

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dottorato di Ricerca

in

**FISIOPATOLOGIA CLINICA
E MEDICINA SPERIMENTALE**

XXVIII Ciclo

Indirizzo: Endocrino - Metabolico

**GRK2 svolge un ruolo cruciale nella regolazione dei
meccanismi di recupero mitocondriale
attivati dall'esposizione a radiazioni ionizzanti**

Relatore

Ch.mo Prof.

Bruno Trimarco

Candidato

Dott.ssa Antonietta Franco

Triennio Accademico 2013-2016

a mio Nonno

quando ci metti l'anima tutto prende forma...

INDICE

ABSTRACT	1
INTRODUZIONE	3
SCOPO	6
MATERIALI E METODI	7
2.1 STUDI IN VIVO	7
2.2 ECOCARDIOGRAFIA	7
2.3 COLTURA CELLULARE	7
2.4 TRASFEZIONE CELLULARE	7
2.5 SIRNA TRASFEZIONE	8
2.6 IMMUNOPRECIPITATO E WESTERN BLOT	8
2.7 ESTRATTI MITOCONDRIALI	9
2.8 ESTRATTI DI MEMBRANA PLASMATICA	10
2.9 CITOFUORIMETRIA	11
2.10 RT-PCR	11
2.11 SAGGIO METABOLICO	12
2.12 MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE	12
2.13 TEST DELLA CHINASI	13
2.14 ANALISI STATISTICA	13

RISULTATI	14
3.1 ANIMALI ESPOSTI AD UNA DOSE SINGOLA DI STRESS DI RADIAZIONI IONIZZANTI (RAGGI X, 4GY)	14
3.2 COMPARTIMENTALIZZAZIONE DI GRK2 IN RISPOSTA ALLO STRESS	15
3.3 MORFOLOGIA E FUNZIONE MITOCONDRIALE IN RISPOSTA ALL' IR IN CELLULE HEK-293	17
3.4 RUOLO DI GRK2 NELLE FUNZIONI MITOCONDRIALI	18
3.5 RUOLO DI GRK2 NELLA MORFOLOGIA MITOCONDRIALE	20
3.6 GRK2 E LA FUSIONE MITOCONDRIALE	20
3.7 SIRNA HSP90 ALPHA/BETA NELLA FUNZIONE MITOCONDRIALE	22
DISCUSSIONE	23
ABSTRACT IN ENGLISH	27
FIGURE E LEGENDA	29
BIBLIOGRAFIA	1

Abstract

Una radiazione nell'area del mediastino può determinare alterazioni cardiache nei pazienti sottoposti a radioterapia. Ad oggi, per questi pazienti, non si conosce ancora la dose di radiazione necessaria minima per il cuore, in quanto una radiazione può determinare alterazioni nella contrattilità, ed in particolare determinare danno ai singoli cardiomiociti e alle sue componenti subcellulari. Una radiazione per definizione, determina un aumento della produzione di radicali liberi dell'ossigeno ROS in pochi minuti dall'evento acuto, in maniera diretta se interagisce direttamente sul DNA, che in maniera indiretta interagendo con le proteine cellulari. Una quota di questi radicali sono fisiologicamente prodotti dai mitocondri per generare ATP, che in particolare nel cardiomiocita svolgono un ruolo cardine per fornire energia sufficiente alla forza contrattile. I ROS nella cellula fungono un ruolo di secondi messaggeri, ed in particolare essi determinano la regolazione di molte proteine, una di queste è GRK2. GRK2 è una proteina ubiquitaria che appare essere sensibile alle risposte dello stress cellulare attraverso l'interazione con diverse chaperonine, come HSP90. Tuttavia il ruolo di GRK2 non è ancora chiaro in risposta allo stress. Per valutare il ruolo di GRK2 sulle risposte allo stress da X-Ray nel cuore abbiamo esposto a singole radiazioni i topi C57BL / J6 ed abbiamo eseguito una valutazione ecocardiografia transtoracica a 3 e 24 ore dopo la radiazione per valutare la funzione cardiaca. L'ecocardiografia ha mostrato che a 3 ore dopo la radiazione la camera ventricolare sinistra era dilatata e la funzione di eiezione (EF%) e le frazioni accorciamento (FS%) erano ridotte in risposta acuta allo stress rispetto a sham. A 24 ore dalla radiazione la funzionalità cardiaca era recuperata. L'Analisi di Wester Blot sui cuori dopo l'irradiazione ha mostrato una diversa

localizzazione subcellulare di GRK2 a 3 e 24 ore. Inoltre la localizzazione subcellulare di GRK2 è stata valutata anche su cellule e successivamente abbiamo valutato la morfologia mitocondriale tramite TEM e la funzionalità mitocondriale. A 3 ore da irradiazione abbiamo osservato che GRK2 è localizzata principalmente nelle membrane ed è ridotta nei mitocondri, e con una conseguente riduzione della massa mitocondriale e quindi un aumento di ROS, mentre le immagini di microscopia mostrano alterazioni mitocondriale con mitocondri vacuolizzati. Ad 8 ore dalla radiazione, abbiamo osservato che GRK2 si accumula nel mitocondriale ed il fenotipo mitocondriale e la funzione viene recuperato. Per capire se la localizzazione di GRK2 è essenziale per la risposta mitocondriale dopo irradiazione, abbiamo regolato i livelli di GRK2 tramite (Si-RNA) ed overespressione (pc-DNA-GRK2). 3 dopo dalla radiazione in cellule con overespressione di GRK2, non abbiamo valutato modifiche nella morfologia mitocondriale e nella funzione mitocondriale. Al contrario il silenziamento di GRK2 mostra una riduzione della massa mitocondriale a 3 ed 8 ore, così come la produzione di ROS mitocondriale che risultano essere aumentati a 3 e 8 ore dopo l'esposizione. Questi dati suggeriscono che la localizzazione subcellulare di GRK2 è regolata in modo dipendente dal tempo in risposta allo stress radiazioni, ed è associata con la modifica della funzione mitocondriale e nella regolazione del quality control mitocondriale.

Introduzione

Le malattie cardiovascolari e il cancro sono le due principali cause di mortalità e morbidità nel mondo occidentale (1). Mentre queste condizioni sono generalmente studiate separatamente, recenti studi epidemiologici condotti in pazienti in trattamento per radioterapia (RT) (2, 3), hanno evidenziato un aumento del rischio cardiovascolare (CV), dove la morbidità cardiovascolare può avvenire entro mesi o anni dopo l'esposizione iniziale alle radiazioni ionizzanti (IR) (4). Infatti, malattie neoplastiche, come il linfoma di Hodgkin (HL) o il carcinoma della mammella, in cui i pazienti sono generalmente sottoposti a RT (radioterapia), un'importante causa di morte è rappresentata da complicazioni cardiovascolari (5, 6). L'irradiazione del mediastino e il danno indotto può coinvolgere le diverse parti strutturali ed anatomiche del cuore (miocardio, endocardio, pericardio, vasi coronarici, valvole), ed in particolare, il cardiomiocita (CM) che rappresenta l'unità funzionale contrattile cardiaca (7). Lo studio delle risposte molecolari e funzionali del CM indotte, pertanto, fondamentali per la comprensione dei meccanismi alla base della cardiomiopatia indotta dalle radiazioni ionizzanti (8). Una radiazione ionizzante per definizione determina un trasferimento di energia e quindi può indurre danno cellulare sia direttamente sul DNA che indirettamente attraverso la generazione immediata di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) interagendo con le proteine cellulari (9). Tuttavia altri eventi precoci molecolari possono avvenire anche in altri compartimenti cellulari / organelli in risposta alla radiazione ionizzante in grado di modificare il destino della cellula (10). Ad esempio, una IR (radiazione ionizzante) può interagire con sfingolipidi di membrana e dare origine a secondi messaggeri quali diacil-glicerolo (DAG) e fosfoinositidi (PIP2 / PIP3) e trasferire un segnale apoptotico

nella cellula(11, 12) . Altri organelli come i mitocondri possono essere considerati bersagli diretti delle radiazioni ionizzanti. Alterazioni della struttura e della funzione dei mitocondri sono comunemente osservati in cellule irradiate (13-15). Allungamento e ramificazione dei mitocondri, e un aumento reversibile della loro dimensione sono i più frequenti cambiamenti dopo IR in diversi tessuti e sistemi cellulari (16, 17). Tuttavia, IR produce anche modifiche funzionali rilevanti nei mitocondri in particolare sulla produzione di ROS mitocondriali (18, 19). Questi sono continuamente prodotti in una quantità relativamente elevata in condizioni fisiologiche soprattutto nel mitocondrio nella respirazione mitocondriale per generare ATP, necessari per generare l' energia contrattile cardiaca, tuttavia, la loro concentrazione aumenta notevolmente in risposta alla IR (20, 21). I ROS sono generalmente considerati deleteri per la sopravvivenza cellulare, ma anche loro possono promuovere il processo cellulare utile di recupero come la mitohermesis, definita come la sostituzione e organizzazione della rete mitocondriale (22, 23), ed e' probabilmente coinvolta nella cellula il recupero dopo un'esposizione acuta a radiazioni(24-26). Di conseguenza, diversi livelli di ROS in risposta allo stress hanno un impatto diverso sulla sopravvivenza delle cellule e possono anche promuovere la riparazione mitocondriale attraverso i processi fissione e fusione noti anche come meccanismi di controllo della qualità mitocondriale, meccanismo noto come dinamismo mitocondriale (27-29). Diverse molecole sono in grado di localizzarsi a livello mitocondriale e regolare la produzione di ROS in risposta allo stress (30, 31). Tra questi, la proteina G del recettore accoppiato chinasi di tipo 2 (GRK2) ha un ruolo ben riconosciuto nella fisiopatologia dello scompenso cardiaco(32). Questa chinasi è principalmente una proteina citosolica ma è in grado di compartimentalizzare in diversi organelli subcellulari in risposta a vari

stimoli (33, 34). In particolare, GRK2 localizza a livello mitocondriale in risposta a fattori di stress quali appunto l'ischemia, ma il suo ruolo specifico nella regolazione della funzione mitocondriale è ancora dibattuto (35).

In questo studio, abbiamo osservato che la disfunzione cardiaca dopo un IR di esposizione acuta da raggi X (4 Gy= 1J/kg) nei topi è accompagnata da alterazioni mitocondriali, che sono recuperati entro le 24 ore. Inoltre, attraverso studi in vitro, abbiamo dimostrato il ruolo centrale di GRK2 nella regolazione dei meccanismi di controllo della qualità mitocondriale attraverso la sua interazione con mitofusin-1 e 2 (MNF 1-2), molecole GTPase di membrane mitocondriale esterna chiave nei processi di fissione e fusione mitocondriale e quindi responsabili del recupero mitocondriale (36, 37).

Scopo

Valutazione della disfunzione cardiaca dopo singola dose da radiazione ionizzante. Inoltre, attraverso studi *in vitro*, valutare il ruolo centrale di GRK2, in risposta a *stress* da radiazione, nella regolazione dei meccanismi di controllo della qualità mitocondriale attraverso l'interazione con mitofusin-1 e 2 (MNF 1-2), molecole GTPase responsabili del recupero mitocondriale.

Materiali e Metodi

2.1 Studi in vivo

Gli esperimenti sono stati effettuati su topi C57BL / J6 di 12 settimane. Gli animali sono stati esposti a singola dose di radiazione total body a temperatura ambiente (Sham e 4 Gy) e sacrificati a 3 e 24 ore dopo l'irradiazione .

2.2 Ecocardiografia

I topi C57BL / J6 sono stati anestetizzati con (2% isoflurano vaporizzato nel 98% di ossigeno), l'ecocardiografia transtoracica è stata eseguita a 3 ore e 24 ore dopo l'irradiazione con un sistema di imaging highresolution dedicato piccoli animali (VEVO 2100, VisualSonics, Inc).

2.3 Coltura cellulare

Cellule HEK-293 sono state coltivate in terreno con Dulbecco minimo essenziale (DMEM) e 25 mM di glucosio supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS) a 37 ° C in 95% di aria e 5% di CO₂.

2.4 Trasfezione cellulare

Trasfezione cellulare è stata effettuata con lipotrasfezione (Lipofectamine 2000 Invitrogen) con 2 mg di DNA plasmidico secondo le istruzioni del protocollo. Per le selezioni clone trasfettate stabili, dopo il 24 a 48 ore medie di cellule è stato integrato con G418, (500 mg / ml) per due settimane. La cella G418-resistenti sono state coltivate in un mezzo integrato con G418 ad una concentrazione finale di 250 mg / ml e

esaminato per sovraespressione di GRK2 (HEK-293 GRK2) tramite western blot analisi, utilizzando anticorpi specifici, (SantaCruz Biotechnology).

2.5 SiRNA trasfezione

(Si-RNA) per GRK2 e Scamble utilizzato come controllo per tutti gli esperimenti siRNA (IDT Integrated Technologies DNA). (SiRNA GRK2: 5'-CUCCAGCUUCUCGUAUUUCUUTT-3' 'Scamble GRK2: 5'-UGUCGAUCUCAUGCUUGUCUUTT-3'). SiRNA HSP90 α / β (Santa-Cruz Biotechnology). I rispettivi siRNA e controlli sono stati trasfettate secondo le istruzioni del protocollo. Dopo 48 a 72 h le cellule sono state analizzate per K.O. di HSP 90 α / β e GRK2 tramite Westren Blot utilizzando anticorpi specifici (SantaCruz Biotechnology).

2.6 Immunoprecipitato e Western Blot

Le cellule ed i cuori sono stati lisati in RIPA / tampone SDS [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0, 25% desossicolato, 9,4 mg / 50 ml orthovanadate sodio, 20% SDS]. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit assay BCA (Pierce). Endogena Mnf 1-2 e HSP90 α / β o GRK2 da estratti totali sono stati immunoprecipitati con anticorpi specifici (Santa Cruz) e proteina A / G agarosio (Santa Cruz). Dopo ampi lavaggi con PBS, i immunocomplessi sono stati corsi tramite elettroforesi SDS / PAGE e trasferite su nitrocellulosa; MNF 1-2, HSP90 α / β o GRK2 sono stati visualizzati da anticorpo specifico (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse anticorpo secondario HRP-coniugato (Santa Cruz Biotechnology) e visualizzati tramite chemiluminescenza standard (Pierce). Il lisato totale è stato utilizzato come controllo positivo. Come

controllo negativo, il test è stato eseguito usando un anticorpo non specifico della stessa specie dell'anticorpo IP. Per l'analisi Western Blot, le cellule sono state lisate in tampone RIPA / SDS [50 mmol / L Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol / L NaCl, 0,01 g / L NP-40, 0,0025 g / L deoxycholate, 2 mmol / L Na₃VO₄, 0,2 g / L di sodio dodecilsolfato e proteasi Inhibitor cocktail (SIGMA)]. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit di test BCA (Pierce), la stessa quantità di estratti cellulari totali sono stati corsi per elettroforesi su 4-12% SDS-PAGE gel e trasferite in Immobilon P filtro di nitrocellulosa (Millipore Corporation). Le membrane sono state bloccate in Tris tamponata salina contenente 0,002 g / l di Tween 20 (TBST) e latte in polvere 0,05 g / l senza grassi. Dopo il blocco, le membrane sono state lavate tre volte in TBST e poi incubate overnight a 4 ° C in TBST contenente 5% BSA con uno specifico anticorpo primario: Gli anticorpi anti Mnf 1-2, actina e GRK2 erano da Santa Cruz Biotechnology, Inc . 3 esperimenti indipendenti sono stati quantificati e corretti per un adeguato controllo di carico. L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software immagine Quant (Molecular Dynamics, Inc). I risultati sono riportati come media \pm SEM.

2.7 Estratti Mitocondriali

Le cellule ed i cuori sono stati lavati in tampone fosfato ghiacciato (PBS) e tramite Dounce omogeneizzazione in tampone isolamento [saccarosio IB pH 7.4 200 mM, 1 mM EGTA-Tris e 10 Tris-MOPS MM]. L'omogenato è stata filata a 800 g per 10 min; il supernatante è stato recuperato e ulteriormente centrifugato per 10 min a 8000 g. Il pellet risultante (frazione mitocondriale) è stato raccolto mentre il surnatante è stato ulteriormente filata per 30 min a 100.000 g per ottenere la frazione

citosolica, attraversato nuovamente a 100.000 g per purificare ulteriormente la frazione. La frazione mitocondriale è stato ulteriormente purificato mediante centrifugazione a 8000 g per due volte per 10 min. Il pellet ottenuto è stato purificato per centrifugazione a 95.000 g per 30 min su un gradiente di Percoll 30% in IB. Lo strato mitocondriale ottenuto venne lavato libera di Percoll e risospeso in IB. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio bichinonnate (Pierce). Citosol e mitocondri estratti sono stati confermati da Western Blot analisi, come precedente descritto l'uso di anticorpi specifici (Santa Cruz Biotechnology). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software immagine Quant (Molecular Dynamics, Inc). I risultati sono riportati come media \pm SEM.

2.8 Estratti di Membrana plasmatica

Per l'isolamento delle membrane plasmatiche, le cellule e i cuorei sono stati omogeneizzati in tampone contenente 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, fluoruro phenylmethylsulfonyl 1mM, 2 mg / ml ogni leupeptina e aprotinina. In esperimenti che richiedevano il rilevamento di fosfo-proteine lisi buffer contengono anche inibitori fosfatasi (Sigma). Cellule intatte e nuclei sono stati spostati per centrifugazione a 1000 g per 15 min (38). Il supernatante raccolto era inoltre vincolata ad una centrifugazione a 38.000 xg per 1 ora. Il pellet è stato risospeso in tampone di lisi (1% Nonidet P-40, 10% glicerolo, 137 mM NaCl, 20 TrisHCl mM (pH 7,4), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoruro, 20 NaF mM, 1 mM sodio pirofosfato, 1 mM orthovanadate sodio, e 2 mg / ml ciascuna aprotinina e leupeptina) e utilizzato come frazione di membrana plasmatica, e il surnatante è stato utilizzato come frazione

citostolica. Frazioni citostolica e frazione di membrana sono stati confermati da Western Blot analisi, come precedente descritto utilizzando anticorpi specifici per GRK2 (SantaCruz). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software immagine Quant (Molecular Dynamics, Inc). I risultati sono riportati come media \pm SEM.

2.9 Citofluorimetria

Le cellule sono state incubate a 37 ° C, 95% di aria e 5% di CO₂, per 30 minuti con 5 nM Mitotracker (basata Rosamine Mitotracker dye-Invitrogen) per identificare mitocondri, 5 μ M (indicatore rosso mitocondriale superossido) MitoSOX identificare Ros produzione mitocondri , 100nM TMRE (Tetramethylrodamide, etil, Ester) per identificare mitocondriale potenziale di membrana. Poi Mitotracker, Mitosox e TMRE colorati e le cellule di controllo senza marcatura sono stati analizzati mediante citometria a flusso (FACS Calibur, BD Biosciences), seguita da analisi di media intensità di fluorescenza di 10.000 eventi di software CellQuest (BD Biosciences).

2.10 RT-PCR

RNA totale è stato isolato dai cuori usando il reagente Trizol (Invitrogen) e l'mRNA è stato convertito in cDNA mediante termo-Script Real time PCR quantitativa (RT-PCR) (Invitrogen), seguendo le istruzioni del protocollo (39). Dopo la reazione di trascrizione inversa, RT-PCR è stata eseguita con il kit di master mix SYBR Green Real Time PCR (Applied Biosystems). La reazione è stata visualizzata da SYBR Green Analysis (Applied Biosystem) sullo strumento StepOne (Applied Biosystem). Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati con primer 18S

(controllo endogeno) e rispetto al campione di riferimento (controllo basale) utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I risultati sono espressi come espressione genica relativa.

2.11 Saggio metabolico

Misurazioni in tempo reale della frequenza consumo di ossigeno (OCR) e il tasso di acidificazione extracellulare (ECAR) sono stati realizzati utilizzando un XF-96 extracellulare Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Le cellule sono state piastrate in piastre da 96-XF (Seahorse Bioscience) alla concentrazione di 20.000 cellule / pozzetto. L'OCR è stata misurata in XF supporti (non tamponata mezzo DMEM contenente glucosio 10 mM, 2 mM L-glutamina e 1 mM sodio piruvato), in condizioni basali e in risposta a 5 mM oligomicina, 1,5 mM di carbonylcyanide-4- (trifluorometossi) -phenylhydrazone (FCCP) e 1 micron di Antimicina e rotenone (tutto da Sigma Aldrich). ECAR stata misurata in XF media in condizioni basali e in risposta al glucosio 10 mM, 5 mM e 100 mM oligomicina di 2-deossi-D-glucosio (2-DG). I dati sono espressi come media \pm SEM da 3 esperimenti separati. n = 5 replicati per ogni campione. Due code test di Mann-Whitney è stato utilizzato per l'analisi statistica.

2.12 Microscopia Elettronica a trasmissione

Cellule con sovraespressione e silenziamento per GRK2 e HSP90 e cuori sono fissati con glutaraldeide al 2,5%, lavate in PBS, fissati in tetrossido di osmio, disidratati in una serie di etanolo, incorporato in resina epossidica, e quindi esaminati al microscopio elettronico a trasmissione

(JEM- 2000EX), presso l'impianto Federico II per l'imaging avanzato (Cisme).

2.13 Test della Chinasi

Per studiare in vitro la fosforilazione di MNF-1/2 da GRK2, 50 ng di GRK2 attivo sono stati analizzati in 100 ng di purificata Mnf ½. Reazioni di fosforilazione sono state osservate aggiungendo 20 mM ATP, 1 mM di CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 4 mM Tris, pH 7,5, e 10 Ci di [32P] γ-ATP (attività specifica 3000 Ci / mmol) e prolungato per 30 min a 37 ° C. Laemmli buffer è stato aggiunto per arrestare la reazione. Poi, 30 ml di miscela di reazione sono stati risolti su SDS-PAGE 4-12% di pendenza (Invitrogen), colorato con Coomassie blue, decolorato, essiccato sotto vuoto, ed esposti per autoradiografia(40).

2.14 Analisi statistica

Tutti i valori sono presentati come media ± SEM. ANOVA a due vie è stata eseguita per confrontare i diversi parametri tra i diversi gruppi. Test Bonferroni è stata eseguita, se del caso. Un livello di significatività di p <0,05 è ipotizzato per tutte le valutazioni statistiche. Le statistiche sono state calcolate con il software GraphPad Prism (San Diego, California).

Risultati

3.1 Animali esposti ad una dose singola di stress di Radiazioni Ionizzanti (raggi X, 4Gy)

Abbiamo valutato la funzione cardiaca tramite ecocardiografia in condizioni basali e a 3 e 24 ore dopo IR. Come mostrato nelle immagini rappresentative di B-mode e M-mode asse corto (Fig. 1 A-B-C) il ventricolo sinistro risulta dilatato a 3 ore dopo l'irradiazione rispetto alla condizione basale con recupero delle dimensioni normali in 24 h post IR. Questo fenotipo è accompagnato da una riduzione significativa delle funzioni di eiezione (EF%) e le frazioni accorciamento (FS%) rispetto al basale (Fig. 1 D), ma, di nuovo, la funzione cardiaca viene recuperato dopo 24 h dopo IR. L'insufficienza cardiaca acuta è confermata anche da un significativo aumento di ANF e la riduzione di SERCA2a alle 3 ore dopo la radiazione, con un significativo recupero dopo 24 ore dopo IR (Fig 1 E). Considerando il ruolo cardine svolto dai mitocondri nel fornire substrati energetici per la contrattilità cardiaca abbiamo quindi valutato la morfologia e la funzionale mitocondriale nel nostro modello animale sottoposto a IR. Pertanto, abbiamo analizzato la morfologia dei mitocondri mediante TEM (Microscopia Elettronica a Trasmissione). Come mostrato in (Fig. 2A) cuori non esposti ad IR hanno un numero abbondante di mitocondri, organizzate in senso longitudinale / lineare e formando una fila di mitocondri inter-miofibrillari alternati ad una fila di sarcomeri. Questa disposizione crea un'unità funzionale (sarcomero, sarcoplasma e mitocondri) essenziale per fornire energia necessaria alla funzione contrattile (Fig. 2 A). A 3 ore post IR, i mitocondri cardiaci appaiono completamente disorganizzati rispetto al basale, in particolare mostrano appiattimento delle creste con intra-vacuolizzazione e frammentazione e

non appaiono più perfettamente organizzati nel tessuto cardiaco (Fig. 2A). A distanza di 24 ore, la morfologia dei mitocondri è parzialmente recuperata, con evidenza di creste normale e assenza di vacuolizzazione. Inoltre abbiamo osservato un aumento dei mitocondri con morfologia allungata, che può suggerire la presenza di fusione mitocondriale. (Fig. 2A). Il danno mitocondriale in risposta a stress acuto è stata valutata anche l'espressione dei diversi complessi (da I a IV) che compongono la catena respiratoria mitocondriale per generare ATP , e la mitogenesi (PGC-1 e cofattori legati) attraverso RT-PCR. A 3 ore dopo IR il complesso I, II, III e IV sono tutti ridotti così come l'espressione dell'ATPasi (Fig 2 B). A 24 ore dopo IR, i complessi e l' ATPasi vengono recuperati (Fig. 2 B). Allo stesso modo, i PGC-1 alfa e fattori e cofattori correlati (MmTFA, e NRF-1) sono ridotti a 3 ore dopo IR, mentre a 24 h i livelli di espressione sono nuovamente aumentati (Fig .2C).

3.2 Compartimentalizzazione di GRK2 in risposta allo stress

GRK2 partecipa alla regolazione di diversi modelli di scompenso cardiaco (41). I suoi livelli sono aumentati in condizioni croniche, ma studi recenti hanno dimostrato che questa chinasi localizza in diversi compartimenti cellulari in risposta a condizione acute e stressanti per esempio l'ischemia/riperfusion (33, 42). Qui abbiamo valutato come GRK2 modifica la sua localizzazione nelle cellule cardiache dopo l'esposizione IR. In particolare, nei campioni di cuore di topi irradiati e non irradiato a 3 e 24 ore dopo lo stress , abbiamo valutato la localizzazione GRK2 in diverse frazioni subcellulari (mitocondri, membrane plasmatiche e citosol) e nel lisato totale . Nessuna differenza

dipendenti dal tempo di esposizione alla radiazione e' stata osservata nel citoplasma e nel lisato totali dei livelli di GRK2, che indica nessuna modifica dell' espressione totale della chinasi nel tempo (Fig 3A-B). Al contrario, sono state riscontrate differenze significative nella localizzazione GRK2 tra la membrana plasmatica e mitocondri. Nel cuore non irradiato, GRK2 è prevalente in mitocondri, ma a 3 ore dopo IR, GRK2 è in gran parte localizzata sulle membrane plasmatiche con livelli ridotti nei mitocondri (Fig. 3 C-D). A 24 ore, GRK2 è ridotta sulle membrane plasmatiche cellulari, ritornando ad un livello simile alle condizioni basali, ma è stato recentemente localizzato prevalentemente nei mitocondri (Fig. 3 C-D). Da notare, localizzazione sub-cellulare GRK2 dipendente dal tempo è accompagnata da cambiamenti a livello di molecole coinvolte nei processi di apoptosi quindi con il rilascio dal mitocondrio del Citocromo C e mitofagia mitocondriale mediata dalla proteina del sequestrosoma P62 e recupero massa mitocondriale tramite SOD (Fig 3A-B-C). In particolare, il rilascio di Cyt C è aumentato drammaticamente nella frazione citosolica (Fig. 3B) a 3 ore dopo IR e ridotto a 24 ore. Analogamente, p62, una proteina coinvolta nella formazione di autofagosomi per l'eliminazione dei mitocondri danneggiati e quindi pronti per essere fagocitati (Fig. 3A), è aumentata in risposta a stress a 3 h con una parziale riduzione a 24 ore. Al contrario, il livello di SOD sono ridotti a 3 ore, ma normalizzato a 24 ore rispetto al basale, indicando il recupero della massa mitocondriale. Per analizzare il possibile coinvolgimento di GRK2 nel preservare mitocondri, abbiamo valutato l'interazione tra GRK2 e mitofusin 1 e 2 (MNF-1/2). Queste proteine sono fondamentali nel processo di fusione mitocondri, al fine di recuperare i mitocondri danneggiati in risposta a diverse condizioni di stress. Come mostrato in (Fig. 3 E-F) GRK2 interagisce dinamicamente con entrambe MNF-1 e 2: Al 3h dopo lo stress irradiazione GRK2 prende

prevalentemente complesso con MFN-1, ma non MFN-2; a 24h GRK2 è invece legata principalmente alla MFN-2 (Fig. 3 F).

3.3 Morfologia e funzione mitocondriale in risposta all' IR in cellule HEK-293

Per valutare se le osservazioni di cui sopra erano riproducibili anche in altri sistemi cellulari, abbiamo studiato le modificazioni morfologiche mitocondriali in risposta a IR in HEK-293. L' Analisi mediante TEM ha dimostrato che in 3 ore dopo IR il numero dei mitocondri sono notevolmente ridotti con presenza di numerose piccole vescicole citoplasmatiche, rispetto alle cellule non irradiate . Nel dettaglio, i mitocondri appaiono danneggiati con riduzione delle creste e vacuolizzazione, analogamente a quanto osservato nei mitocondri del miocardio di topi sottoposti a radiazione(Fig. 4 A e Fig. 2 A). A 8 ore dopo IR la morfologia mitocondriale viene recuperata con ri-organizzazione delle creste e assenza di vacuolizzazione, rispetto cellule non IR (Fig.4 A). Inoltre, la citofluorimetria con Mitotracker, ha mostrato che a 3 ore la massa mitocondriale si riduce, con recupero a 8 ore dopo IR (Fig. 4 B). Questi dati suggeriscono che dopo irradiazione in 3 ore una parte dei mitocondri è danneggiata con conseguente eliminazione mediante Mitophagia, mentre i mitocondri intatti vengono recuperati mediante processi di fissione/fusione. Questi dati sono supportati anche dai livelli di espressione di SOD che risultano ridotti a 3h, recuperati a 8 h e mantenuti a 24 h dopo IR. Similmente al modello animale, abbiamo valutato la diversa localizzazione subcellulare di GRK2 dopo IR in maniera tempo dipendente. Non abbiamo osservato modifiche significative dei livelli totali di GRK2 (Fig. 4 C), ma una sorprendente sub-localizzazione della molecola in

risposta all'IR. Infatti, in condizioni basali GRK2 è localizzata principalmente nel citosol, sulla membrana plasmatica ad 3 h, per poi accumularsi nuovamente nel citosol e soprattutto nei mitocondri ad 8h post IR (FIG. D-E) simile al dinamismo della chinasi nei cuori degli animali irradiati. Questi dati indicano che anche nelle HEK-293, la localizzazione subcellulare di GRK2 è regolata in modo dipendente dal tempo a seguito di IR, ma è soprattutto interessante notare che è localizzato nei mitocondri in un lasso di tempo (8h post-IR), dove si osserva il recupero della massa mitocondriale.

3.4 Ruolo di GRK2 nelle funzioni mitocondriali

Abbiamo qui valutato il potenziale ruolo di GRK2 nelle funzioni mitocondriali in risposta allo stress IR. In particolare, abbiamo valutato gli effetti di GRK2 overespressione (Pc-DNA GRK2) e silenziamento (Si-RNA) nelle seguenti funzioni: 1) la massa mitocondriale e la produzione di ROS, 2) potenziale di membrana mitocondriale; 3) respirazione mitocondriale e la produzione di ATP. L'overespressione di GRK2 è stata eseguita mediante trasfezione del plasmide pcDNA-GRK2 ottenere un livello aumentato di 10 volte della molecola (pcDNA-GRK2), mentre è stato quasi completamente silenziata da si-RNA (si-RNA GRK2). Ancora una volta, in cellule di controllo trasfettate con pcDNA3.1 o scramble, la massa mitocondriale è stata significativamente ridotta a 3 ore e recuperato in post-esposizione IR 8h. L'overespressione di GRK2 sembra mantenere la massa mitocondriale lungo i diversi momenti dalla radiazione (Fig. 5A). Al contrario, nelle cellule trattate si-RNA GRK2 la massa mitocondriale è ridotta a 3 ore e non viene recuperata in 8h posta IR (FIG. 5A). Di conseguenza, la produzione di ROS mitocondriale valutata da MitoSox è

aumentata a 3 ore e poi ridotta a 8 ore dopo IR rispetto alle cellule di controllo. Nelle cellule pcDNA-GRK2, abbiamo osservato un aumento della produzione di ROS basale, ma senza modifiche significative nei seguenti punti temporali. Il silenziamento di GRK2, invece, ha prodotto un aumento progressivo mitocondriale produzione di ROS evidente in particolare a 8h dal IR, dove è significativamente superiore pcDNA-GRK2 e cellule di controllo (Fig. 5B). Tramite Citofluorimetria con TMRE abbiamo evidenziato un potenziale di membrana mitocondriale indice della funzionalità mitocondriale ridotta in cellule di controllo a 3h dal IR (sia pcDNA3.1 e scramble), che viene poi recuperata 8h dalla radiazione. Nelle cellule pcDNA-GRK2 nessuna modifica significativa è stata trovata in 3h e post 8h IR rispetto al basale, mentre siRNA-GRK2 ha mostrato già basalmente una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ed una progressiva riduzione del potenziale di membrana mitocondriale tempo dipendente (fig. 5C). Inoltre, abbiamo valutato la respirazione mitocondriale da Seahorse. L'overespressione di GRK ha mostrato un aumento del livello di consumo di ossigeno basale e la respirazione massima, mentre si-RNA GRK2 cellule trattate hanno mostrato una significativa riduzione del consumo di ossigeno sia in esposizione basale IR condizioni e post 8h. Allo stesso modo, la produzione di ATP è stato conservato nelle cellule pcDNA-GRK2 a 8h post radiazione IR, mentre era significativamente diminuita in siRNA-GRK2 cellule trattate (Fig. 5D- E-F).

3.5 Ruolo di GRK2 nella morfologia mitocondriale

Al fine di confermare il ruolo protettivo di GRK2 nei mitocondri dopo lo stress da radiazioni ionizzanti, abbiamo valutato la morfologia mitocondriale con TEM analisi, in condizioni basali a 3 e 8 ore in cellule con l'overespressione di GRK2 e silenziamento della chinasi. Nelle cellule pcDNA-GRK2, il numero dei mitocondri non è stato modificato dalla esposizione alla radiazione rispetto al basale in confronto sempre a 3 e 8 ore dopo l'esposizione IR, con conservato creste e l'assenza di vacuolizzazione (Fig. 6). HEK-293 transfettate con siRNA-GRK2 ha mostrato un ridotto numero di mitocondri già in condizioni basali, rispetto all'esposizione tempo dipendente, inoltre le creste mitocondriali apparivano disallargate e disordinati con diversi intra-vacuolizzazione. A 3 ore dopo IR, numero di mitocondri è ulteriormente ridotta, con diversi organelli incluse in un complesso dell'autofagosoma pronti per la degradazione lisosoma mediata (Fig. 6). A 8 ore dopo lo stress IR, il numero di cellule sono state drasticamente diminuito, Con pochi ancora disponibili per l'analisi e mostrando soprattutto una morfologia apoptotica (Fig. 6).

3.6 GRK2 e la fusione Mitocondriale

Per valutare la capacità di GRK2 preservare mitocondri in risposta allo stress radiazioni, abbiamo considerato il possibile coinvolgimento di GRK2 nella fusione mitocondri come indicato precedente sui dati vivo dati in cuori mostrano l' interazione dinamica di GRK2 con MNF-1 e MFN-2- Tre proteine sono specificamente coinvolti in questo processo di mitocondri di fusione: MNF-1, MNF-2, e OPA-1. MNF-1 e 2 sono situati

sulla membrana mitocondriale esterna conservata potenziale insieme e collegati ad OPA-1, che è invece localizzata nella membrana interna. Come evidenziato nei campioni di cuore (fig. 3E-F), nessuna interazione può essere osservata tra GRK2 e MNF-1 e / o 2 in condizioni basali, tale dato è stato dimostrato anche sulle cellule HEK-293. A 3 h si osserva l'interazione tra GRK2 e MNF-1, ma non a 8 ore dalla radiazione (Fig. 7 A-B). Inoltre, GRK2 è in grado di interagire con MFN-2 a 3 e 8 ore dopo l'esposizione. Considerando l'effetto protettivo svolto dalla GRK2 nel recupero della morfologia mitocondriale a 3h dalla radiazione, abbiamo valutato se l'interazione con MFN-1 è stato probabilmente modificato quando la chinasi viene sovraespressa. Infatti abbiamo osservato che GRK2 / MNF-1 interazione è stata anticipata al 1 h dalla radiazione rispetto alle cellule di controllo in cui l'interazione avviene a 3 ore dopo lo stress (Fig. 7 C). Recenti studi hanno dimostrato che GRK2 è veicolato nei mitocondri attraverso l'interazione con la chaperonina HSP90. In Figura 7 C è dimostrato che HSP90 interagisce con MNF-1 immunocomplesso ad 1 e 3 ore dopo la radiazione. La rimozione di HSP90 da siRNA abolisce l'interazione di GRK2 con MNF-1, che indica il ruolo chiave di questo chaperone in formazione del complesso GRK2 / MNF-1/ HSP-90. Al fine di confermare che il chaperon HSP90 è coinvolto insieme con GRK2 in fusione mitocondri, abbiamo studiato l'analisi attraverso immunoprecipitato l'interactoma formazione del complesso composto da GRK2, MNF-1 e HSP 90, in cellule con GRK2 sovraespressione in cellule con GRK2 sovraespressione e HSP90 KO, a 1 e 3 ore dopo lo stress radiazioni. Nelle cellule con GRK2 overespressione con HSP90 K.O. Non ci sono interazioni a 1 e 3 ore dopo l'esposizione rispetto alle cellule di controllo in cui abbiamo l'interazione tra MNF-1, GRK2 e HSP90 a 3 ore e cellule in cui abbiamo trasfettate GRK2 in cui questo complesso interactoma è

anticipato in 1 ora dopo lo stress da radiazioni. A conferma di questi dati, abbiamo valutato un possibile ruolo di GRK2 nella fosforilazione e quindi nell'attivazione delle mitofusine. L'analisi densitometrica infatti mostra la fosforilazione di GRK2 prima sulla mitofusina 1 e successivamente sulla mitofusina 2 (Fig. 7D) e tale fosforilazione è potenziata dalla presenza di HSP90.

3.7 siRNA HSP90 alpha/beta nella funzione mitocondriale

Abbiamo poi valutato se HSP90 è fondamentale nel mediare il ruolo protettivo di GRK2 nell'integrità mitocondriale e cellulare in risposta a radiazioni ionizzanti. Per questo, nelle cellule HEK-293 con l'overespressione stabile di GRK2 (HEK-293 GRK2) sono state trasfettate con si-RNA HSP90 e valutati gli effetti dello stress da radiazione sulla morfologia. Le analisi morfologiche TEM hanno evidenziato che, anche in presenza di GRK2 overespressione, HSP90 silenziamento interessa la morfologia mitocondriale già in condizioni basali e dopo 3 h i mitocondri radiati appaiono scomposti e diminuiti di numero e fortemente vacuolizzati. Ad 8 ore dopo l'irradiazione tutte le cellule andavano incontro a morte apoptotica, simile al fenotipo riscontrato in assenza della chinasi GRK2 (Fig. 7E- Fig. 6), suggerendo che GRK2 e la chaperonina HSP90 interagiscono in condizioni di stress, veicolando GRK2 sulla membrana mitocondriale esterna per legare MNF-1/2, formando il complesso GRK2/HSP90 and Mitofuin-1/2.

Discussione

Questo studio dimostra che la funzione cardiaca e consequenzialmente danno cellulare, indotta da uno stress singolo di 4Gy di radiazione ionizzante, è recuperato all'interno di un breve lasso di tempo (43, 44). In vivo ed in particolare, l'analisi in vitro dimostra che questo fenomeno può essere almeno in parte imputata ai meccanismi di controllo di qualità mitocondriale e quindi di dinamismi mitocondriale, attraverso il quale vengono eliminati i mitocondri irrimediabilmente danneggiati e che hanno perso il loro potenziale di membrana mediante mitofagia mitocondrio mediata (Fig 2A) e promuove la formazione di organelli nuovi e funzionali (29, 45) con l'attività mitocondriale intatta e ridotta produzione di ROS (46). La rimozione completa della chinasi GRK2 determina un'alterazione nel recupero dei mitocondri (Fig. 6) che portano ad un aumento della produzione di ROS, compromette l'attività metabolica mitocondriale e, infine, induce la morte cellulare (47, 48). Questo ruolo di GRK2 appare essere correlato alla sua capacità di complessare dinamicamente e fosforilare MFN-1/2, molecole chiave del processo di fusione mitocondriale, utilizzando HSP-90 come "ponte" (Fig. 7). Il nostro modello animale adatta con le dinamiche di recupero e la sopravvivenza di una popolazione topi sottoposti a dosi crescenti di IR (43). In particolare il recupero da stress IR presume l'integrità del sistema di riparazione biologica attraverso cui lo stato sano può essere recuperato. Questo è il caso del nostro modello animale, dove è stato applicato a topi per minimizzare la mortalità ma permettendo lo studio del sistema di riparazione attivato un totale di 4Gy di radiazione data. Il nostro studio si concentra sui mitocondri a causa dei seguenti motivi: 1) negli eucarioti, in particolare nel cuore, essi occupano una parte sostanziale del citoplasma e

sono fondamentali per la produzione di ATP necessario per soddisfare la forte richiesta energetica cardiaca; 2) Sono la fonte primaria di ROS e quando disfunzionale l'aumentata produzione di ROS è responsabile del danno biologico e tissutale tardivo indotta dall'IR (49, 50) . Di conseguenza, i meccanismi di recupero mitocondriale sono fondamentali per ritornare allo stato sano (51) e prevenire complicazioni tardive dovute allo stress ossidativo tardivo. Nel nostro modello animale di stress IR, abbiamo trovato un ampio danneggiamento dei mitocondri cardiaci, sia per numero e morfologia, che è associata ad una eliminazione iniziale di mitocondri irreversibilmente danneggiati mediante mitofagia mediata dal mitocondrio (52, 53) (Fig. 2 A) ma poi seguita da recupero di massa (Fig. 3D) e di conseguenza delle funzioni cardiache contrattili (Fig.1 E) (54). I meccanismi di rimozione mitocondriale e rigenerazione comprendono mitofagia, mitogenesi, fissione e processo di fusione e biogenesi mitocondriale, questo ciclo è finemente regolato da sensori molecolari specifici prettamente citosolici (52, 55, 56). Queste molecole sono generalmente citosoliche , ma anche in grado di localizzarsi in altri compartimenti cellulari in cui svolgono la loro funzione regolatoria (51). Questo è il caso di GRK2 che compartimentalizza sulla membrana plasmatica, citoscheletro e, recentemente, anche mitocondri a seguito di una vasta gamma di stimoli fisiologici e patologici. Nel nostro modello di IR abbiamo osservato che GRK2 si sposta dal citosol principalmente alla membrana plasmatica a 3 ore e per poi localizzarsi nei mitocondri a 24 ore dopo IR. Inoltre , GRK2 interagisce dinamicamente in risposta ad una radiazione ionizzante con MNF 1 e 2, come osservato sia in vitro e in vivo suggerendone un importante ruolo fisiologico, e supportato dai risultati, morfologici e funzionali, in cui la sua rimozione compromette i meccanismi di recupero mitocondriale e la sopravvivenza delle cellule.

Questa capacità dipende dall'interazione con HSP-90 dopo esposizione ad uno stress ossidativo, come precedentemente osservato, ma soprattutto svela che questa interazione è fondamentale per interagire con MFN-1 e 2 e necessaria per la chinasi di esercitare i suoi effetti protettivi. In questo studio ridefiniamo il ruolo di GRK2 nella fisiologia cellulare rispetto alle condizioni patologiche e quindi come come molecola sensore dello stress cellulare. Mentre il ruolo di questa chinasi in condizioni patologiche croniche è ben definito, il suo ruolo fisiologico non è altrettanto chiaro. GRK2 è aumentato in diverse malattie croniche come lo scompenso cardiaco, ipertensione (57), malattia di Alzheimer (58) e ipertrofia ventricolare sinistra, e la sua inibizione e / o la modulazione farmacologica ha effetti benefici, come ampiamente dimostrato in diversi modelli animali di scompenso cardiaco (59). I livelli di GRK2 nella cellula sono finemente regolati attraverso la degradazione proteosoma-dipendente, e stimoli come l'insulina o IGF1(32) aumentano rapidamente livello GRK2 interrompendo il suo legame con la E3 ligasi MDM2, suggerendone l'importanza di questa chinasi nella regolazione dell'omeostasi cellulare (60, 61). Numerose evidenze in vivo supportano questa ipotesi: 1) la mancanza di GRK2 è deleteria per lo sviluppo cardiovascolare embrionale (61) 2) la rimozione GRK2 cardiaca selettivo nel topo adulto altera la risposta ipertrofica cardiaca alla stimolazione β AR cronica, portando ad una dilatazione eccentrica del cuore (62-64), 3) la rimozione selettiva endoteliale di GRK2 induce aterosclerosi precoce nelle aorte ed inibisce neo-angiogenesi nei topi. A questo si aggiunge che gli effetti benefici della porzione carbossi-terminale di GRK2 (β ARKct) (65, 66), sono legati non solo alla capacità di contrastare gli effetti di GRK2 sulla membrana plasmatica, ma anche per facilitarne la sua localizzazione nei mitocondri. Infatti, la presenza di GRK2 nella cellula è fondamentale per β ARKct per ridurre la produzione

di ROS mitocondriale nei macrofagi in risposta a LPS. L'attuale studio segue questo indirizzo , mostrando che la rimozione GRK2 da si-RNA colpisce la morfologia mitocondriale e la respirazione in condizioni basali, e abolendo ogni possibilità del mitocondrio di recuperare dopo un potente stress ossidativo come quello provocato dall'esposizione a radiazioni ionizzanti (67, 68). Questo studio dimostra che GRK2 è una molecola fondamentale per i processi cellulari e il suo ruolo è strettamente legato al contesto, fisiologico e patologico, acuto e cronico in cui viene studiata. Cionondimeno, questo lavoro può avere notevoli implicazioni da punto di vista clinico e terapeutico. L'aumentata insorgenza di complicanze cardiovascolari tardive in pazienti sottoposti a radioterapia è una recente evidenza epidemiologica, ma poco o nulla è noto dal punto di vista fisiopatologico e soprattutto molecolare (69, 70). L'evidenza che i mitocondri sono direttamente coinvolti nel danno cardiaco e l'identificazione di una molecola chiave coinvolta nella regolazione del "dinamismo mitocondriale" (36, 71) e quindi nel dinamismo mitocondriale che coinvolge: Mitofagia, biogenesi e fusione/fissione mitocondriale che apre a scenari per lo sviluppo di terapie e/o approcci mirati alla preservazione di questo organello e inoltre, applicabili non solo al campo cardiovascolare a tutti gli organi presumibilmente danneggiati in seguito all'esposizione delle radiazioni ionizzanti (6, 72).

Abstract in English

Radiation in the mediastinum can determinate cardiac abnormalities in patients in treatment for radiotherapy . Moreover a radiation may result in changes in contractility, and in particular to determine damage to the individual cardiomyocytes and its subcellular components. A radiation, induces production of oxygen free radicals, ROS, in a few minutes from the acute, in a direct manner if its interacts directly on the DNA, or indirect manner interacting with the cellular proteins. These radicals are physiologically produced by mitochondria to generate ATP, which in particular in the cardiomyocyte play a pivotal role to provide sufficient energy to the contractile force. The ROS in the cell are second messengers, and in particular they determine the regulation many proteins, one of these is GRK2. GRK2 is a ubiquitous protein that appears to be sensitive to the cellular stress responses through interaction with different chaperones such as HSP90. However the role of GRK2 is not yet clear in response to stress. To evaluate the role of GRK2 on responses to stress by X -Ray in the heart ,we exposed to radiation mice C57BL / J6 and we performed a transthoracic echocardiography at 3 and 24 hours after radiation to study cardiac function. Echocardiography showed that at 3 hours after radiation the left ventricular chamber was dilated and the ejection function (EF%) and the shortening fraction (FS%) were reduced in the acute response to stress in comparison to sham. At 24 hours after radiation cardiac function was recovered. Western Blot analysis on hearts after irradiation showed a different subcellular localization of GRK2 at 3 and 24 hours. In addition, the subcellular localization of GRK2 was also evaluated on cells than we evaluated the mitochondrial morphology via TEM and mitochondrial function. At 3 hours from irradiation we observed that GRK2 is mainly

located in the membranes and is reduced in the mitochondria, and reduction with a consequent damages of the mitochondrial mass and ROS production, while the microscopy images show mitochondrial alterations with vacuolated mitochondria. 8 hours from the radiation, we observed that GRK2 accumulates in the mitochondria and the mitochondrial morphology and function were recovered. To understand whether the localization of GRK2 is essential for mitochondrial response after irradiation, we have modulated the levels of GRK2 through (Si-RNA) and overexpression (pc-DNA-GRK2). 3 after the radiation stress in cells with overexpression of GRK2, we did not assess changes in mitochondrial morphology and mitochondrial function. On the contrary the silencing of GRK2 shows a reduction of mitochondria number at 3 and 8 hours, as well as the production of mitochondrial ROS that result be increased to 3 and 8 hours after exposure. These data suggest that the subcellular localization of GRK2 is regulated in time-dependent manner in response to radiation stress, and its associated with the modification of mitochondrial function and in the regulation of mitochondrial quality control.

Figure e Legenda

Figure

Figure 1

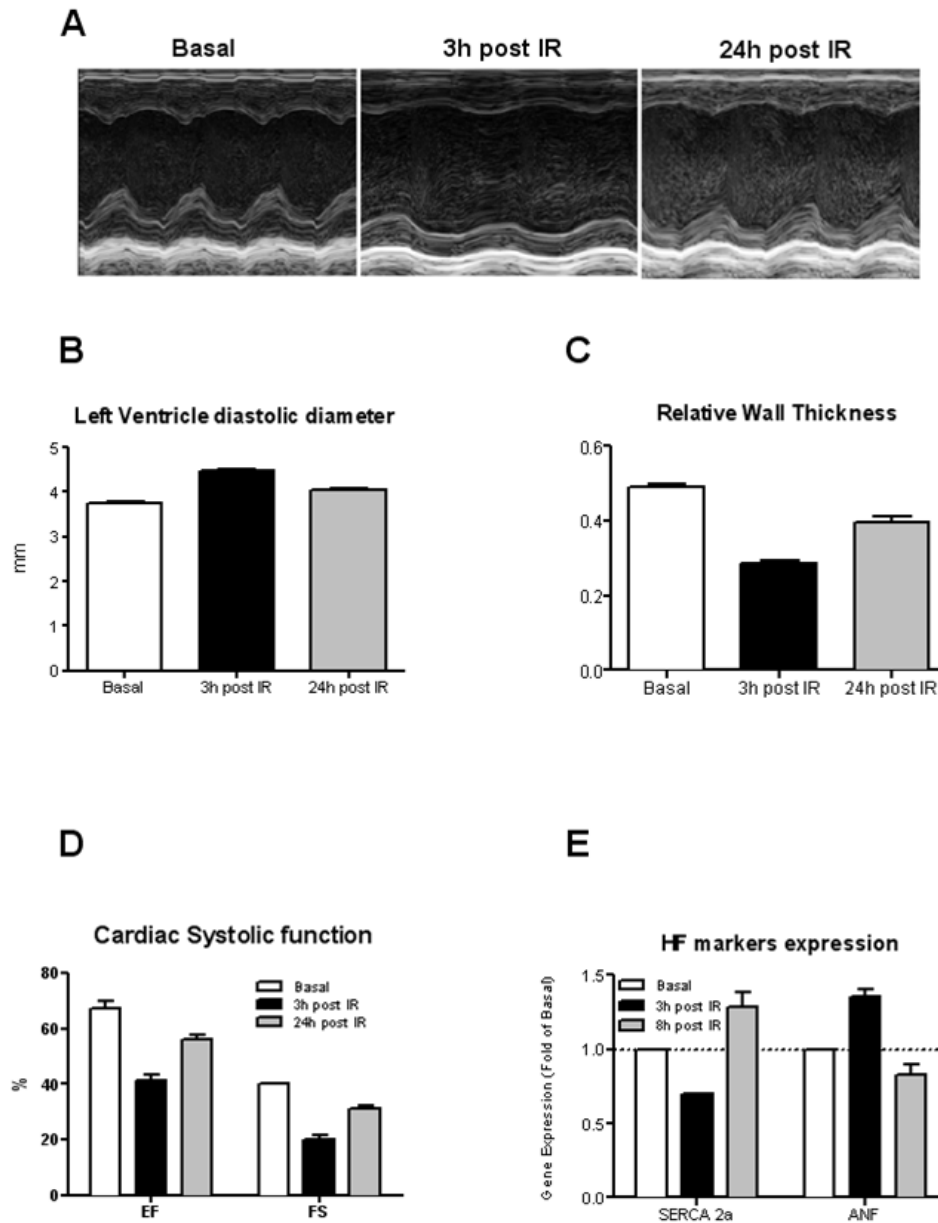


Figure 2

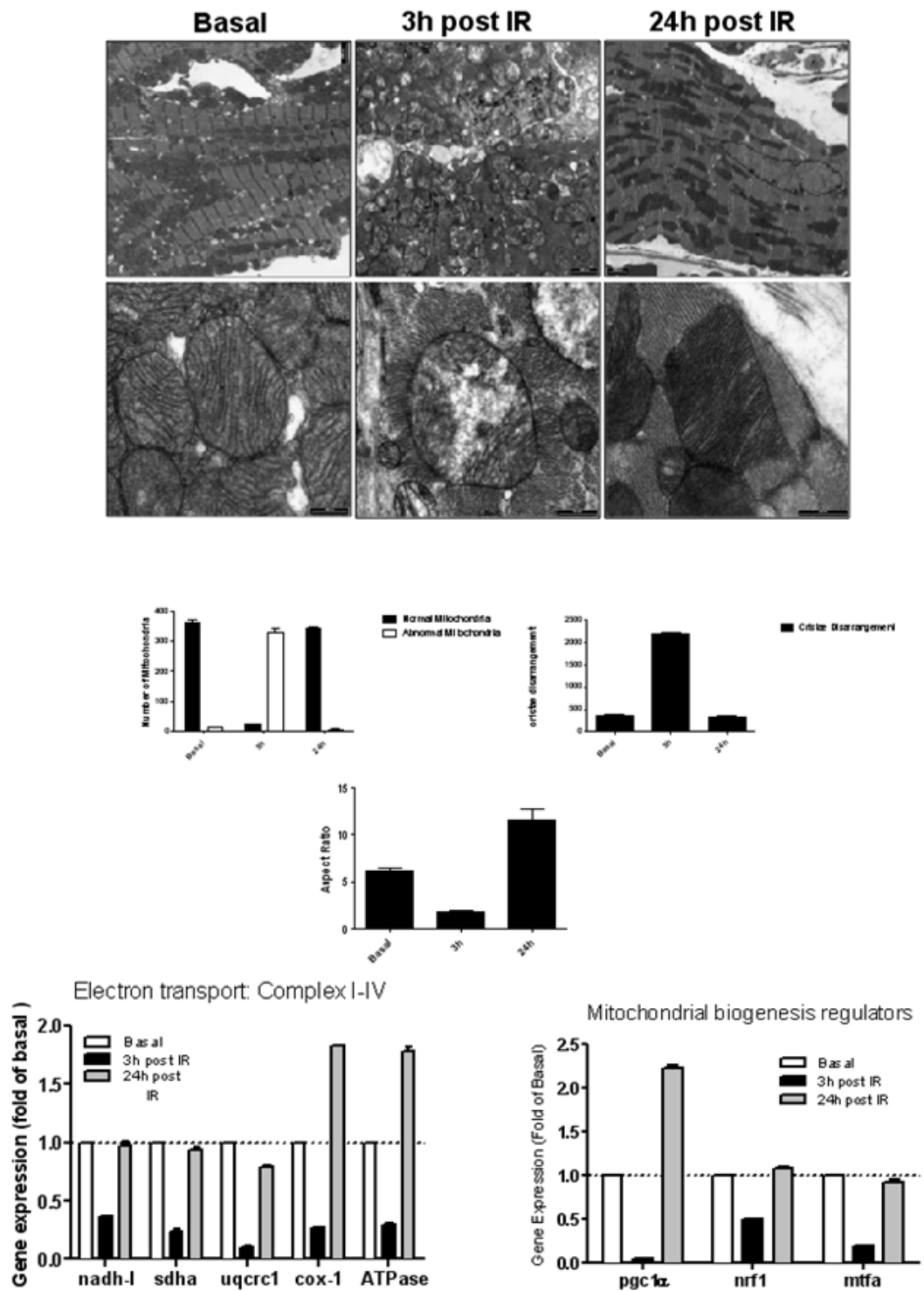


Figure 3

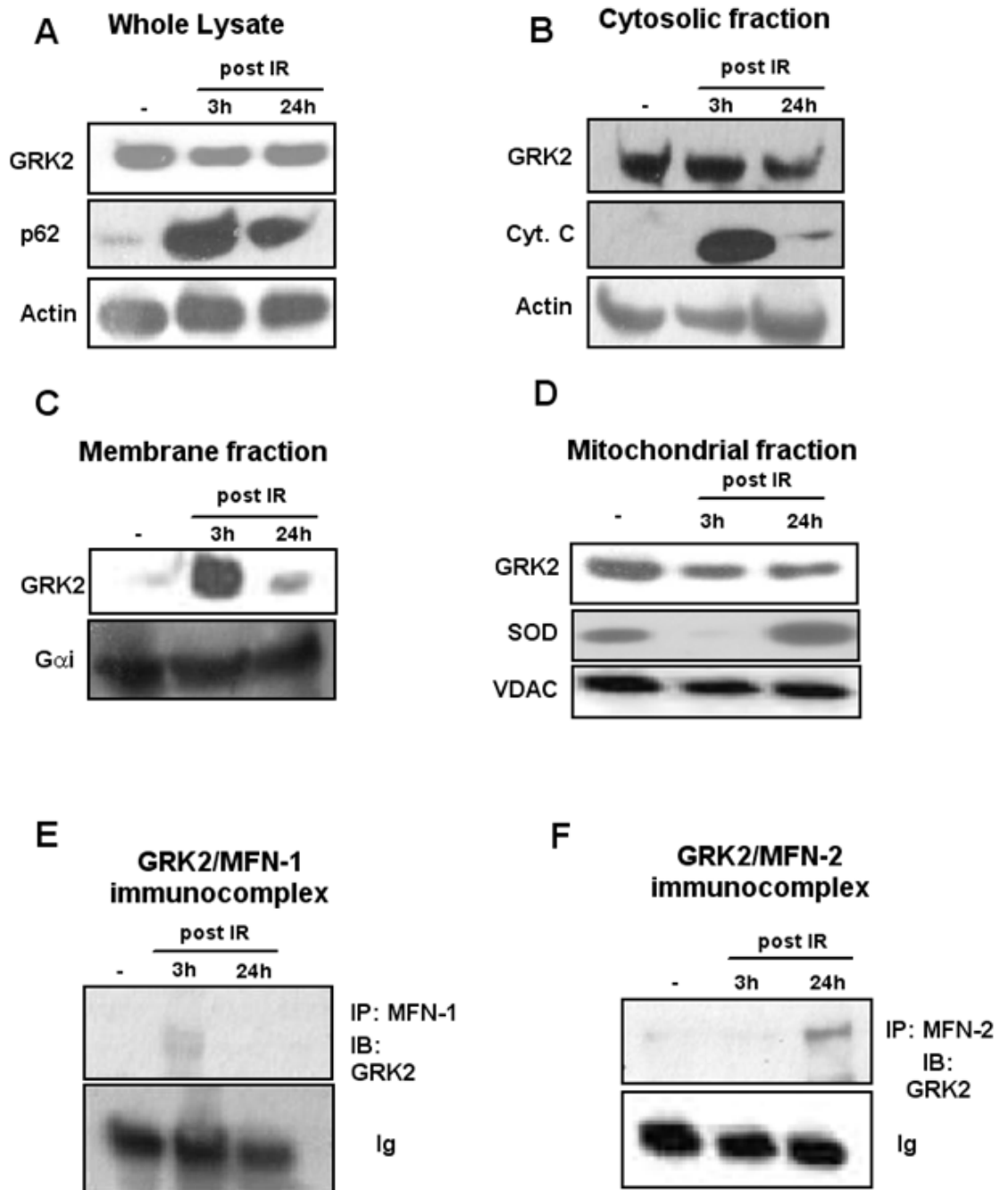


Figure 4

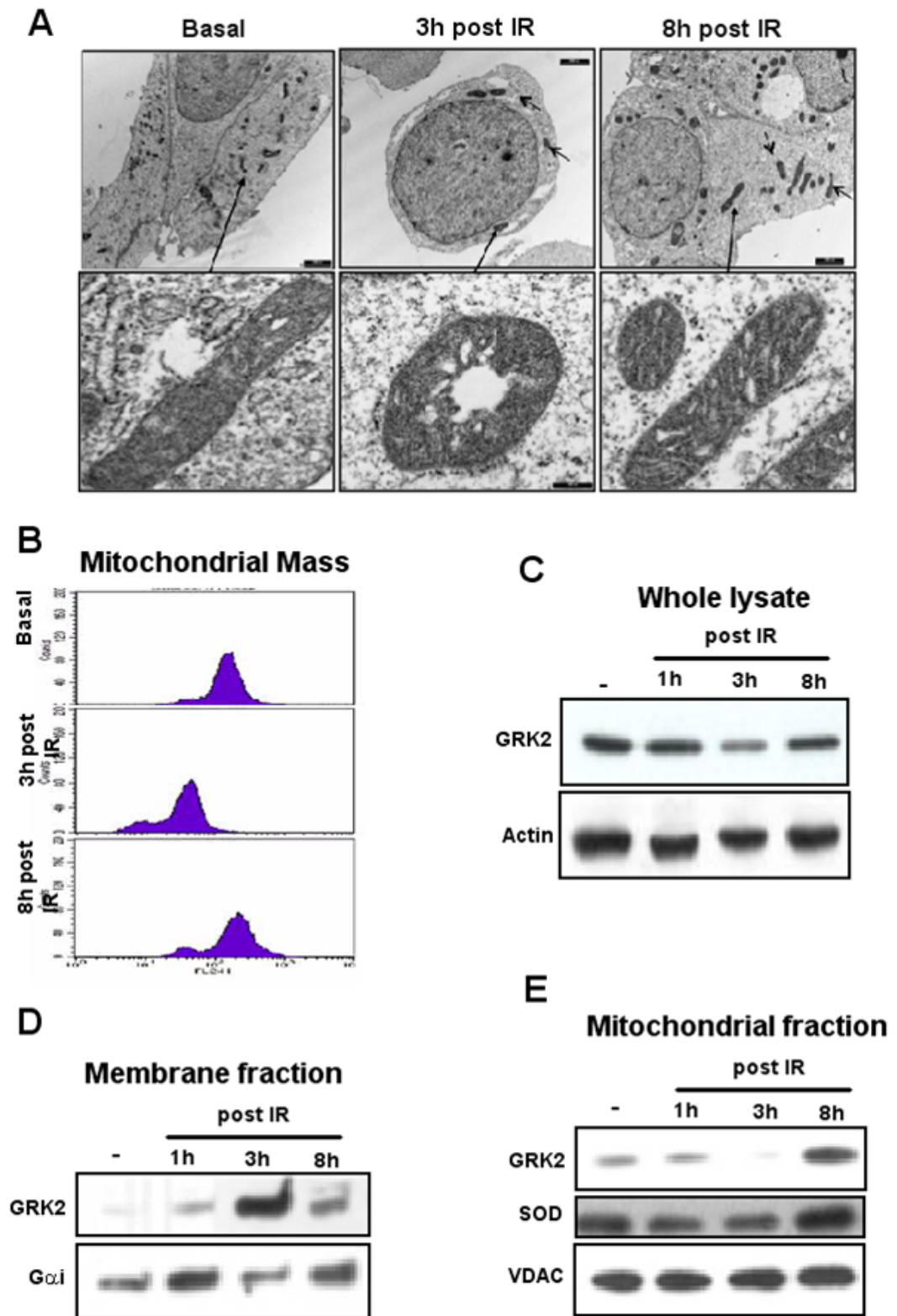


Figure 5

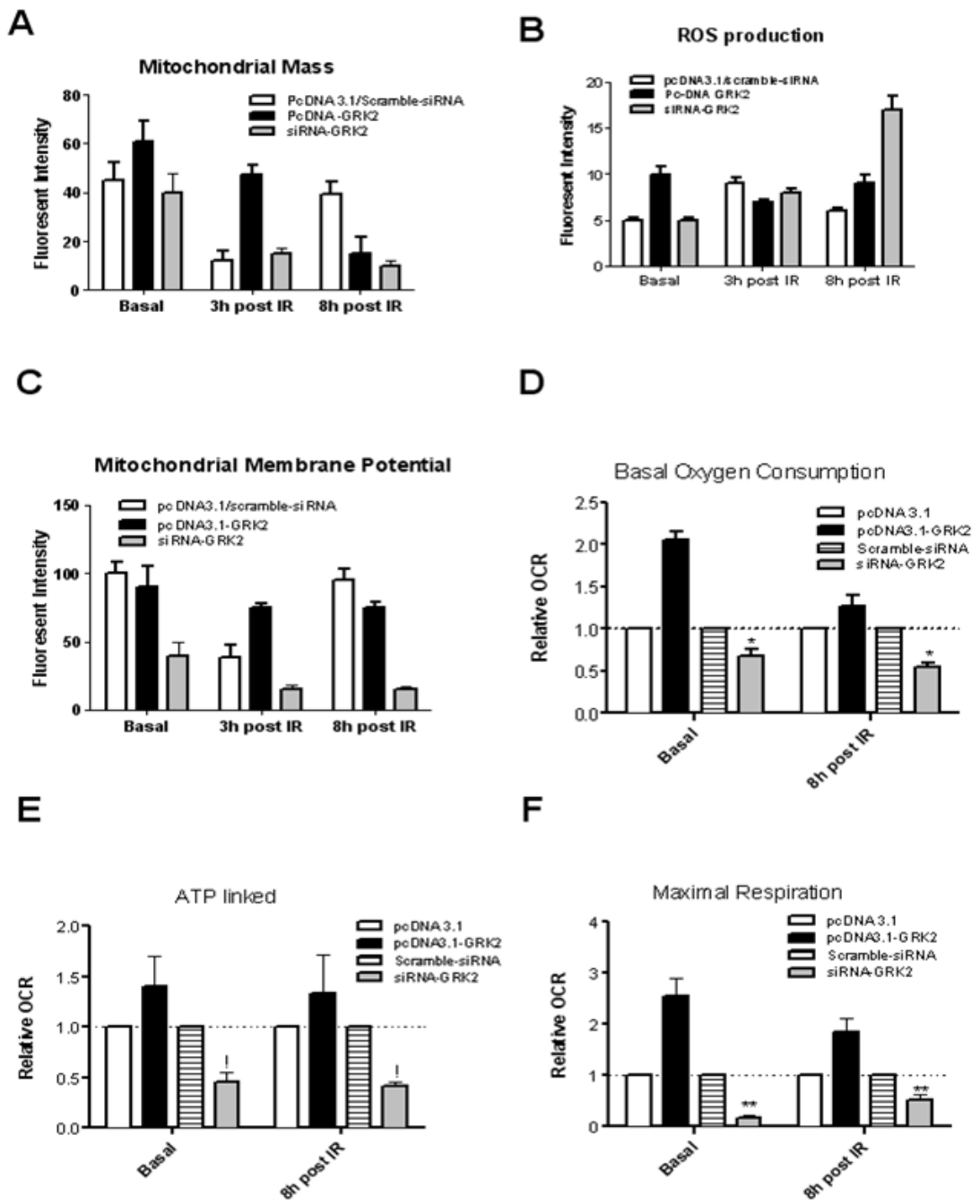


Figure 6

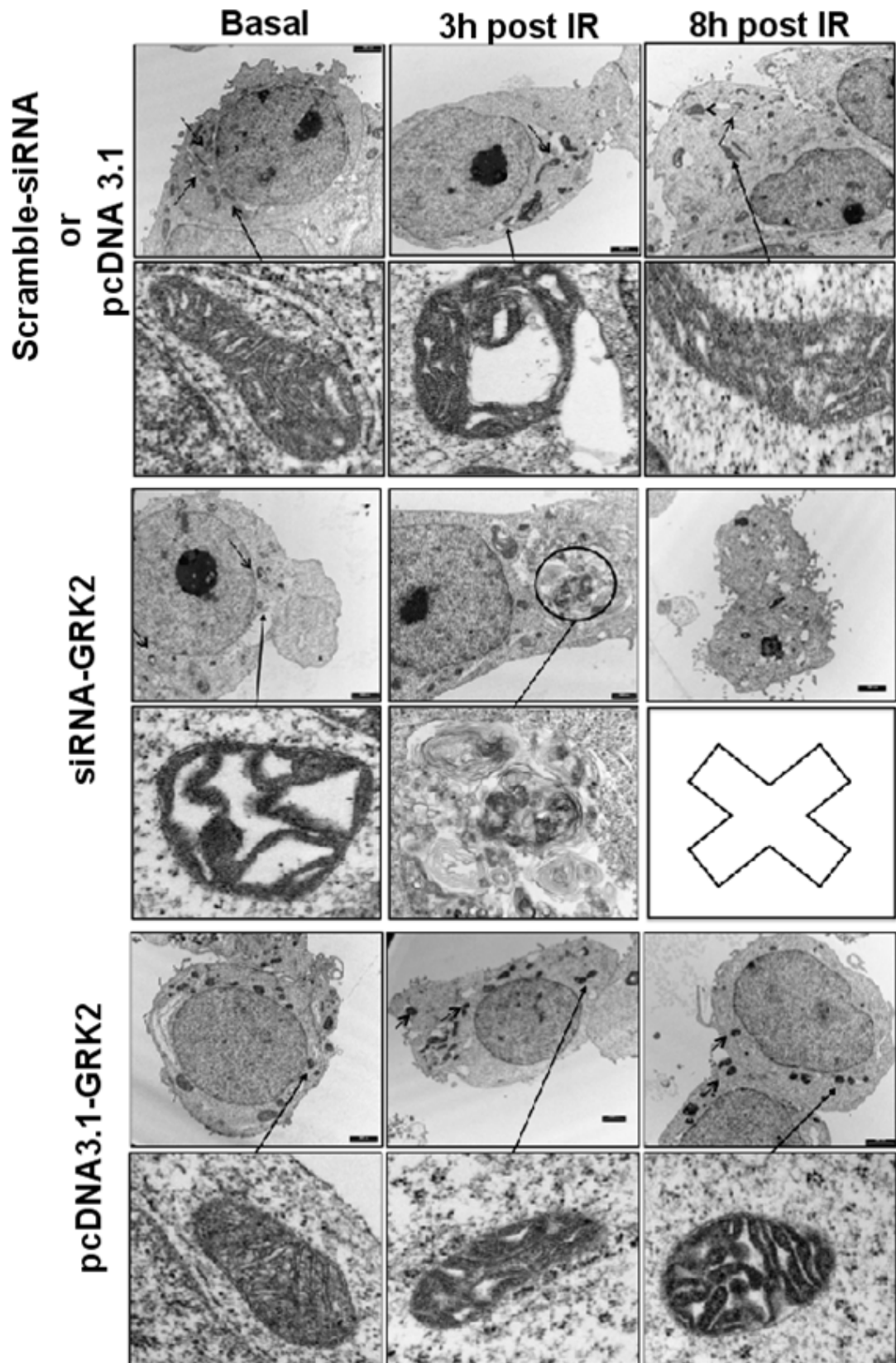
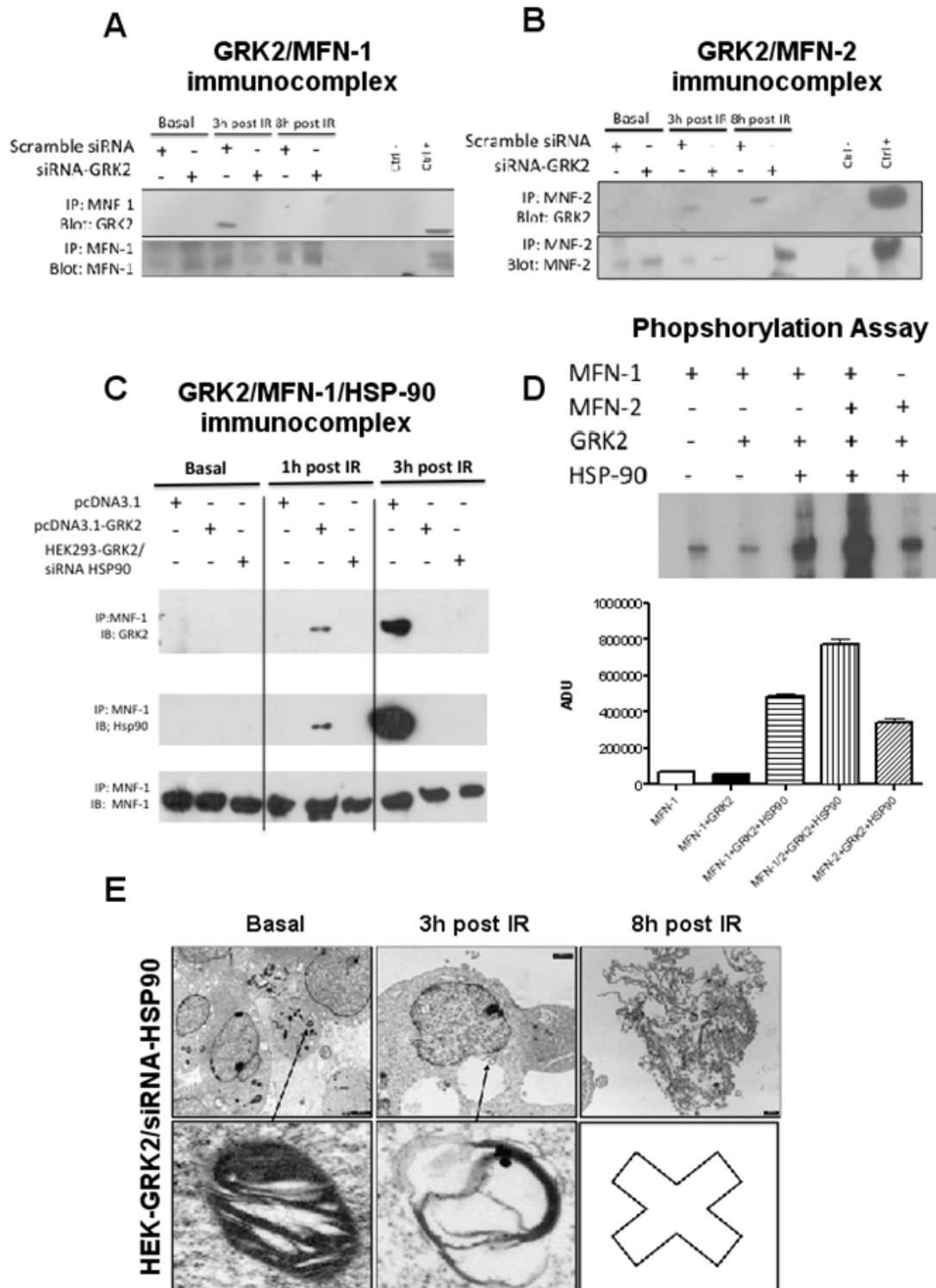


Figure 7



Legenda

Fig: 1: A) Valutazione ecocardiografica dei cuori irradiati in asse corto M-mode a 3 ed 8 ore dalla radiazione. B-C) Valutazione statistica significativa dell' amenuto della camera ventricolare sinistra e conseguente riduzione della parete a 3h e successivo recupero a 24h. C) Valutazione della funzione cardiaca (EF) e (FS) ridotta a 3h dalla radiazione e recuperata a 24h rispetto ai topi di controllo. E) Espressione genica di Serca2a ed ANF nei cuori esposti alla radiazione, con riduzione di Serca 2a ed aumento di ANF a 3h, e viceversa a 24h.

Fig.2: A) Miscoscopia Elettronica a trasmissione (TEM) su cuori sottoposti a radiazione a 3 e 24 h, in cui si evidenzia il danno mitocondriale a 3h con disorganizzazione mitocondriale rispetto al tessuto cardiaco, e nel dettaglio disallargamento delle creste interne mitocondriale, vacualizzazione e rottura della membrana mitocondriale e non perfettamente organizzati rispetto al tessuto cardiaco. Mentre a 24h si evidenzia il recupero mitocondriale con mitocondri fusi. B) Valutazione dei mitocondri anormali rispetto a quelli normali, disallargamento delle creste e Aspect /ratio mitocondriale, rispettivamente a 3 e 24h rispetto allo sham. C) Valutazione dell'espressione genica dei diversi complessi della catena respiratoria sui cuori irradiati (I, II, III, IV) a 3 ridotti e 24h recuperati rispetto ai cuori controllo non irradiati. D) Analisi dell'espressione genica dei fattori coinvolti nella biogenesi, Pgc1 alpha, Mmtfa, NRF-1, nei cuori irradiati a 3h i quali mostrano una forte riduzione e 24h in cui sono recuperati, rispetto ai cuori controllo.

Fig. 3: A-B-C-D) Western Blot analisi su cuori sottoposti alla radiazione a 3 e 24 h, che mostrano la diversa localizzazione di GRK2 sulla membrana

plasmatica e riduzione dal mitocondrio a 3h, e viceversa a 24h, in associazione ai livelli di SOD mitocondriale. Con conseguente rilascio del citocromo c dal mitocondrio nella frazione citosolica a 3h (B), ed aumento della proteina p62 per la formazione di vescicole nei lisati totali (A). E-F) immunoprecipitato rispettivamente di GRK2 con MNF-1 (E) ed MNF-2 (F) a 3 e 24 ore dalla radiazione nei cuori degli animali sottoposti a radiazione.

Fig. 4: A) Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) per la valutazione del danno mitocondriale in risposta alla radiazione in HEK-293, a 3h dalla radiazione il numero dei mitocondri risulta essere ridotto rispetto al basale, con mitocondri notevolmente danneggiati. Ad 8 ore i mitocondri sono recuperati di numero e di morfologia. B) Citofluorimetria con Mito Tracker per la valutazione della massa mitocondriale in HEK-293. C-D-E) Analisi di western blot in maniera tempo dipendente per GRK2 sui diversi compartimenti subcellulari (mitocondri, membrane plasmatiche, lisati totali) a 3 ed 8h dalla radiazione. GRK2 a 3h risulta essere localizzata principalmente sulla membrana plasmatica (D) riducendo significativamente i suoi livelli mitocondriali (E). Mentre ad 8 h aumentano i suoi livelli all'interno dei mitocondri, riducendo quelli di membrana, ed aumentando i livelli di SOD mitocondriale (E). Nessuna modifica di GRK2 è riscontrata nei livelli totali (C).

Fig. 5: A) Analisi Citofluorimetrica con Mito Tracker per la massa mitocondriale in HEK-293 in cellule con l'overespressione di GRK2 (PC-DNA GRK2) ed in cellule con il silenziamento di GRK2 (SiRNA-GRK2) con i rispettivi controlli (PC-DNA 3.1 and Scramble GRK2), a 3 ed 8h dalla radiazione. Nelle cellule di controllo a 3 h la massa mitocondriale si riduce e poi viene recuperata ad 8h. Le cellule con l'overespressione di GRK2 non mostrano alterazioni della massa mitocondriale a 3h dalla

radiazione, contrariamente le cellule con il silenziamento di GRK2 evidenziano una riduzione della massa mitocondriale a 3 ed 8h dalla radiazione. B) Analisi citofluorimetrica della produzione di Ros mitocondriali tramite MitoSox, a 3 ed 8h dalla radiazione in cellule con l-overespressione e silenziamento di GRK2 con i rispettivi controlli. A 3h dalla radiazione nelle cellule di controllo i ROS aumentano e poi ridursi ad 8h consequenzialmente alla massa mitocondriale, il silenziamento di GRK2 invece determina un aumento di ROS in risposta alla radiazione in maniera tempo dipendente. C) Valutazione del TMRE (Potenziale di membrana mitocondriale) a 3 ed 8h dalla radiazione con silenziamento (Si-RNA) ed overespressione di GRK2 (PC-DNAGRK2) rispetto ai controlli (PC-DNA 3.1 and Scramble GRK2) in HEK-293. Nei controlli il potenziale di membrana mitocondriale si riduce a 3h e poi viene recuperato ad 8h. L'overespressione di GRK2 non mostra variazioni del potenziale di membrana mitocondriale in maniera tempo dipendente dalla radiazione. Contrariamente il silenziamento di GRK2 già di base determina una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale che non verrà mai recuperato al in paragone alle cellule di controllo. D-E-F) Saggio metabolico mitocondriale in condizioni basali ed in risposta alla radiazione, nelle cellule di controllo(PC-DNA e Scramble) ed in cellule con il silenziamento (Si-RNA) ed overespressione di GRK2 (Pc-DNA-GRK2). Nelle cellule con il l'overespressione di GRK2 sia in condizioni basali che in risposta alla radiazione mostrano un aumento del consumo di ossigeno, ATP e di respirazione massima mitocondriale, contrariamente il silenziamento di GRK2 determina una notevole riduzione della respirazione mitocondriale sia basalmente che in risposta alla radiazione.

Fig.6: Analisi morfologica mitocondriale tramite Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) in condizioni basali ed in risposta a 3 ed 8 ore dalla radiazione, in cellule HEK-293 con l'overespressione (PC-DNA GRK2) e silenziamento di GRK2 (Si-RNA). Nelle cellule di controllo (Pc-DNA 3.1 e SCRAMBLE-GRK2) in risposta alla radiazione nel citosol il numero di mitocondri risulta essere ridotto e nel dettaglio i mitocondri appaiono vacuolizzati e molti di loro presentano una mitofagia mitocondrio mediata con formazione di vescicole intra-citoplasmatiche pronte per essere degradate dai lisosomi. Ad 8 ore invece dalla radiazione, il numero di mitocondri risulta essere recuperato ed anche la morfologia in dettaglio risulta essere recuperata con formazione di mitocondri allungati (fusione mitocondriale). In cellule con l'overespressione di GRK2 a 3 ed a 8 ore dalla radiazioni non si riscontrano cambiamenti nel numero di mitocondri e nella morfologia basale rispetto alla condizione basale. Contrariamente, invece, il silenziamento di GRK2 già in condizioni basali determina una riduzione del numero di mitocondri con mitocondri che nel dettaglio risultano essere già notevolmente danneggiati con creste dislargate. A 3 ore dalla radiazione in queste cellule si evidenzia nel citosol la presenza di una grande vescicola autofagosoma all'interno della quale sono presenti tutti i mitocondri danneggiati che devono essere deputati alla degradazione lisosomiale mediata. Ad 8 ore dalla radiazione molte di queste cellule sono andate incontro a meccanismi di morte cellulare.

Fig.7 : A-B) Analisi di immunoprecipitato per GRK2 e mitofusina 1 e 2, in condizioni basali ed in risposta alla radiazione in HEK 293. L'analisi mostra il dinamismo di interazione in risposta alla radiazione ionizzante di GRK2 prima con mitofusina 1 a 3 h dalla radiazione e successivamente con mitofusina 2 ad 8 ore dalla radiazione. C) Immunoprecipitato tra GRK2,

hsp90 e mitofusina 1, in cellule di controllo in risposta alla radiazione ed in cellule in cui abbiamo overespresso GRK2 (PC-DNA GRK2) , overespresso GRK2 e silenziato HSP90 (PC-DNA GRK2 + Si-RNA HSP90) ed in cellule in cui abbiamo silenziato HSP90 (Si-RNA HSP90) , ad 1 ora e 3 ore dalla radiazione. L-overespressione di GRK2 anticipa l'interazione GRK2 -HSP90 e mitofusina 1 ad un ora dalla radiazione, nel controllo invece la formazione del complesso GRK2-Mitofusina-1 ed HSP90 si verifica a 3h dalla radiazione. Nessuna interazione invece è riscontrata nelle cellule in cui è stata silenziata la chaperonina HSP90. D) Saggio di fosforilazione con proteine purificate per Mitofusina 1-2, HSP90 e GRK2. L'analisi densitometrica mostra che la chinasi GRK2 fosforila entrambe le mitofusine 1-2, ed il segnale è potenziato dalla chaperonina HSP90. E) Analisi morfologia mitocondriale tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM), per la valutazione della morfologia mitocondriale in risposta alla radiazione in cellule con l'overespressione stabile di GRK2 e silenziato HSP90 (HEK-293 GRK2 + SiRNA HSP90) , in cui nonostante l'overespressione della chinasi GRK2 in assenza della chaperonina HSP90, non si preserva la funzione mitocondriale infatti si riscontra a 3h forte danno mitocondriale in risposta alla radiazione, con nuovamente mitocondri che perdono la loro funzionale morfologia e si riducono di numero. Ad 8 ore dalla radiazione molte delle cellule sono programmaticamente morte.

Bibliografia

1. Rebuzzini, P., Fassina, L., Mulas, F., Bellazzi, R., Redi, C.A., Di Liberto, R., Magenes, G., Adjaye, J., Zuccotti, M., and Garagna, S. Mouse embryonic stem cells irradiated with gamma-rays differentiate into cardiomyocytes but with altered contractile properties. *Mutat Res* 756:37-45.
2. Yusuf, S.W., Sami, S., and Daher, I.N. Radiation-induced heart disease: a clinical update. *Cardiol Res Pract* 2011:317659.
3. Hoppe, R.T. 1997. Hodgkin's disease: complications of therapy and excess mortality. *Ann Oncol* 8 Suppl 1:115-118.
4. Aleman, B.M., Raemaekers, J.M., Tirelli, U., Bortolus, R., van 't Veer, M.B., Lybeert, M.L., Keuning, J.J., Carde, P., Girinsky, T., van der Maazen, R.W., et al. 2003. Involved-field radiotherapy for advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 348:2396-2406.
5. Cella, L., Conson, M., Pressello, M.C., Molinelli, S., Schneider, U., Donato, V., Orecchia, R., Salvatore, M., and Pacelli, R. Hodgkin's lymphoma emerging radiation treatment techniques: trade-offs between late radio-induced toxicities and secondary malignant neoplasms. *Radiat Oncol* 8:22.
6. Cella, L., D'Avino, V., Palma, G., Conson, M., Liuzzi, R., Picardi, M., Pressello, M.C., Boboc, G.I., Battistini, R., Donato, V., et al. Modeling the risk of radiation-induced lung fibrosis: Irradiated heart tissue is as important as irradiated lung. *Radiother Oncol* 117:36-43.
7. Marks, L.B., Yu, X., Prosnitz, R.G., Zhou, S.M., Hardenbergh, P.H., Blazing, M., Hollis, D., Lind, P., Tisch, A., Wong, T.Z., et al. 2005. The incidence and functional consequences of RT-associated cardiac perfusion defects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:214-223.

8. Dorn, G.W., 2nd. Cardiac regeneration - Alchemy, science, and a wee bit of magic? *J Mol Cell Cardiol* 81:10-11.
9. Kryshev, A.I., and Sazykina, T.G. Modelling the effects of ionizing radiation on survival of animal population: acute versus chronic exposure. *Radiat Environ Biophys* 54:103-109.
10. Somosy, Z. 2000. Radiation response of cell organelles. *Micron* 31:165-181.
11. Corre, I., Niaudet, C., and Paris, F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 704:61-67.
12. Monceau, V., Meziani, L., Strup-Perrot, C., Morel, E., Schmidt, M., Haagen, J., Escoubet, B., Dorr, W., and Vozenin, M.C. Enhanced sensitivity to low dose irradiation of ApoE^{-/-} mice mediated by early pro-inflammatory profile and delayed activation of the TGFbeta1 cascade involved in fibrogenesis. *PLoS One* 8:e57052.
13. Kergonou, J.F., Braquet, M., and Rocquet, G. 1981. Influence of whole-body gamma irradiation upon rat liver mitochondrial fractions. *Radiat Res* 88:377-384.
14. Kergonou, J.F., Bernard, P., Braquet, M., and Rocquet, G. 1981. Effect of whole-body gamma irradiation on lipid peroxidation in rat tissues. *Biochimie* 63:555-559.
15. Erickson, J., Goldstein, B., Holowka, D., and Baird, B. 1987. The effect of receptor density on the forward rate constant for binding of ligands to cell surface receptors. *Biophys J* 52:657-662.
16. Yago, M., Belmonte, M.A., Olmos, M.J., Beltran, J., Teruel, C., and Segarra, M. 1999. Detecting anti-SSA and anti-SSB antibodies in routine analysis: a comparison between double immunodiffusion and immunoblotting. *Ann Clin Biochem* 36 (Pt 3):365-371.
17. Betzold, J.M., Saeger, W., and Ludecke, D.K. 1992.

- Ultrastructural-morphometric effects of radiotherapy on pituitary adenomas in acromegaly. *Exp Clin Endocrinol* 100:106-111.
18. Chmura, S.J., Nodzenski, E., Kharbanda, S., Pandey, P., Quintans, J., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. 2000. Down-regulation of ceramide production abrogates ionizing radiation-induced cytochrome c release and apoptosis. *Mol Pharmacol* 57:792-796.
 19. Kulkarni, R., Reither, A., Thomas, R.A., and Tucker, J.D. 2009. Mitochondrial mutant cells are hypersensitive to ionizing radiation, phleomycin and mitomycin C. *Mutat Res* 663:46-51.
 20. Aristizabal, S., Caldwell, W.L., Avila, J., and Mayer, E.G. 1977. Relationship of time dose factors to tumor control and complications in the treatment of Cushing's disease by irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2:47-54.
 21. Calvo, W., Hopewell, J.W., Reinhold, H.S., and Yeung, T.K. 1988. Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X rays. *Br J Radiol* 61:1043-1052.
 22. Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D.G., Ritorto, M.S., Hofmann, K., Alessi, D.R., Knebel, A., Trost, M., and Muqit, M.M. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* 460:127-139.
 23. Heo, J.M., Ordureau, A., Paulo, J.A., Rinehart, J., and Harper, J.W. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell* 60:7-20.
 24. Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., and Mikkelsen, R.B. 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61:3894-3901.

25. Kim, G.J., Chandrasekaran, K., and Morgan, W.F. 2006. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis* 21:361-367.
26. Sacca, S.C., Roszkowska, A.M., and Izzotti, A. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutat Res* 752:153-171.
27. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817-833.
28. Tatsuta, T., and Langer, T. 2008. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* 27:306-314.
29. Song, M., and Dorn, G.W., 2nd. Mitoconfusion: noncanonical functioning of dynamism factors in static mitochondria of the heart. *Cell Metab* 21:195-205.
30. Fusco, A., Santulli, G., Sorriento, D., Cipolletta, E., Garbi, C., Dorn, G.W., 2nd, Trimarco, B., Feliciello, A., and Iaccarino, G. Mitochondrial localization unveils a novel role for GRK2 in organelle biogenesis. *Cell Signal* 24:468-475.
31. Ciccarelli, M., Sorriento, D., Franco, A., Fusco, A., Del Giudice, C., Annunziata, R., Cipolletta, E., Monti, M.G., Dorn, G.W., 2nd, Trimarco, B., et al. Endothelial G protein-coupled receptor kinase 2 regulates vascular homeostasis through the control of free radical oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2415-2424.
32. Cipolletta, E., Campanile, A., Santulli, G., Sanzari, E., Leosco, D., Campiglia, P., Trimarco, B., and Iaccarino, G. 2009. The G protein coupled receptor kinase 2 plays an essential role in beta-adrenergic receptor-induced

- insulin resistance. *Cardiovasc Res* 84:407-415.
33. Sorriento, D., Fusco, A., Ciccarelli, M., Rungi, A., Anastasio, A., Carillo, A., Dorn, G.W., 2nd, Trimarco, B., and Iaccarino, G. Mitochondrial G protein coupled receptor kinase 2 regulates proinflammatory responses in macrophages. *FEBS Lett* 587:3487-3494.
 34. Sorriento, D., Ciccarelli, M., Santulli, G., Illario, M., Trimarco, B., and Iaccarino, G. Trafficking GRK2: Cellular and Metabolic consequences of GRK2 subcellular localization. *Transl Med UniSa* 10:3-7.
 35. Chen, M., Sato, P.Y., Chuprun, J.K., Peroutka, R.J., Otis, N.J., Ibetti, J., Pan, S., Sheu, S.S., Gao, E., and Koch, W.J. Prodeath signaling of G protein-coupled receptor kinase 2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via extracellular signal-regulated kinase-dependent heat shock protein 90-mediated mitochondrial targeting. *Circ Res* 112:1121-1134.
 36. Dorn, G.W., 2nd. Mitochondrial dynamics in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1833:233-241.
 37. Dorn, G., 2nd. Jurassic PARK2 You eat your mitochondria, and you are what your mitochondria eat. *Autophagy*:0.
 38. Ciccarelli, M., Santulli, G., Campanile, A., Galasso, G., Cervero, P., Altobelli, G.G., Cimini, V., Pastore, L., Piscione, F., Trimarco, B., et al. 2008. Endothelial alpha1-adrenoceptors regulate neo-angiogenesis. *Br J Pharmacol* 153:936-946.
 39. Sorriento, D., Santulli, G., Franco, A., Cipolletta, E., Napolitano, L., Gambardella, J., Gomez-Monterrey, I., Campiglia, P., Trimarco, B., Iaccarino, G., et al. Integrating GRK2 and NFkappaB in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Transl Res* 8:493-502.
 40. Illario, M., Monaco, S., Cavallo, A.L., Esposito, I., Formisano, P., D'Andrea, L., Cipolletta, E.,

- Trimarco, B., Fenzi, G., Rossi, G., et al. 2009. Calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) mediates insulin-stimulated proliferation and glucose uptake. *Cell Signal* 21:786-792.
41. Woodall, M.C., Ciccarelli, M., Woodall, B.P., and Koch, W.J. G protein-coupled receptor kinase 2: a link between myocardial contractile function and cardiac metabolism. *Circ Res* 114:1661-1670.
42. Sorriento, D., Franco, A., Rusciano, M.R., Maione, A.S., Soprano, M., Illario, M., Iaccarino, G., and Ciccarelli, M. Good at Heart: Preserving Cardiac Metabolism during aging. *Curr Diabetes Rev* 12:90-99.
43. Helm, A., Arrizabalaga, O., Pignalosa, D., Schroeder, I.S., Durante, M., and Ritter, S. Ionizing Radiation Impacts on Cardiac Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 25:178-188.
44. Helm, A., Lee, R., Durante, M., and Ritter, S. The Influence of C-Ions and X-rays on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Front Oncol* 6:5.
45. Dorn, G.W., 2nd, Song, M., and Walsh, K. Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering. *J Mol Cell Cardiol* 78:123-128.
46. Debattisti, V., Pendin, D., Ziviani, E., Daga, A., and Scorrano, L. Reduction of endoplasmic reticulum stress attenuates the defects caused by Drosophila mitofusin depletion. *J Cell Biol* 204:303-312.
47. Sag, C.M., Wolff, H.A., Neumann, K., Opiela, M.K., Zhang, J., Steuer, F., Sowa, T., Gupta, S., Schirmer, M., Hunlich, M., et al. Ionizing radiation regulates cardiac Ca handling via increased ROS and activated CaMKII. *Basic Res Cardiol* 108:385.
48. Sag, C.M., Wagner, S., and Maier, L.S. Role of oxidants on calcium and sodium movement

- in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 63:338-349.
49. Kobashigawa, S., Kashino, G., Suzuki, K., Yamashita, S., and Mori, H. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. *Radiat Res* 183:455-464.
 50. Fetisova, E.K., Antoschina, M.M., Cherepanynets, V.D., Izumov, D.S., Kireev, II, Kireev, R.I., Lyamzaev, K.G., Riabchenko, N.I., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. Radioprotective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQR1. *Radiat Res* 183:64-71.
 51. Ong, S.B., Hall, A.R., Dongworth, R.K., Kalkhoran, S., Pyakurel, A., Scorrano, L., and Hausenloy, D.J. Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology. *Thromb Haemost* 113:513-521.
 52. Dorn, G.W., 2nd. Parkin-dependent mitophagy in the heart. *J Mol Cell Cardiol*.
 53. Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510:162-166.
 54. Luft, S., Pignalosa, D., Nasonova, E., Arrizabalaga, O., Helm, A., Durante, M., and Ritter, S. Fate of D3 mouse embryonic stem cells exposed to X-rays or carbon ions. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 760:56-63.
 55. Gong, G., Song, M., Csordas, G., Kelly, D.P., Matkovich, S.J., and Dorn, G.W., 2nd. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science* 350:aad2459.
 56. Ping, Z., Zhang, L.F., Cui, Y.J., Chang, Y.M., Jiang, C.W., Meng, Z.Z., Xu, P., Liu, H.Y., Wang, D.Y., and Cao, X.B. The Protective Effects of Salidroside

- from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 alpha - NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015:876825.
57. Campanile, A., and Iaccarino, G. 2009. G-protein-coupled receptor kinases in cardiovascular conditions: focus on G-protein-coupled receptor kinase 2, a gain in translational medicine. *Biomark Med* 3:525-540.
 58. Obrenovich, M.E., Smith, M.A., Siedlak, S.L., Chen, S.G., de la Torre, J.C., Perry, G., and Aliev, G. 2006. Overexpression of GRK2 in Alzheimer disease and in a chronic hypoperfusion rat model is an early marker of brain mitochondrial lesions. *Neurotox Res* 10:43-56.
 59. Carotenuto, A., Cipolletta, E., Gomez-Monterrey, I., Sala, M., Vernieri, E., Limatola, A., Bertamino, A., Musella, S., Sorriento, D., Grieco, P., et al. Design, synthesis and efficacy of novel G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Eur J Med Chem* 69:384-392.
 60. Ciccarelli, M., Chuprun, J.K., Rengo, G., Gao, E., Wei, Z., Peroutka, R.J., Gold, J.I., Gumpert, A., Chen, M., Otis, N.J., et al. G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation* 123:1953-1962.
 61. Penela, P., Rivas, V., Salcedo, A., and Mayor, F., Jr. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1118-1123.
 62. Lymperopoulos, A., Rengo, G., and Koch, W.J. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. *Curr Pharm Des* 18:186-191.
 63. Lymperopoulos, A. Beta-arrestin biased agonism/antagonism at cardiovascular seven transmembrane-spanning receptors. *Curr Pharm Des* 18:192-198.

64. Santulli, G., Campanile, A., Spinelli, L., Assante di Panzillo, E., Ciccarelli, M., Trimarco, B., and Iaccarino, G. G protein-coupled receptor kinase 2 in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 107:1125-1130.
65. Rengo, G., Lymperopoulos, A., Zincarelli, C., Femminella, G., Liccardo, D., Pagano, G., de Lucia, C., Cannavo, A., Gargiulo, P., Ferrara, N., et al. Blockade of beta-adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal alpha(2) -adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure. *Br J Pharmacol* 166:2430-2440.
66. Rengo, G., Lymperopoulos, A., Leosco, D., and Koch, W.J. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 50:785-792.
67. Zhu, W., Petrashevskaya, N., Ren, S., Zhao, A., Chakir, K., Gao, E., Chuprun, J.K., Wang, Y., Talan, M., Dorn, G.W., 2nd, et al. Gi-biased beta2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure. *Circ Res* 110:265-274.
68. Dorn, G.W., 2nd, Clark, C.F., Eschenbacher, W.H., Kang, M.Y., Engelhard, J.T., Warner, S.J., Matkovich, S.J., and Jowdy, C.C. MARF and Opal control mitochondrial and cardiac function in Drosophila. *Circ Res* 108:12-17.
69. Pacelli, R., Conson, M., Cella, L., Liuzzi, R., Troncone, G., Iorio, V., Solla, R., Farella, A., Scala, S., Pagliarulo, C., et al. Radiation therapy following surgery for localized breast cancer: outcome prediction by classical prognostic factors and approximated genetic subtypes. *J Radiat Res* 54:292-298.
70. D'Angelo, D., Borbone, E., Palmieri, D., Uboldi, S., Esposito, F., Frapolli, R., Pacelli, R., D'Incalci, M., and Fusco, A. The impairment of the High Mobility Group A (HMGA) protein function contributes to the anticancer activity of trabectedin. *Eur J Cancer* 49:1142-1151.

71. Dorn, G.W., 2nd, and Maack, C. SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J Mol Cell Cardiol* 55:42-49.

72. Pastore, F., Conson, M., D'Avino, V., Palma, G., Liuzzi, R., Solla, R., Farella, A., Salvatore, M., Cella, L., and Pacelli, R. Dose-surface analysis for prediction of severe acute radio-induced skin toxicity in breast cancer patients. *Acta Oncol*:1-8.

La presente tesi è stata svolta presso i Laboratori di Ricerca

di CARDIOLOGIA del Prof. Bruno Trimarco

Dipartimento **S**ienze **B**iomediche **A**vanzate

Ed. 2 – PT AOU “Policlinico Federico II”

Università degli **S**tudi di **N**apoli