza sviluppato durante la twitch in condizioni di controllo (cerchi neri) e in presenza di ISO (cerchi blu). I valori di forza sono relativi al controllo.

CONTRIBUTI A CONGRESSI

- F. Pinzauti, M. Caremani, S. Governali, J.D. Powers, M. Reconditi, T. Narayanan, G.J.M. Stienen, M. Linari, V. Lombardi, G. Piazzesi. The off state of thick filament is not affected by inotropic interventions like the increase in diastolic sarcomere length or the addition of a β -adrenergic effector. *62nd Annual Meeting Biophysical Society*, San Francisco, CA, February 17-21, 2018.

PARTECIPAZIONE A CONVEGNI E SEMINARI

- Giornata Dottorale 2017 (Docenti: Meneghetti M. L., Frati F., Lupetti P., Benfenati F., Amabile S., Roscino C.), Siena, 2 Febbraio 2017.
- Spin off e start-up della ricerca (Docenti: Francesco Senatore e Lorenzo Zanni), Siena, 13-14 Giugno 2017.
- Scientific Writing and Presentation (Docente: John L. Telford), Siena, 20-21 Giugno 2017.
- La certificazione dei processi nel settore delle life sciences (Docente: Pierpaolo Mugnaini), Siena, 23 Giugno 2017.

- Il sistema di ricerca europeo: project design e gestione progetti, Siena, 9 Ottobre 2017.
- 11th Meeting of Young Researchers in Physiology, Firenze, 25-27 Maggio 2017.